



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Croton triqueter Lam.: Efeito antitumoral e ativação da imunidade inata

Izabel Cristina Portela Bogéa Serra

São Luís – MA
2016

IZABEL CRISTINA PORTELA BOGÉA SERRA

Croton triqueter Lam.: Efeito antitumoral e ativação da imunidade inata

Tese apresentada ao Programa em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia (RENORBIO), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em recursos naturais.

Linha de Pesquisa: Bioprospecção, biodiversidade e conservação.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

São Luís – MA
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instituída nos Termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Coordenação Geral - Universidade Federal Rural de Pernambuco
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos – CEP: 52171-900 Recife-PE
Telefone: (81) 3320-8050, 3320-8051 E-mail: renorbio@pppg.ufpe.br
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DE TESE

ALUNO: Izabel Cristina Portela Bogéa Serra

TÍTULO DO PROJETO: “*Croton Triquetter* Lam.: Efeito antitumoral e ativação da imunidade inata.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profª. Drª. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento – UFMA (Presidente)	_____	_____
Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira – UFMA (Titular)	_____	_____
Prof. Dr. Livio Martins Costa Júnior – UFMA (Titular)	_____	_____
Profª. Drª. Lucilene Amorim Silva – UFMA (Titular)	_____	_____
Prof. Dr. Roberto Nicoletti – IOC/FIOCRUZ-CE (Titular)	_____	_____

DATA DA APROVAÇÃO: 25 de Julho de 2016

HORÁRIO: Às 14:00h.

LOCAL: No prédio de Pós-Graduação do CCBS-UFMA.

Dedico este trabalho a minha FAMÍLIA, pelo simples fato de ver o amor de Deus refletido através deles, pelo amor incondicional que sentimos uns pelos outros e que se traduziu no cuidado, carinho e apoio irrestrito que nos relacionamos.

À minha avó Glóris de Almeida Araújo Portela (*in memoriam*) que sempre nos enchia com sua enorme sabedoria, sinceridade e retidão. Não tenho nem palavras para expressar como ela faz falta em nosso meio.

Buscamos continuamente realizações nas nossas vidas, mas sabemos que sozinhos não vamos conseguir nada. Precisamos do próximo para alcançarmos nossos sonhos, pois um simples olhar faz toda diferença. Essa trajetória do doutorado me fez refletir que além de lutar por esse título foi muito importante conhecer novos professores, compartilhar bons e alguns maus momentos – neles também aprendemos –, fazer novas amizades, compartilhar experiências, fortalecer relações, buscar sempre o porto seguro na família e desfrutar diariamente da presença de Deus. Por isso gostaria de agradecer primeiramente a Deus e sua eterna Graça maravilhosa, que significa um favor imerecido que ELE nos concede e, hoje mais do que nunca, sei que somente a sua Graça me bastou. Guardo no meu coração a seguinte passagem bíblica que diz: “E eis que estou contigo, e te guardarei por onde quer que fores, e te farei tornar a esta terra; porque não te deixarei, até que haja cumprido o que te tenho falado” Gênesis 28:15. Assim como, gostaria de agradecer algumas pessoas que me auxiliaram ao longo dessa caminhada.

À minha mãe, Maria da Gloria Portela Bogéa Serra, que buscando palavras para defini-la, Deus traz a minha memória a palavra intercessora. Minha mãe é aquela que passou noites orando quando eu estava na escola, universidade, para que eu pudesse ter um bom casamento, concluísse o mestrado e o doutorado. É aquela que continua orando... e que para sempre colocará toda a sua família debaixo da vontade de Deus. Só tenho que me sentir honrada por ser sua filha e dizer: Mãe, eu te amo!!!!

Ao meu marido, Luiz Fernando Mello Borges, na qual vivemos diariamente a arte do matrimônio, aprendendo a respeitar, amar, dividir e acima de tudo a ceder. Sei que essa conquista não é somente minha e que hoje o coração do meu marido se exalta de alegria por mais essa vitória. Não acredito em alma gêmea e sim em pessoas que se complementam, nesse caso, ele me completa. Louvo a Deus porque o meu marido tem edificado nossa casa sobre a rocha eterna e que embora existam as tempestades, nada nos abalará e impedirá o crescimento da nossa família. E hoje foi mais um dia para dizer que, meu amor, eu te amo muito mais do que ontem, mas muito menos que amanhã!!!

Aos meus irmãos, Anselmo Serra e Glorinha Serra, que crescemos e vivemos momentos inesquecíveis juntos, dos sorrisos, das lágrimas, da dor e da felicidade. Tenho certeza de que o que nos une vai muito além do laço de sangue.

Aos meus cunhados, Christiano Serra e Klebiana Serra, aos quais considero como irmãos. Agradeço por momentos compartilhados em família que tanto contribuem para o nosso crescimento espiritual, profissional e pessoal.

Aos meus sobrinhos, Sara, Rafael, Pedro, Lúcia, Gabriel, Davi e Selminho, que quando eles chegaram na minha vida tudo mudou! Eles são aqueles que me ensinam com cada gesto, palavra ou até mesmo quando estão caladinhos. Eles são como filhos para mim. E na verdade, nem saberia definir minha vida sem eles. Agradeço a Deus pela existência de cada um e sempre estarei na torcida, pois para mim não importa o lugar que eles cheguem em uma competição e nem mesmo se eles competiram, pois eles sempre serão campeões.

À minha sogra, Élia Maria de Brito Mello, por ter gerado o homem com quem me casei e me faz feliz. Agradeço por que mesmo estando longe nos socorre na hora certa, seja com suas palavras sábias e com suas atitudes valorosas. Só quero dizer que lhe amamos e somos eternamente gratos.

A todos da família MELLO, que me acolheram desde os primeiros anos de namoro com Luiz Fernando e me fazem sentir bem e amada nessa família. Em especial à vovó Zeca, ser nobre e valorosa e que sempre vibra de alegria com as nossas vitórias e nos dá força nas nossas derrotas.

Aos meus amados pastores Reinaldo e Silvia Bezerra, verdadeiros pais, amigos, por estarem continuamente guiando os meus caminhos com seus ensinamentos. Sou abençoada por isso; eu e toda minha família. Ter amigos tão especiais como vocês é uma alegria constante em meu viver!

À Prof^a Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, profissional altamente capacitada e comprometida com suas atividades acadêmicas, na qual agradeço pela dedicação, pelo entusiasmo com que discute os dados, pelos incentivos, críticas construtivas e sugestões que certamente enriqueceram e contribuíram para a melhoria deste trabalho. Nutro por ela um sentimento de gratidão por me aceitar retornar ao Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão (LIF) e por ter sido minha orientadora. Desejo sucesso e que a senhora possa verdadeiramente chegar a lugares nunca alcançados!!!

À Prof^a Dr^a Maria Nilce de Sousa Ribeiro, exemplo de perseverança e determinação, por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa. Agradeço pela

dedicação, profissionalismo, entrega total, e por ser essa PROFESSORA de excelência.

À Prof^a Dr^a Rosane Nassar Meireles Guerra por sua dedicação e incentivo para o crescimento da pesquisa no estado do Maranhão, por ser a sonhadora e idealizadora do LIF. Graças aos seus sonhos o LIF se transformou num celeiro de excelentes profissionais.

Às Professoras Dr^a Lucilene Amorim Silva e Dr^a Ana Paula Azevedo pela convivência e por não pouparem esforços para ensinar.

Ao Herbário MAR e ao Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Júnior, responsável pela identificação botânica da espécie vegetal *Croton triqueter* Lam., por sua valiosa contribuição para realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Flávia Maria Mendonça do Amaral, coordenadora do Laboratório de Fitofármacos, local de preparação dos extratos, por ter se disponibilizado a me auxiliar nessa etapa do trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

Ao Prof. Dr. Lívio Martins Costa Junior, coordenador do Doutorado Renorbio, pela competência com que realiza o seu trabalho. Assim como, não poderia deixar de agradecer a todos os funcionários pela convivência fácil durante esses quatro anos.

À Tereza Serrão, Agradeço a Deus por tê-la colocada na minha família e por me ajudar durante essa trajetória. Inúmeras vezes cheguei em casa tarde da noite e achei minha casa arrumadinha e comidinha feita. Desejo que ela possa prosperar em todas as áreas de sua vida e conquiste muitas vitórias na área profissional que está seguindo.

Aos amigos da célula Herança de Deus: Hiran e Stefanie Sousa, Valbiana Melo, Vanessa Nogueira, Stefany Meneses, Tacyane Alves, Melanie Gonçalves, Denise Siqueira, Matheus Alves, Bruno Corrêa, Vitoria Sousa, Evenny Alves e Fernanda Silva, pessoas que dão exemplo que fazer amigos é um dom e tê-los como amigos é uma grande honra. Com eles tenho a firme convicção que as minhas alegrias são multiplicadas e as tristezas divididas.

Aos eternos amigos Galbia e Júnior Sousa, Graciomar Costa, Diego Arruda, Anne Karine, Aramys Reis, Joleen Lopes, Laise e Fernandes Junior, Eder Fialho, Bruno Abreu, Jeamile Bezerra pelo apoio e incentivo incondicional.

Agradeço profundamente ao LIF, aos demais professores, funcionários e todos os alunos, sejam de graduação ou pós-graduação, pelo acolhimento, atenção e principalmente pelo ambiente acadêmico aberto ao debate de ideias e ao pensamento crítico e reflexivo. No LIF, nós, alunos, encontramos as condições ideais para transformar nossa experiência profissional em produção acadêmica, comprovando que o LIF é um laboratório de referência e tem como marca registrada a capacidade de formar excelentes profissionais. Meu profundo agradecimento a André Vale, Douglas Silva, Mayara da Silva, Yago Lima, Franklin Muniz, Carlene Portela e Diego Arruda pelo auxílio nos experimentos.

À Dona Joana, que compartilha diariamente as nossas frustrações e alegrias.

Ao Johnny Ramos do Nascimento pelas valiosas contribuições nos experimentos, análise dos dados da imunofenotipagem e por todo tempo dedicado a este trabalho.

Agradeço a todos os colegas de doutorado, pela convivência dentro e fora da sala de aula e pelos valiosos momentos de estudos. Em especial, Luecyia Alves de Carvalho Silva, na qual realizamos as nossas pesquisas no mesmo laboratório, além de termos cursado as disciplinas juntas, inclusive aquelas fora do estado do Maranhão.

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão e seus funcionários pelo auxílio e fornecimento de animais para execução deste trabalho.

À Capes pela bolsa de Doutorado concedida e à FAPEMA pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para realização de mais este sonho, MEU MUITO OBRIGADA e, hoje mais do que nunca, estou bem certa *“de que nem morte nem vida, nem anjos nem demônios, nem o presente nem o futuro, nem quaisquer poderes, nem altura nem profundidade, nem qualquer outra coisa na criação será capaz de nos separar do amor de Deus que está em Cristo Jesus, nosso Senhor”* (Romanos 8:38-39). *“E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus”* (Romanos 8:28a).

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas, se você tiver grandes sonhos... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem. Por isso, meu ardente desejo é que você nunca desista dos seus sonhos”.

Augusto Cury

SERRA, I. C. P. B. ***Croton triqueter* Lam.: Efeito antitumoral e ativação da imunidade inata.** 2016. 165f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal: Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA, 2016.

RESUMO

A busca por medicamentos antineoplásicos tem aumentado, com o objetivo de ampliar as possibilidades de tratamentos, de torná-los mais efetivos e seguros. Neste trabalho investigou-se o efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das folhas de *Croton triqueter* Lam. (EEJ), assim como, possíveis mecanismos imunológicos envolvidos nesta resposta. Além disso, avaliou-se o efeito desse extrato sobre o sistema imunológico de camundongos saudáveis. Para avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio de MTT, na qual o EEJ apresentou em todas as concentrações testadas citotoxicidade para as células do carcinoma de Ehrlich. Por outro lado, apenas a maior concentração (500 µg/mL) reduziu 20,4% a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7. Para avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, camundongos *Swiss*, adultos (\pm 60 dias, 30 ± 5 g), machos foram inoculados por via intraperitoneal com células do tumor de Ehrlich (2×10^6 /animal) e tratados nos dias 3, 5, 7 e 9 após inóculo do tumor com o EEJ nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg por via oral (v.o.). O grupo controle recebeu solução tamponada com fosfato (PBS), v.o. Além disso, foi utilizado um grupo controle sem tumor e tratados com o EEJ nas mesmas doses e esquema terapêutico. Metade dos animais foram eutanasiados 10 dias após inóculo do tumor, a outra metade foi mantida viva para acompanhamento da sobrevivência e cálculo da expectativa de vida. O desenvolvimento tumoral foi avaliado pelo peso dos animais, circunferência abdominal, volume da ascite e número das células tumorais totais. O sangue total foi coletado para determinação de parâmetros hematológicos. Citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-12) e a quimiocina MCP-1 presentes na ascite e no soro foram dosadas pela técnica de CBA. Baço, medula e os linfonodos mesentéricos foram obtidos para realização da contagem das células linfóides. Após a contagem, uma parte da suspensão de células do baço foi submetida à cultura para avaliação da produção de NO e outra parte foi utilizada para realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo para células T, NK, NKT e apresentadoras de antígenos. Os resultados obtidos demonstraram que o EEJ aumentou a expectativa de vida dos animais portadores de tumor, assim como reduziu o número de células tumorais totais presentes na cavidade peritoneal. Além disso, o EEJ, tanto nos animais inoculados com tumor quanto nos não inoculados, não alterou os parâmetros hematológicos analisados nem o número de células da medula óssea e do linfonodo mesentérico. Na contagem diferencial dos leucócitos, o EEJ foi capaz de aumentar o número de linfócitos e monócitos e reduzir o número de polimorfonucleares nos camundongos inoculados com tumor e tratados com o EEJ. Foi observado que nos animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich, o EEJ na dose de 500 mg/kg promoveu um aumento do número de células do baço, sendo que nos animais inoculados com tumor houve um aumento da frequência absoluta de células T CD4⁺ e CD8⁺, além do aumento dessas populações que expressavam o marcador CD28⁺, bem como, aumento de células CD3⁺CD49b⁺NK1.1⁺, CD3⁺CD49b⁺NK1.1⁺ e IA-IE⁺Ly6C⁺Ly6G⁺CD86⁺. A dose de 125 mg/kg aumentou a frequência absoluta de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, enquanto que a dose de 250 mg/kg aumentou somente a população de células T CD8⁺ ativadas. Verificou-se ainda, que o tratamento com o EEJ nas três doses reduziu a concentração de IL-6 na ascite

de forma dose dependente, aumentou a concentração de IFN- γ e apenas a dose de 500 mg/kg reduziu a concentração TNF- α . No soro, a dose de 125 mg/kg reduziu a concentração de IL-6 e aumentou IFN- γ . Quanto a análise do EEJ sobre os macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS foi possível verificar um aumento da expressão dos marcadores CD14⁺, IA-IE e CD86⁺ nos macrófagos com e sem LPS, indicando que o EEJ apresenta a capacidade de polarizar macrófagos para o perfil M1. No ensaio de polarização de macrófagos, o EEJ foi capaz de aumentar a expressão dos marcadores IA-IE e CD86⁺ nos macrófagos previamente polarizados para os perfis M1 e M2. Estes resultados indicam que a espécie vegetal *Croton triqueter* Lam. exibe propriedade antitumoral, sugerindo que, além do efeito direto, mecanismos imunológicos estariam envolvidos nessa resposta.

Palavras-Chave: Câncer, plantas medicinais, tumor de Ehrlich, microambiente tumoral, macrófagos.

SERRA, I. C. P. B. ***Croton triquetus* Lam.: antitumor effect and activation of innate immunity.** 2016. 165f. Thesis (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal: Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA, 2016.

ABSTRACT

The search for anticancer drugs has increased, with the aim of expanding the possibilities of treatments, to make them more effective and safe. In this work it was investigated the antitumor effect *in vitro* and *in vivo* of an ethanolic extract of *Croton triquetus* Lam. (EEJ) leaves, as well as possible mechanisms involved in this response. In addition, it assessed the effect of this extract on the immune system of healthy mice. For cytotoxicity evaluation was used the MTT assay, where the EEJ presented at all concentrations tested, cytotoxicity to Ehrlich carcinoma cells. On the other hand, only the highest concentration (500 µg/mL) reduced 20.4% the viability of RAW 264.7 macrophages. For evaluation of antitumor activity *in vivo*, Swiss mice, adult (\pm 60 days, 30 ± 5 g), male were inoculated intraperitoneally with the Ehrlich tumor cells (2×10^6 /animal) and treated on days 3, 5, 7, and 9 after tumor inoculation with EEJ at doses of 125, 250 and 500 mg/kg orally (po). The control group received phosphate-buffered saline (PBS), po. Furthermore, it was used a non-tumor bearing control group and treated with the same doses of EEJ and therapeutic regimen. Half of the animals were euthanized 10 days after tumor inoculation, the other half was kept alive for monitoring survival and calculation of life expectancy. The tumor development was evaluated by animal weight, waist circumference, ascites volume and total number of tumor cells. Whole blood was collected for determination of haematological parameters. Cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-12) and the chemokine MCP-1 present in the ascites and serum were measured by CBA technique. Spleen, bone marrow and mesenteric lymph nodes were obtained to perform the counting of lymphoid cells. After counting a portion of the spleen cell suspension was subjected to culture for assessment of NO production and another part was used to perform immunophenotyping by flow cytometry for T cells, NK, NKT cells and antigen-presenting cells. The results showed that the EEJ increased the lifespan of tumor-bearing animals, and reduced the total number of tumor cells present in the peritoneal cavity. Besides, the EEJ in animals inoculated with tumor and the uninoculated not altered hematological parameters or the number of cells in the bone marrow and mesenteric lymph nodes. In the leukocyte differential count, EEJ was able to increase the number of lymphocytes and monocytes and reduce the number of polymorphonuclear leukocytes in mice inoculated with tumor and treated with EEJ. It was observed that in animals inoculated with or without Ehrlich tumor, EEJ at the dose of 500 mg/kg provided an increased number of spleen cells, and in animals inoculated with tumor there was an increase in the absolute frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, besides the increase of these populations expressing CD28⁺ marker, as well as increase of CD3⁺CD49b⁺NK1.1⁺ and IA-IE⁺Ly6C⁺Ly6G⁺CD86⁺ cells. The dose of 125 mg/kg increased the absolute frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells activated, whereas the dose of 250 mg/kg only increased the population of CD8⁺ T cells activated. It was also found that the treatment with EEJ at three doses reduced the IL-6 concentration in the ascites dose-dependent manner, increased the IFN- γ concentration and only dose of 500 mg/kg reduced the TNF- α concentration. In serum, the dose of 125 mg/kg reduced the IL-6 concentration and increased IFN- γ . The analysis of EEJ on RAW 264.7 macrophages stimulated or not with LPS was possible to verify increased

expression of CD14⁺, IA-IE and CD86⁺ markers on macrophages with and without LPS, indicating that the EEJ has the ability to polarize macrophages to the profile M1. On macrophages polarization assay, EEJ was able to increase expression of IA-IE⁺ and CD86⁺ markers on previously polarized macrophages to the profiles M1 and M2. These results indicate that plant species *Croton triqueter* Lam. exhibits antitumor property, suggesting that, in addition to direct effects, immunological mechanisms were involved in this response.

Keywords: Cancer, medicinal plants, Ehrlich tumor, tumor microenvironment, macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativas para o ano de 2016 dos novos casos de câncer, segundo localização primária, exceto pele não melanoma, Maranhão (Brasil) .	30
Figura 2 – As três fases da imunoeedição: eliminação, equilíbrio e escape	32
Figura 3 – Polarização de macrófagos	34
Figura 4 – Possíveis mecanismos supressores de células T regulatórias (células Treg; CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺).....	39
Figura 5 – Exemplar florido de <i>Croton triqueter</i> Lam.	45
Figura 6 – Divisão dos grupos experimentais	56
Figura 7 – Protocolo de tratamento no modelo do Tumor de Ehrlich	57
Figura 8 – Estratégia de análise para identificação dos linfócitos T e suas subpopulações do baço de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ	62
Figura 9 – Estratégia de análise para identificação dos macrófagos do baço de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ	63
Figura 10 – Estratégia de análise para identificação de células NK do baço de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ	64
Figura 11 – Estratégia de análise para identificação de células NKT do baço de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ	65
Figura 12 – Estratégia de análise para identificação dos macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS e tratados com o EEJ	68
Figura 13 – Estratégia de análise para identificação dos macrófagos RAW 264.7 polarizados para o perfil M1 e M2 e tratados com o EEJ.....	70
Figura 14 – Efeito do EEJ sobre a viabilidade das células do tumor de Ehrlich após 24 h de incubação em estufa a 37°C, 5% de CO ₂ , com diferentes concentrações do EEJ (62,5, 125, 250 e 500 µg/mL).....	73
Figura 15 – Avaliação da citotoxicidade do EEJ sobre a linhagem das células RAW 264.7. As células RAW 264.7 foram incubadas na presença ou ausência de EEJ (62,5, 125, 250 e 500 µg/mL) durante 24 h	74

Figura 16 – Aumento da expectativa de vida (% ILS) de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e tratados com o EEJ	75
Figura 17 – Efeito do tratamento com EEJ sobre o peso dos animais (A), circunferência abdominal (B), volume total da ascite (C) e número de células tumorais totais na ascite (D).....	76
Figura 18 – Efeito do tratamento com EEJ sobre nº de células do baço (A), nº de células da medula óssea (B) e nº de células do linfonodo mesentérico (C).....	80
Figura 19 – Análise dos linfócitos T auxiliares ativados do baço de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ.....	84
Figura 20 – Análise dos linfócitos T citotóxicos ativados do baço de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ.....	85
Figura 21 – Análise dos macrófagos do baço de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ.....	86
Figura 22 – Análise de células NK de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ	87
Figura 23 – Análise de células NKT de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ	88
Figura 24 – Efeito do EEJ na liberação de citocinas (IL-6 (A), TNF- α (B)), quimiocina (MCP-1 (C)) e produção de NO (D) em cultura de macrófagos RAW 264.7 pela técnica de CBA.....	90
Figura 25 – Efeito do EEJ sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS (10 μ g/mL)	92
Figura 26 – Efeito do EEJ sobre macrófagos RAW 264.7 polarizados para o perfil M1 e M2 (A) e produção de NO (B).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma	29
Tabela 2 – Parâmetros hematológicos de camundongos saudios e tratados nos dias 3, 5, 7 e 9 com EEJ, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, v.o. ou PBS (controle, v.o.)	77
Tabela 3 – Parâmetros hematológicos de camundongos com tumor de Ehrlich e tratados nos dias 3, 5, 7 e 9 após inóculo (2×10^6 /animal, ip.) com EEJ, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, v.o. ou PBS (controle, v.o.)	77
Tabela 4 – Contagem diferencial de leucócitos de camundongos Swiss inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, v.o. ou PBS (controle, v.o.)	78
Tabela 5 – Concentração de citocinas no soro de camundongos <i>Swiss</i> albinos machos, inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com EEJ ou PBS (controle, v.o.)	81
Tabela 6 – Níveis de citocinas no soro de camundongos <i>Swiss</i> albinos machos saudios, tratados com EEJ ou PBS (controle, v.o.)	82
Tabela 7 – Citocinas e quimiocinas na ascite de camundongos <i>Swiss</i> albinos machos, inoculados com do tumor de Ehrlich e tratados com EEJ.....	83

LISTA DE SIGLAS

ADCC: Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (do inglês: *Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity*)

ANOVA: Análise de variância (do inglês: *analysis of variance*)

APC: Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês: *antigen presenting cells*)

CBA: do inglês: *Cytometric Bead Array*

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

Cl₅₀: Concentração Inibitória Média

COX-2: ciclooxigenase-2

DL₅₀: Dose Letal Média

DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)

D.O.: densidade óptica

e.p.m.: erro padrão das médias

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EEJ: extrato etanólico das folhas de *Croton triqueter* Lam.

FAL: fração alcaloídica terciária

HCl: ácido clorídrico

HCM: hemoglobina corpuscular média

HL-60: do inglês: *Human promyelocytic leukemia cells*

IFN- γ : interferon-gama

IgG: Imunoglobulina G

IL: interleucina

ILS: aumento da expectativa de vida (do inglês: *increase in lifespan*)

IM: intramuscular

INCA: Instituto Nacional do Câncer

iNOS: óxido nítrico sintase induzível (do inglês: *inducible nitric oxide synthase*)

ip.: intraperitoneal

MCF-7: do inglês: *Michigan Cancer Foundation-7*

MHC: complexo de histocompatibilidade principal (do inglês: *major histocompatibility complex*)

MST: na mediana do tempo de sobrevivência (do inglês: *median survival time*)

N.D.: não detectado

NF-kB: fator nuclear kappa B (do inglês: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK: Célula assassina natural (do inglês: *natural killer*)

NO: óxido nítrico (do inglês: *Nitric oxide*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: solução tamponada com fosfato

PE: ficoeritrina (do inglês: *Phycoerythrin*)

PGE2: prostaglandina E2

pH: potencial hidrogeniônico

rcf: Força inercial centrífuga (do inglês: *relative centrifugal force*)

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

RNS: espécies reativas de nitrogênio (do inglês: *reactive nitrogen species*)

ROS: espécies reativas de oxigênio (do inglês: *reactive oxygen species*)

rpm: rotações por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SEM: erro padrão (do inglês: *Standard error of the mean*)

STAT3: transdutor de sinais e ativador de transcrição 3 (do inglês: *signal transducers and activators of transcription*)

TAA: antígenos associados ao tumor (do inglês: *tumor-associated antigens*)

TAE: tumor ascítico de Ehrlich

TAMs: macrófagos associados a tumores (do inglês: *tumor-associated macrophages*)

TCR: receptores de células T (do inglês: *T cell receptor*)

Th: linfócito T auxiliar (do inglês: *lymphocyte T Helper*)

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa (do inglês: *tumor necrosis factor-alpha*)

Treg: células T regulatórias (do inglês: *regulatory T cell*)

v.o.: via oral

VCM: volume corpuscular médio

WI-38: cultura de células humanas diploides

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REFERENCIAL TEÓRICO	27
2.1	Epidemiologia do câncer	27
2.2	Sistema imune e Desenvolvimento tumoral	31
2.3	Tumor de Ehrlich	40
2.4	Considerações sobre o gênero <i>Croton</i> e a espécie vegetal <i>Croton triqueter</i> Lam.	42
3	OBJETIVOS	49
3.1	Geral	49
3.2	Específicos	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	Coleta do material vegetal	51
4.2	Processamento do material vegetal e Preparação do extrato etanólico	51
4.3	Manutenção do tumor de Ehrlich	52
4.4	Manutenção das células RAW 264.7	53
4.5	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	54
4.5.1	Tumor de Ehrlich	54
4.5.2	Macrófagos RAW 264.7	55
4.6	Avaliação da atividade antitumoral do EEJ <i>in vivo</i>	55
4.6.1	Animais	55
4.6.2	Delineamento experimental	56
4.6.3	Avaliação dos parâmetros hematológicos	57
4.6.4	Obtenção e quantificação das células dos órgãos linfoides	58

4.6.5	Determinação da produção de óxido nítrico	58
4.6.6	Quantificação de citocinas e quimiocinas pelo método <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA).....	59
4.6.7	Características fenotípicas de células do baço por citometria de fluxo	60
4.7	Efeito do EEJ em macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS	66
4.7.1	Plaqueamento e tratamento	66
4.7.2	Quantificação de NO, citocinas e quimiocinas do sobrenadante de cultura células RAW pelo método CBA.....	66
4.7.3	Características fenotípicas de células de cultura RAW 264.7	66
4.8	Efeito do EEJ sobre a polarização de macrófagos RAW 264.7	68
4.9	Análise estatística	71
5	RESULTADOS.....	73
5.1	Ensaio de citotoxicidade	73
5.1.1	Efeito citotóxico do EEJ sobre as células do tumor de Ehrlich	73
5.1.2	Efeito citotóxico do EEJ sobre as células RAW 264.7	74
5.2	Efeito antitumoral <i>in vivo</i> do EEJ.....	74
5.2.1	Efeito do EEJ sobre a sobrevivência de animais portadores do TAE	74
5.2.2	Efeitos do EEJ sobre o desenvolvimento do TAE	75
5.2.3	Efeitos do EEJ sobre os parâmetros hematológicos dos animais portadores ou não de TAE	76
5.2.4	Efeito do EEJ sobre a celularidade dos órgãos linfoides	78
5.2.5	Produção de óxido nítrico.....	81
5.2.6	Efeito do EEJ sobre as concentrações de citocinas no soro dos animais portadores ou não TAE	81

5.2.7	Efeito do EEJ sobre as concentrações de citocinas na ascite dos animais portadores de TAE.....	82
5.2.8	Perfil fenotípico de células do baço.....	83
5.3	Efeito do EEJ em macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS	89
5.3.1	Efeitos do EEJ sobre a produção de óxido nítrico, citocinas e quimiocinas na cultura de células RAW	89
5.3.2	Características fenotípicas das células da cultura RAW.....	90
5.4	Indução da polarização dos macrófagos.....	93
5.5	Efeito do EEJ sobre a polarização dos macrófagos	94
6	DISCUSSÃO.....	97
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
8	CONCLUSÕES GERAIS	110
	REFERÊNCIAS	113
	APÊNDICE A. Indução da polarização dos macrófagos.....	125
	APÊNDICE B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract and tertiary alkaloid fraction from <i>Croton triqueter</i> Lam.	126
	APÊNDICE C. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of antileishmanial extract from <i>Julocroton triqueter</i> (Euphorbiaceae)	137
	APÊNDICE D. Patente	149
	ANEXO A. Normas de submissão do periódico.....	160
	ANEXO B. Comprovante de submissão do artigo	164



Introdução

1 INTRODUÇÃO

Vivemos um período de transição epidemiológica no qual pessoas de todo o mundo estão vivendo mais tempo. Mesmo em países menos desenvolvidos, doenças infecciosas e parasitárias passam a ser mais conhecidas e controláveis. A industrialização e a progressiva migração do homem dos campos para as cidades têm sido acompanhadas do aumento da exposição do homem a uma crescente lista de agentes com potencial mutagênico e carcinogênico. Aliados, esses fatores explicam a crescente incidência de câncer no Brasil e no mundo.

Paralelo a essas modificações têm-se vivenciado um aumento na investigação em biologia celular, bioquímica e biologia molecular o que tem fornecido informações detalhadas sobre as moléculas e processos que permitem que as células possam se dividir, crescer, diferenciar e desempenhar as suas funções essenciais. Este conhecimento básico sobre biologia celular tem levado a descobertas práticas sobre os mecanismos do câncer e fornecido informações necessárias para elaboração de novos tratamentos. Mas apesar de todo esse progresso na compreensão da biologia do câncer e do investimento significativo no desenvolvimento de terapias antitumorais, o câncer continua sendo considerado um dos principais problemas de saúde pública mundial e uma das principais causas de morte entre crianças e adultos.

Com todo esse cenário, o desenvolvimento de alternativas profiláticas, bem como alternativas terapêuticas viáveis, mais eficazes, com menos efeitos colaterais e mais acessíveis à população se faz necessário, sobretudo aquelas que possam apresentar diferentes alvos terapêuticos. Sendo assim, o tratamento oncológico a partir de componentes do sistema imunológico emerge como uma possível alternativa,

dentro da perspectiva, de eliminar somente as células cancerígenas, evitando os efeitos colaterais comumente causados pela quimioterapia e radioterapia.

Nesse sentido, diversos estudos têm validado o efeito de produtos naturais como potenciais fontes de medicamentos mais efetivos, menos tóxicos e com propriedades sobre o sistema imunológico, destacando-se os estudos com espécies vegetais com base nos levantamentos etnofarmacológicos e relação quimiotaxonômica.

Em estudos anteriores realizados por nosso Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), avaliou-se a atividade antitumoral do extrato etanólico das folhas da espécie vegetal *Croton triqueter* Lam. (EEJ) frente ao tumor ascítico de Ehrlich (TAE), no qual esse extrato reduziu expressivamente a formação do líquido ascítico e o número de células tumorais, aumentando a sobrevivência dos animais inoculados com tumor e o número de células do baço, fato este que pode ser atribuído a possível efeito imunestimulador desse extrato. Em análise fitoquímica realizada com o EEJ foi demonstrada a presença de flavonoides e alcaloides, compostos conhecidos por suas propriedades antioxidante e antitumoral, respectivamente, que podem estar envolvidos nos mecanismos de resposta antitumoral (MOREIRA, 2013).

Sendo assim, os dados científicos obtidos por nosso grupo de pesquisa com a espécie vegetal *Croton triqueter* Lam. nos encorajaram a dar continuidade, buscando caracterizar efetivamente a atividade antitumoral do EEJ, assim como, elucidar possíveis mecanismos imunológicos envolvidos nessa ação. Além disso, decidiu-se investigar o efeito do EEJ sobre o sistema imunológico de camundongos saudáveis. Considerou-se, ainda, o fato da espécie vegetal *Croton triqueter* Lam. ser cultivada no Estado do Maranhão, apresentar um ciclo de vida curto, o que

possibilitaria a possível produção em larga escala da matéria-prima para produção de fármacos e/ou medicamentos que pudessem ser utilizados como adjuvantes no tratamento do câncer.

Teve-se como hipótese que a espécie vegetal *Croton triqueter* Lam. atua seletivamente contra as células do tumor de Ehrlich, além de melhorar a resposta imunológica dos camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.



Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia do câncer

À medida em que os processos de transição demográfica e epidemiológica se desenvolvem no Brasil e no mundo, as neoplasias vêm se tornando rapidamente uma das principais causas de morbimortalidade. O declínio da fecundidade e a queda da mortalidade contribuíram para alterações na estrutura populacional, com progressivo envelhecimento da população e aumento na esperança de vida ao nascer. Tais mudanças geraram queda na mortalidade pelas doenças infecciosas e parasitárias, ao mesmo tempo em que se verificou aumento na proporção de mortes atribuídas às doenças cardiovasculares, causas externas e neoplasias.

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), só no ano de 2012, 14,1 milhões pessoas foram diagnosticadas com câncer e 8,2 milhões de pessoas morreram por conta dessa doença. Em comparação ao ano de 2008, houve um aumento em 11,0% e 7,9% no número de novos casos e óbitos, respectivamente. Os cânceres mais comumente diagnosticados em 2012 foram os de pulmão (1,8 milhão, 12,8% do total), mama (1,7 milhão, 12,1%) e colorretal (1,4 milhão, 9,9%). Ainda segundo a OMS, mais da metade de todos cânceres diagnosticados (56,8%) e os óbitos por câncer em 2012 (64,9%) ocorreram em regiões menos desenvolvidas do mundo, como por exemplo: Bolívia, Venezuela, Brasil e Índia (NEGRIN, 2015; SREEDEVI, JAVED, DINESH, 2015; CATARINO et al., 2015; DIDKOWSKA et al., 2016). Essas proporções irão aumentar ainda mais devido ao crescimento e envelhecimento da população e aumento da prevalência de fatores de risco conhecidos (WHO, 2014).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) são estimados aproximadamente 596 mil casos novos de câncer para o ano de 2016. Serão 295.200 mil novos casos para o sexo masculino e 300.800 mil para o sexo feminino, sendo o câncer de pele do tipo não melanoma o mais incidente (175.760 mil casos novos) (INCA, 2016).

Esses dados comparados com o ano de 2008 demonstram que houve um aumento em 26,8% no número total de pessoas com câncer. Esse aumento reflete uma redução nas taxas de natalidade e mortalidade com aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional, modificação nos padrões de saúde-doença caracterizados pela alteração no perfil de mortalidade com diminuição da taxa de doenças infecciosas e aumento da taxa de doenças crônico-degenerativas (TORRE et al., 2015).

A Tabela 1 descreve as estimativas das taxas de incidência dos principais tipos de câncer (excluindo o câncer de pele do tipo não melanoma), por sexo. Entre os homens, os cânceres de próstata, traqueia, brônquios e pulmão, colorretal e estômago serão responsáveis por cerca de metade de todos os cânceres diagnosticados em 2016; só o câncer de próstata será responsável por 28,6% (61.200) dos casos incidentes, tornando-o câncer mais comum entre os homens. Os quatro tipos de câncer mais comumente diagnosticados entre as mulheres em 2016 serão o de mama, colorretal, colo do útero e traqueia, brônquio e pulmão. O câncer de mama deverá ser responsável por 28,1% (57.960) de todos os novos casos de câncer entre as mulheres (INCA, 2016).

Tabela 1 – Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	casos*	%		Localização Primária	casos*	%
Próstata	61.200	28,6%		Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%		Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%		Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%		Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%		Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%		Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%		Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%		Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Adaptado do Instituto Nacional do Câncer, INCA (2016).

Ainda segundo o INCA (2016), a previsão é que haja para 2016 um número maior de novos casos na região Sudeste (291.090) e Sul (131.880), seguidas das regiões Nordeste (107.180), Centro-Oeste (44.430) e do Norte do país (21.490).

No Maranhão, Estado localizado na Região Nordeste do Brasil e com população de 6.904.241 habitantes, foram estimados para o ano de 2016, 6.370 novos casos de câncer (excetuando-se o câncer de pele do tipo não melanoma, 1.380 casos) por 100.000 habitantes, 48% (3.040) ocorrendo em homens e 52% (3.330) nas mulheres. Os sítios de câncer mais comuns foram o câncer de próstata (1.050 casos, 16,5% de todos os casos de câncer), seguido por câncer de colo do útero (970, 15,2%), câncer de mama feminina (650, 10,2%) e câncer de estômago (370, 5,8%). Estes quatro representaram 47,7% do encargo global estimado no Maranhão em 2016. Os sítios primários mais comuns em homens foram os de próstata (1.050, 34,5%), estômago (240, 7,9%), traqueia, brônquios e pulmão (210, 6,9%) e sistema nervoso central (210, 6,9%). Nas mulheres, o câncer de colo do útero foi a neoplasia mais predominante (970, 29,1%), seguido pelo câncer de mama (650, 19,5%), colorretal (150, 4,5%) e traqueia, brônquios e pulmão (150, 4,5%) (INCA, 2016).

A Figura 1 resume os números de novos casos de câncer, que foram estimados para o Estado do Maranhão em 2016, por tipo de câncer. Projeções

baseadas nessas estimativas preveem um aumento substancial de novos casos de câncer e óbitos até 2025. Sendo assim, estudos visando o desenvolvimento de novas drogas anticancerígenas mais eficazes e seguras e que apresentem diferentes alvos terapêuticos devem se intensificar.

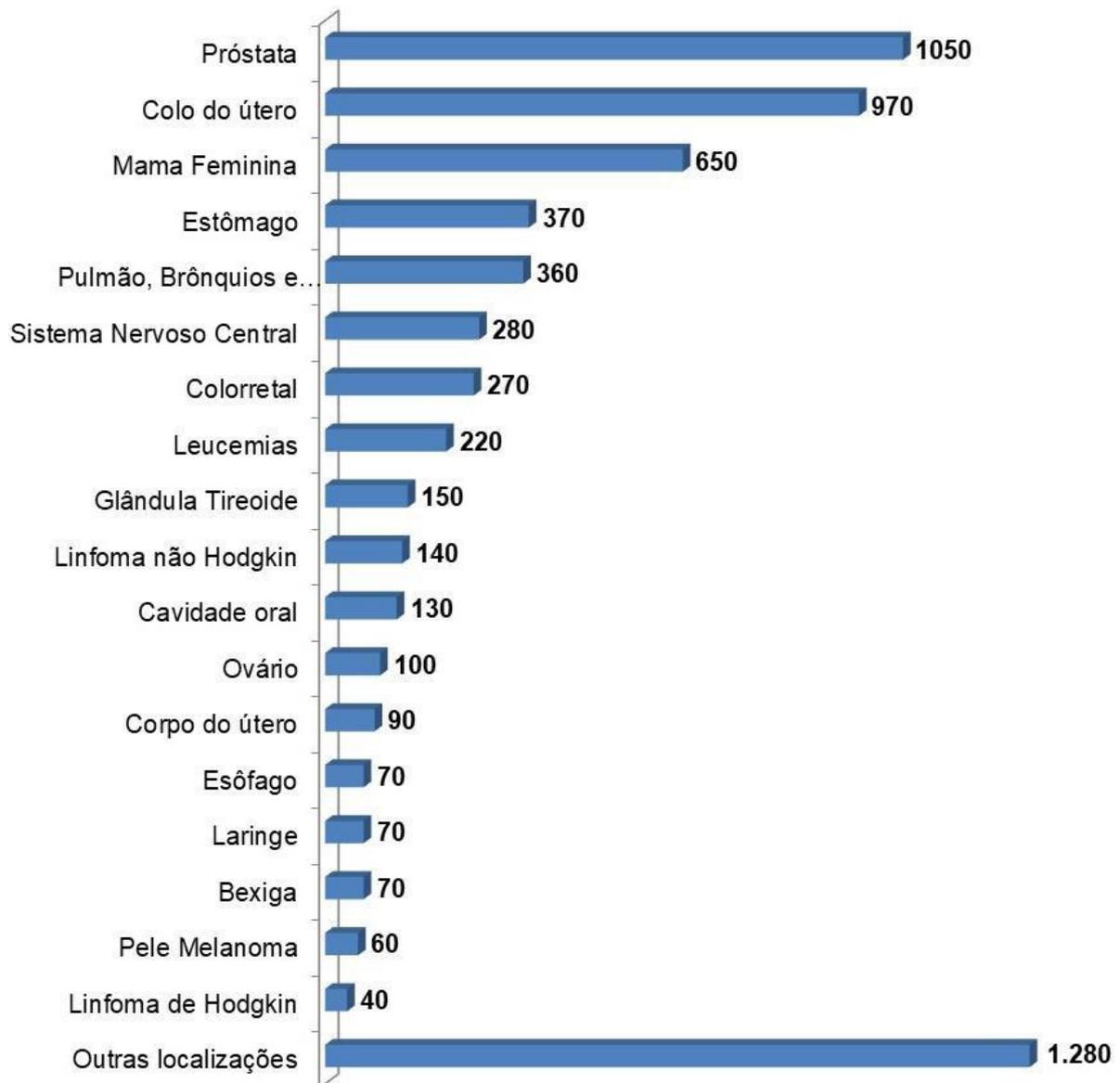


Figura 1 – Estimativas para o ano de 2016 dos novos casos de câncer, segundo localização primária, exceto pele não melanoma, Maranhão (Brasil).

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Adaptado do Instituto Nacional do Câncer, INCA (2016).

2.2 Sistema imune e Desenvolvimento tumoral

Em 1909, Paul Ehrlich iniciou as discussões sobre a atuação do sistema imune na repressão do crescimento de carcinomas, imaginando que este processo ocorria com grande frequência e que, por isso, muitos tumores não se desenvolviam. A partir desta data, várias discussões em torno do papel do sistema imunológico na resposta às neoplasias iniciaram. Cinquenta anos mais tarde, Sir Frank Macfarlane Burnet e Lewis Thomas lançaram a teoria da imunovigilância (DUNN, OLD, SCHREIBER, 2004; SCHREIBER, 2005). Burnet acreditava que os novos antígenos formados pelos tumores poderiam provocar uma reação imunológica efetiva, que culminaria na eliminação destes pelo organismo. Ele propunha ainda que a imunidade antitumoral se baseava na discriminação do próprio e não próprio pelo sistema imune. De maneira semelhante, Thomas acreditava que o organismo possuía mecanismos protetores contra as neoplasias, semelhante àqueles que ocorrem no processo de rejeição ao enxerto, considerando esta a defesa primária contra os tumores. Inicialmente não houve muito suporte científico para essas hipóteses, mas as mesmas foram consideradas um avanço para o entendimento em relação à resposta imune contra os tumores (JAKÓBISIAK, LASEK, GOLAB, 2003; DUNN, OLD, SCHREIBER, 2004; SCHREIBER, 2005). Através de modelos experimentais, as ideias de Ehrlich, Burnet e Thomas ganharam suporte científico, e contribuíram para um maior conhecimento sobre o papel do sistema imunológico na resposta tumoral.

No intuito de melhor caracterizar a relação entre a resposta imunológica contra os tumores, avanços recentes no campo da imunologia básica acrescentaram o conceito complementar da imunoedição, no qual a pressão seletiva do sistema imune molda o perfil antigênico dos tumores (TORREZINI & ATHANAZIO, 2008). A

imunoeedição envolve a seleção de mecanismos de evasão pelas células tumorais, permitindo o seu crescimento até o estágio clinicamente detectável, sendo este processo constituído por três fases. Inicialmente, o sistema imune reconhece as células transformadas e recruta moléculas pró-inflamatórias, caracterizando o processo de eliminação. Em um segundo momento, as células tumorais selecionadas que não foram destruídas geram variantes que carregam mutações possibilitando a resistência. Segue-se uma fase de equilíbrio com o sistema imune, na qual coexistem as células de baixa imunogenicidade que compõem o tumor e as células e moléculas responsáveis pelo controle do crescimento das mesmas. Por fim, após esta seleção natural as células tumorais se desenvolvem em um ambiente virtualmente anérgico (fase de evasão) (Figura 2) (SCHREIBER, 2005).

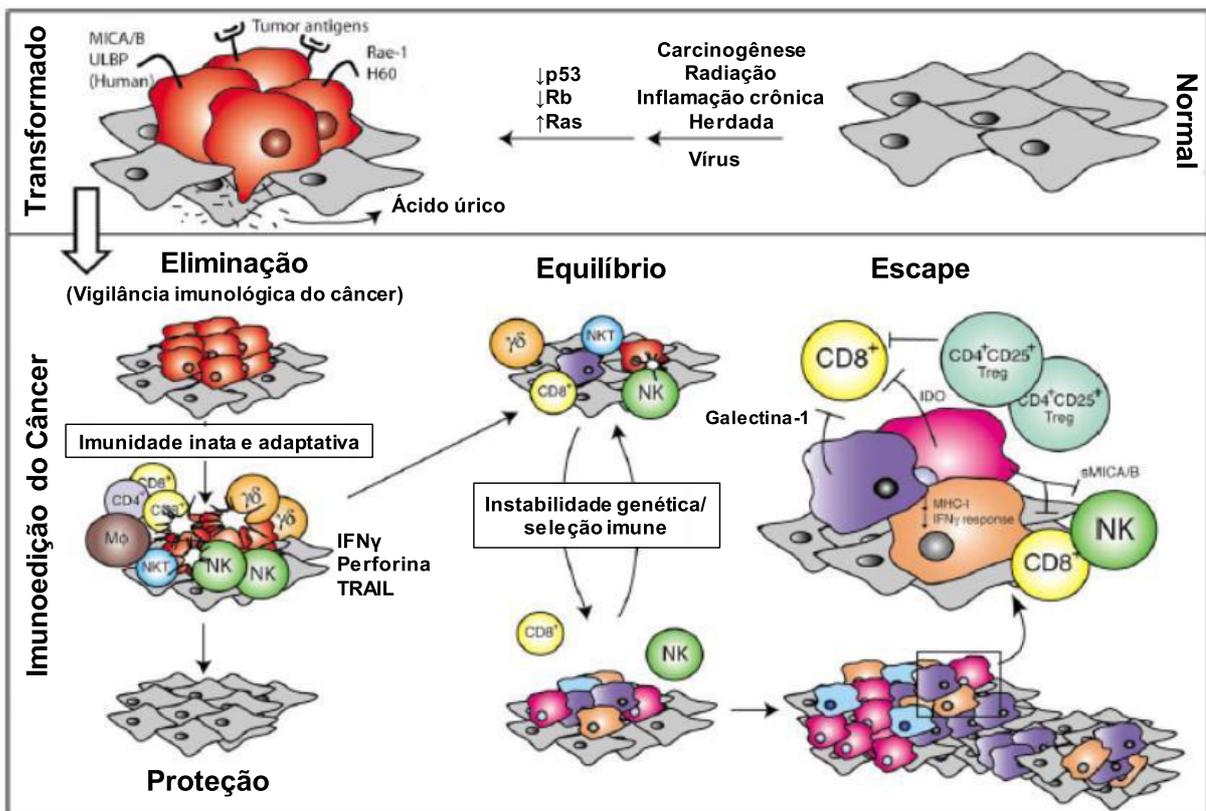


Figura 2 – As três fases da imunoeedição: eliminação, equilíbrio e escape. Fonte: Adaptado do SCHREIBER (2005).

Essa hipótese da imunoeedição, citada por Dunn, proporcionou um melhor entendimento sobre os mecanismos de escape das células cancerígenas ao sistema imune. Esta hipótese partiu da ideia de que o sistema imune tem um duplo papel no processo tumoral, na qual componentes da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos, células *natural killer* (NK) e células dendríticas) e da imunidade adquirida (linfócitos B e T) podem agir interferindo positiva ou negativamente no crescimento tumoral, de acordo com o estágio de desenvolvimento e com o tipo de tumor (SMYTH et al., 2001; MELVOLD & STICCA, 2007).

Os macrófagos consistem numa população extremamente heterogênea; são originários a partir de monócitos do sangue, que migram para os tecidos e se diferenciam em tipos distintos de macrófagos. Demonstram um elevado grau de plasticidade em resposta a sinais a partir do microambiente e pode assumir um espectro de funções necessárias para a homeostase do tecido (HUME, 2008). Dois estados de polarização relativamente distintos têm sido reconhecidos para essas células: Macrófagos M1, classicamente ativados por IFN- γ e por produtos microbianos, expressam concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 ou IL-23), complexo principal de histocompatibilidade (MHC), enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e são relatados por ter uma elevada capacidade bactericida e tumoricida. Em contraste, os macrófagos M2, alternativamente, ativados, são estimulados por IL-4, IL-10 e IL-13, regulam negativamente MHC de classe II e a expressão de IL-12, e mostram aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. As principais funções dos macrófagos M2 são de remover detritos e promover a reparação tecidual, além de regular o sistema imunológico (MANTOVANI et al., 2011) (Figura 3).

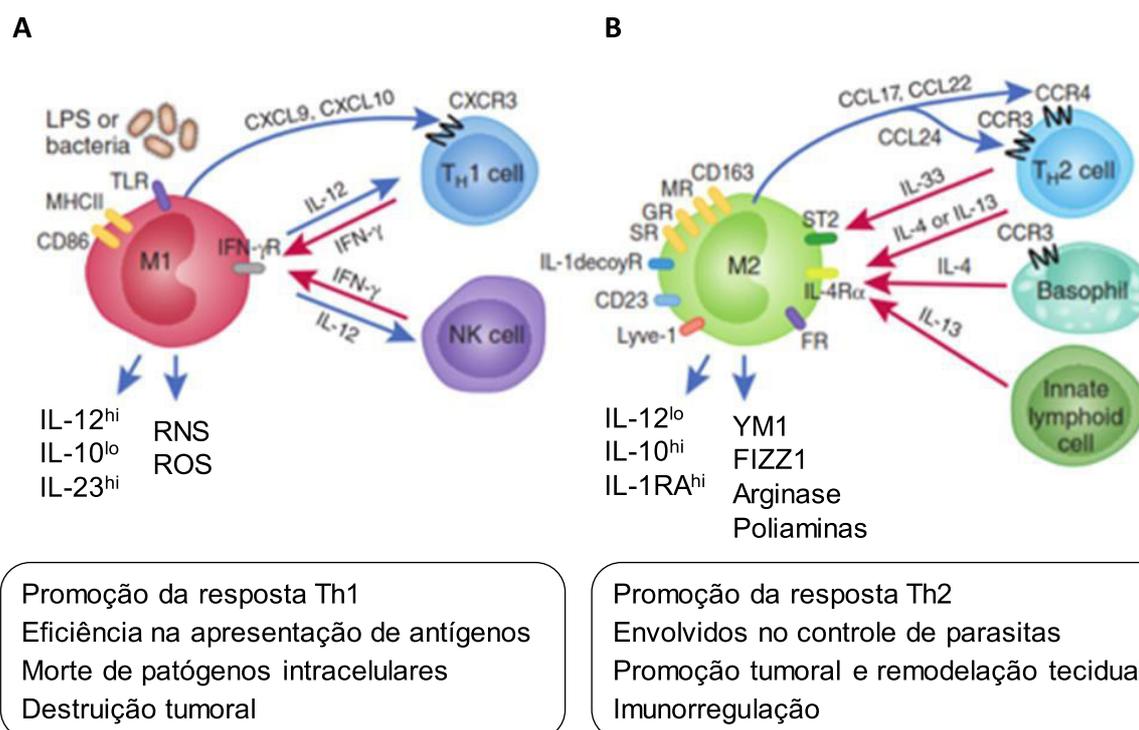


Figura 3 – Polarização de macrófagos. Macrófagos classicamente ativados (M1) e as moléculas envolvidas nesse fenótipo (A). Macrófagos alternativamente ativados (M2) e as moléculas envolvidas nesse fenótipo (B). FR, receptor de folato; IFN- γ R, receptor de IFN- γ ; IL-1decoyR, receptor decoy de IL-1; MHCII, receptor do complexo de histocompatibilidade II; GR, Receptor de galactose; MR, receptor de manose; SR, receptor *scavenger*; ST2, Receptor de PGE2; RNS, espécies reativas de nitrogênio; ROS, espécies reativas de oxigênio; CXCL, quimiocina (radical C-X-C) ligando; células NK, células assassinas naturais; TLR, receptor *toll like*; CD, *cluster* de diferenciação; CCL, quimiocinas (radical C-C) ligando; LYVE-1, receptor hialuronano endotelial vascular linfático; YM1 e FIZZ1 são marcadores de genes para macrófagos M2.

Fonte: Adaptado de BISWAS & MANTOVANI (2010).

No geral, os macrófagos associados aos tumores (TAMs) têm sido frequentemente relatados por apresentarem um fenótipo M2 e são associados com pior prognóstico (MURDOCH et al., 2008) e com uma diminuição da taxa de sobrevivência em pacientes com câncer, como no de colo uterino, mama, bexiga e melanoma (CHEN et al., 2011; ZHANG et al., 2012; PETRILLO et al., 2015). Acredita-se que muitos dos fatores produzidos por esses macrófagos agem em favor da progressão tumoral, estimulando principalmente o crescimento do tumor, angiogênese, invasão e metástase (BISWAS & MANTOVANI, 2010). Já os macrófagos M1 são descritos por suas propriedades tumorocidas e por contribuírem no aumento da sobrevivência de pacientes com câncer (LIU et al., 2015).

Entretanto, TAMs e os seus papéis na invasão tumoral e metástase têm sido discutidos em diversas revisões recentes (ONG et al., 2012; HAO et al., 2012; QUAIL & JOYCE, 2013). Autores demonstram que um aumento da densidade dos TAMs em câncer colorretal está correlacionado com um melhor prognóstico (FORSSELL et al., 2007; ZHANG et al., 2012). Pacientes com câncer de estômago também apresentaram um melhor prognóstico com um elevado número de TAMs (HAAS et al., 2009). Entretanto, os resultados sobre o câncer de próstata, pulmão e endometrial são conflitantes (SHIMURA et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2000; DAI et al., 2010). Nesse contexto, fica cada vez mais evidente que os macrófagos podem desempenhar diferentes papéis na tumorigênese, dependendo do tecido e do tipo de câncer. É interessante especular que os diferentes papéis desempenhados pelos macrófagos em vários tipos de câncer podem envolver variações no equilíbrio entre os fenótipos M1/M2, impulsionado por fatores no microambiente tumoral, além de haver variações dentro de certos tipos de câncer.

Porém, os macrófagos não são as únicas células do sistema imune inato envolvidas no contexto da resposta tumoral (MELVOLD & STICCA, 2007), células NK também são descritas por exibirem atividade citotóxica frente às células cancerígenas (VESELY et al., 2011). Essa citotoxicidade é considerada rápida, muito potente e possui múltiplas facetas. Dessa forma, a morte da célula-alvo pode ocorrer em minutos, dificultando a atuação de mecanismos de resistência. A morte celular mediada pelas células NK ocorre principalmente através da exocitose de grânulos (perforina e granzima). O outro mecanismo de morte celular mediado por células NK é através da ligação de receptores específicos presentes nas células-alvo com ligantes na superfície das células NK. Esses ligantes pertencem à superfamília do TNF e a sua ligação induz à apoptose da célula-alvo. As células NK expressam dois

membros dessa família, FasL (CD95L) e o ligante de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). Muitas células tumorais não expressam Fas (receptor que se liga à FasL), mas as células NK podem diretamente induzir a expressão de Fas em células tumorais através da secreção de TNF. A atividade citotóxica mediada por TRAIL é relativamente seletiva porque mata células tumorais humanas e não causa efeito nas células normais. Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) também pode ser um mecanismo de morte de células tumorais por células NK, em que exprimem um receptor de baixa afinidade para Fc de IgG, FcγRIII (CD16).

Além desse importante papel da imunidade inata na resposta imune contra o crescimento e o desenvolvimento tumoral, há também a grande participação da imunidade adaptativa composta pelos linfócitos B e T (DUNN, OLD, SCHREIBER, 2004). Os linfócitos T são divididos em linfócitos T CD4⁺ (auxiliares) e T CD8⁺ (citotóxicos), ambos participam da resposta imune adaptativa contra o tumor de forma distinta. Estudos têm mostrado que os linfócitos T CD4⁺ atuam auxiliando na ativação de T CD8⁺ através da liberação de citocinas e/ou na ativação de células apresentadoras de antígenos (APC) pela interação entre CD40 ligante do T CD4⁺ e CD40 da APC para apresentar antígenos para células T CD8⁺.

Os linfócitos T CD4⁺ têm efeito antitumoral por via independente a dos linfócitos T CD8⁺. Eles reconhecem antígenos apresentados por APC restritos ao MHC de classe II, atuando diretamente nas respostas Th1, ativando macrófagos a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como óxido nítrico e superóxidos. Os linfócitos T CD4⁺ e os macrófagos ativados completam a resposta antitumoral levando a ativação de linfócitos T CD8⁺, os quais poderão atuar diretamente sob as células tumorais, na tentativa de eliminá-los. Os linfócitos T CD4⁺ ativados tornam-se linfócitos de memória e podem migrar para o sítio do tumor atuando em conjunto com

linfócitos T CD8⁺ na eliminação das células tumorais, podendo amplificar a resposta imune, pela ativação de outras APCs, que por sua vez, ativam outros linfócitos T CD8⁺ (PARDOLL & TOPALIAN, 1998).

Os linfócitos T CD8⁺ são capazes de induzir morte das células tumorais por meio de lise da célula tumoral através da atuação de perforina e granzima B. Essa morte acontece quando linfócitos T CD8⁺ reconhecem diretamente antígenos associados ao tumor (TAA), os quais são apresentados por APCs via MHC de classe I. As APCs, após capturar os antígenos tumorais, migram para o linfonodo drenante e apresentam estes aos linfócitos T CD8⁺, os quais são ativados passando a linfócitos T citotóxicos. Esses migram para o local onde está alojado o tumor para desempenhar a função citolítica. Uma vez ativado, o linfócito T CD8⁺ pode produzir citocinas como IFN- γ , que ativam APCs, favorecendo o aumento e a eficácia na apresentação de antígenos a linfócitos T, induzindo uma resposta imune do tipo Th1. Os peptídeos derivados de antígenos tumorais podem ser apresentados aos linfócitos T CD8⁺ via MHC de classe I em órgãos linfoides secundários por duas vias: apresentação direta das células dendríticas que migraram, ou indiretamente após a captação e processamento de outras células contendo antígenos tumorais (como macrófagos ou neutrófilos), que serão apresentados por APCs, o que é chamado de apresentação cruzada (PARDOLL & TOPALIAN, 1998; OCHSENBEIN, 2005; POGGI & ZOCCHI, 2006).

Assim, as respostas imunes inata e adaptativa formam um sistema integrado de defesas do hospedeiro, no qual diversas células e moléculas funcionam cooperativamente na resposta ao tumor (MALE, BROSTOFF, ROTH, 2006). Entretanto, atualmente, tem sido dado enfoque ao estudo de algumas populações linfoides e mieloides que possuem um importante papel imunossupressor em diversas

patologias, incluindo o câncer. Um exemplo que pode ser citado são as células T regulatórias (Treg) que são descritas por suprimir a capacidade antitumoral das células NK e T CD8⁺ (MOUGIAKAKOS et al., 2010; ADEEGBE & NISHIKAWA, 2013).

As células Treg foram originalmente descritas por Sakaguchi et al. (1995), como células reguladoras geradas no timo que possuem um importante papel na regulação imunológica, destacando-se como um mecanismo de controle da resposta imune adaptativa e, com isso, apresentando implicações decisivas no bom funcionamento do sistema imunológico. Essas células constituem aproximadamente 5 a 15% dos linfócitos T CD4⁺ circulantes do sangue. Por definição, são caracterizadas pela expressão de CD25⁺ (cadeia do receptor de IL-2, expresso também em células T ativadas), pelo fator de transcrição FoxP3 (*forkhead box P3*) e também por níveis variados de expressão de outras moléculas de ativação, como: CD45RB^{low}, CD5^{high}, CD44^{high}, GITR^{high} e CTLA-4⁺. Os mecanismos utilizados pelas células Treg para exercerem sua função supressora são bastante complexos e ainda se encontram sob análise em estudos *in vitro*. Supõe-se que existem pelo menos quatro mecanismos envolvidos (OLEINIKA et al., 2013) (Figura 4):

- ✓ Células Treg induzem a expressão de B7-H4 por células apresentadoras de antígenos (APCs), e por sua vez induzem a paralisação do ciclo das células T;
- ✓ Linfócitos Treg adquirem uma atividade citotóxica e liberam granzimas e perforinas levando à citólise da célula-alvo;
- ✓ Células Treg induzem a produção da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) pelas células dendríticas, depletando o aminoácido essencial triptofano, que são capazes de inibir a ativação das células T;
- ✓ Por fim, através da liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF-β1).

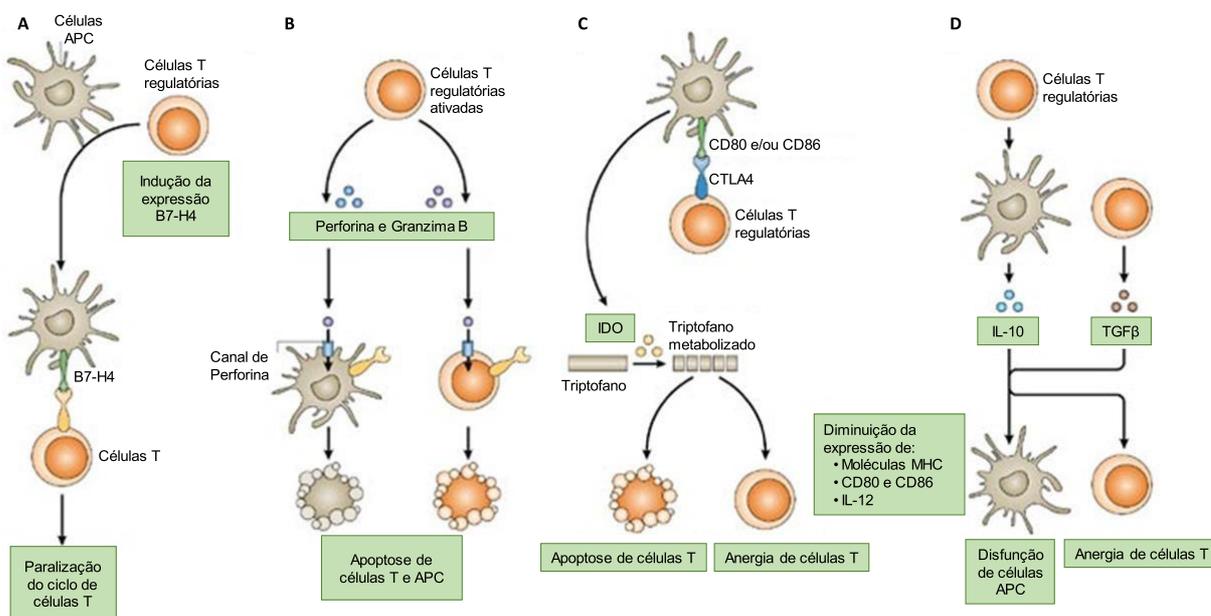


Figura 4 – Possíveis mecanismos supressores de células T regulatórias (células Treg; $CD4^+CD25^+FOXP3^+$). Células Treg induzem a expressão de B7-H4 por células apresentadoras de antígenos (APCs), e por sua vez induzem a paralisação do ciclo das células T (A). Células Treg ativadas de humanos matam diretamente células-alvo, tais como células T e APCs através de vias perforina ou granzima B-dependentes (B). Treg induz a produção da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) pelas células dendríticas, depletando o aminoácido essencial triptofano, que são capazes de inibir a ativação das células T (C). Células Treg podem secretar interleucina 10 (IL-10) e Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- β), e diretamente inibirem a ativação de células T e suprimirem a função APC, através da inibição da expressão de moléculas do MHC, CD80, CD86 e IL-12 (D) (Adaptado de ZOU, 2006).

No contexto tumoral, a presença de células Treg tem sido associada a uma resposta antitumoral deficiente por promover uma falha da co-estimulação das células T $CD4^+$ sobre as células T $CD8^+$, bem como alterar a citotoxicidade mediada por células NK contra os antígenos tumorais (PEDROZA-PACHECO, MADRIGAL, SAUDEMONT, 2013; NISHIKAWA & SAKAGUCHI, 2014; LIU et al., 2016). Uma das formas de inibição das células Treg sobre as células efetoras da imunidade tumoral é a liberação das citocinas IL-10 e TGF- β . Assim, como estratégia terapêutica para o tratamento do câncer, a inibição da função das células Treg pode ter resultados positivos.

Sendo assim, com toda essa compreensão sobre atuação do sistema imunológico no câncer, terapias inovadoras estão sendo desenvolvidas na tentativa de otimizar a resposta imunológica do paciente com câncer. Essas novas terapias são, em sua maioria, testadas em modelos experimentais utilizando tumores transmissíveis ou transplantados como por exemplo, o tumor de Ehrlich.

2.3 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906. Esse tumor transplantável pode se desenvolver tanto na forma sólida (TES), quando as células são inoculadas no tecido subcutâneo, ou na forma ascítica (TEA), quando inoculado na cavidade peritoneal (EHRlich, 1906; GUERRA, 1983; DAGLI, GUERRA, SALDIVA, 1992).

Quanto à forma ascítica do tumor de Ehrlich, o exame macroscópico revela que, após 7 dias de implantação, há presença de grande quantidade de fluido discretamente viscoso e com aspecto leitoso, decorrente de uma intensa resposta inflamatória local (FECCHIO et al., 1990). Após o décimo dia de inoculação intraperitoneal do tumor, cerca de 90% das células peritoneais são células tumorais (GUERRA, 1983; BERGAMINI-SANTOS, MARIANO, BARBUTO, 2004). Essa forma possui um crescimento rápido e agressivo, levando o animal à morte por volta do 15º dia após o inóculo das células tumorais, o que varia de acordo com a linhagem do camundongo e o número de células implantadas (NASCIMENTO et al., 2006). Por outro lado, o tumor na forma sólida, neste mesmo período de evolução, apresenta-se como uma massa palpável e de consistência firme. No exame histopatológico caracteriza-se por apresentar um parênquima indiferenciado e estroma delicado. As

células tumorais são circulares e apresentam pouco citoplasma, núcleo central redondo ou ovoide, com nucléolos e pleomorfismo celular evidentes; além disso, figuras de mitose anormais são frequentemente observadas (GUERRA, 1983).

O tumor de Ehrlich é capaz de se desenvolver em diferentes linhagens de camundongos, uma vez que não expressa moléculas de MHC de classe II e devido à sua baixa imunidade, esta neoplasia apresenta crescimento bastante agressivo, proliferação celular acelerada, invasão em tecidos adjacentes, e induz baixa resposta de linfócitos T a mitógenos e progressiva perda da atividade de células NK (BERGAMINI-SANTOS, MARIANO, BARBUTO, 2004). Além disso, severas alterações no sistema hematopoiético, tais como imunodepressão, anemia, trombocitopenia e leucocitose granulócito-dependente, são observadas no hospedeiro portador do tumor (QUEIROZ et al., 2001). Estudos apontam que a supressão da resposta imunológica do tipo celular mediada por macrófagos (FECCHIO et al., 1990; BINCOLETTO et al., 2005), linfócitos T (SEGURA, BARBERO, MÁRQUEZ, 1997, 2000) e células NK (VALADARES et al., 2006; SHEEJA & KUTTAN, 2007) é consequência inevitável da progressão tumoral. Estudos revelam vários mecanismos responsáveis pela supressão imunológica induzida por esse tipo de tumor, incluindo a regulação negativa de fatores humorais (JUSTO et al., 2003; VALADARES, KLEIN, QUEIROZ, 2004), a produção de citocinas imunossupressoras, e a indução de macrófagos (MANTOVANI et al., 1992; ELGERT, ALLEVA, MULLINS, 1998) e células T supressoras (UTSUMI et al., 1990).

No geral, esse tipo de tumor tem sido bastante empregado como um modelo experimental que auxilia na compreensão da resposta imunológica do hospedeiro com câncer, bem como na avaliação da atividade e mecanismo de ação de compostos, com perspectivas para o desenvolvimento de novos agentes

quimioterápicos. Resultados encorajadores já foram obtidos com o emprego desse tumor no estudo da atividade antitumoral e imunorreguladora de diversos compostos, incluindo o estudo com plantas medicinais (GUPTA et al., 2004; ISLAM et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

Sendo assim, considerando as inúmeras vantagens do tumor de Ehrlich (tempo curto de estudo, conhecimento prévio da quantidade e das características das células tumorais), este foi selecionado para realização dos ensaios antitumorais *in vitro* e *in vivo* desta tese.

2.4 Considerações sobre o gênero *Croton* e a espécie vegetal *Croton triquetrum* Lam.

O gênero *Croton* é o segundo maior da família Euphorbiaceae com cerca de 1.300 espécies entre árvores, arbustos, herbáceas e lianas com ampla distribuição neotropical, principalmente na América do Sul, Antilhas e México (BERRY et al., 2005). No Brasil, este gênero é representado por cerca de 350 espécies na qual, um total de 70 estão localizadas na região nordeste do país (CARNEIRO-TORRES, 2009).

Espécies vegetais pertencentes a esse gênero, são tradicionalmente utilizadas para os mais variados fins terapêuticos, incluindo, tratamento de câncer, constipação, diarreia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas, febre, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e obesidade (SALATINO, SALATINO, NEGRI, 2007). Sendo que vários desses usos já foram comprovados cientificamente como, atividades anti-inflamatória e antioxidante do *Croton celtidifolius* (NARDI et al., 2003), efeito leishmanicida,

analgésico e hipoglicemiante de *Croton cajucara* (SILVA et al., 2001; CAMPOS et al., 2002; ROSA et al., 2003), atividade antitumoral de *Croton lechleri* (ALONSO-CASTRO et al., 2012), efeitos antimicrobiano e antimalárico *Croton kongensis* (THONGTAN et al., 2003), propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória de *Croton malambo* (SUÁREZ et al., 2003), atividades anti-inflamatória, analgésica e antipirética de *Croton zambesicus* (OKOKON & NWAFOR, 2010), atividade antiulcerogênica de *Croton campestris* (JÚNIOR et al., 2013), atividade citotóxica de *Croton tiglium* (ZHANG et al., 2015) e atividade hipotensora de *Croton eluteria* (VIGOR et al., 2001).

Quanto à química, o gênero *Croton* é bastante rico em metabólitos secundários, principalmente alcaloides, flavonoides e terpenos que conferem muitas propriedades terapêuticas das espécies vegetais desse gênero (PAYO HILL et al., 2001; RANDAU et al., 2004). Além destes metabólitos, muitas das espécies de *Croton* produzem óleos essenciais ricos em mono e sesquiterpenoides, como também fenilpropanoides (PALMEIRA JR. et al., 2006).

Os terpenoides representam a classe de metabólitos secundários mais dominante no gênero *Croton*, principalmente os diterpenos com esqueletos do tipo: clerodanos (*Croton lecheri*, *Croton oblongifolius*), neoclerodanos (*Croton urucurana*, *Croton eluteria*, *Croton brasiliensis*), cembranoides (*Croton oblongifolius*), halimanos (*Croton oblongifolius*), cauranos (*Croton tonkinensis*), labdanos (*Croton oblongifolius*, *Croton zambesicus*), traquilobanos (*Croton zambesicus* e *Croton hovarum*) e sarcopetalanos (*Croton sarcopetalus*) (SALATINO, SALATINO, NEGRI, 2007). Em relação aos alcaloides, destacam-se os do tipo tetrahidroprotoberbínicos, benzilisoquinolínicos e aporfínicos (FARNSWORTH et al., 1969; SHAMMA et al., 1972; CORDELL et al., 1981). Alcaloides derivados da glutarimida, como Julocrotina, também já foram isolados das espécies, *Croton membranaceus* Mull. Arg. (ABOAGYE

et al., 2000), *Croton cuneatus* (SUÁREZ et al., 2004) e *Croton pullei* var *glabrior*. (BARBOSA et al., 2007). Sobre os flavonoides, estes são em sua maioria agliconas de flavonóis altamente metoxilados (BARRETO et al., 2013).

Todo esse conhecimento popular, farmacológico e químico produzido acerca do gênero *Croton*, permitiu que espécies vegetais, como *Croton cajucara* e *Croton zehntneri*, fossem incluídas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) por apresentarem excelente potencial de gerar produtos. No entanto, os potenciais químico e farmacológico de muitas outras espécies do gênero ainda permanecem completamente inexplorados.

Croton triqueter Lam. é uma espécie vegetal neotropical com ampla distribuição no sul dos Estados Unidos até o Uruguai (CORDEIRO, 1995). No Brasil, é encontrada nos estados do Pará, Piauí, Maranhão, Minas Gerais e São Paulo. Vulgarmente conhecida por velame, é utilizada na forma de pó como antiulcerogênica, antissifilítica, diurética, depurativa e estimulante (CORRÊA, 1984). É caracterizada por apresentar porte pequeno, folhas simples, revestidas de tricomas que apresentam a mesma abundância adaxial e abaxial, com uma estrutura de venação do tipo pinada, camptódromo, braquidódromo, células epidérmicas irregulares do tipo paracítica, mesófilo dorsiventral, cristais, células secretoras e estômatos rubiáceos. No corte transversal do mesófilo é possível observar que tanto a epiderme superior quanto a inferior são unisseriadas e tabulares, o mesófilo é do tipo dorsiventral, formado por uma camada de células ligeiramente compactas de parênquima paliádico e de 04 a 06 estratos de células de parênquima lacunoso (STARLING, 1993). São sinônimos de *Croton triqueter* Lam., *Julocroton phagedaenicus* Mart., *Julocroton triqueter* (Lam.) Baill, *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. (TROPICOS, 2014).



Figura 5 – Exemplar florido de *Croton triqueter* Lam., cultivado no Horto Berta Langes de Morretes, da Cidade Universitária Dom Delgado – UFMA.
Fonte: SERRA (2006).

Croton triqueter Lam. tem sido objeto de estudos do Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão, os quais têm explicado alguns dos seus usos na medicina popular. Bezerra et al. (2006) demonstraram potente ação leishmanicida (*Leishmania amazonensis*) do extrato hidroalcoólico das folhas com CI_{50} de 29,5 $\mu\text{g/mL}$. Pires (2012) comprovou que a fração alcaloídica terciária (FAL) obtida a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Julocroton triqueter* também é capaz de induzir morte das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (CI_{50} 6,5 $\mu\text{g/mL}$), além de reduzir o número de amastigotas internalizadas nos macrófagos. Nos testes *in vivo*, observou-se que a FAL foi capaz de reduzir a carga parasitária na lesão dos camundongos infectados no coxim plantar com *Leishmania amazonensis*, porém não foi capaz de reduzir o número de parasitos no baço.

Serra (2006) demonstrou atividade analgésica do extrato etanólico das folhas de *Croton triqueter* Lam. Esses resultados indicaram que essa espécie vegetal

apresenta atividade antinociceptiva, uma vez que foi capaz de reduzir a dor no modelo químico de nocicepção de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Além disso, esse mesmo extrato apresentou atividade anti-inflamatória, o que pôde ser evidenciado pela redução da migração leucocitária para o sítio inflamatório no modelo de peritonite e ainda foi capaz de inibir o edema de pata induzido por carragenina. Como já se tem bem estabelecido na literatura que processo inflamatório crônico contribui para carcinogênese em diferentes tipos de tumores (LIU et al., 2015) e que compostos que exibem propriedades anti-inflamatórias podem, também, apresentar atividade antitumoral, Serra (2009) decidiu avaliar a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do EEJ, na qual este foi capaz de reduzir *in vitro* a viabilidade das células do tumor de Ehrlich, e nos ensaios *in vivo* o EEJ reduziu o volume da ascite, o número de células tumorais totais e proporcionou um aumento no tempo médio de sobrevivência dos camundongos portadores de tumor. Esses dados vistos em conjunto demonstram uma forte associação entre o efeito anti-inflamatório e antitumoral.

Lima et al. (2009) identificaram monoterpenos e sesquiterpenos (óxido cariofileno, epóxido humuleno, trans-cariofileno, α -humuleno) dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Julocroton triqueter*. Esses resultados são importantes do ponto de vista farmacológico, uma vez que α -humuleno e cariofileno são substâncias anti-inflamatórias (FERNANDES et al., 2007).

Moreira et al. (2013) demonstraram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Julocroton triqueter* não possui efeitos genotóxicos *in vitro* e *in vivo*. Esses resultados sugeriram que esse extrato não causa danos no DNA nas concentrações e doses utilizadas normalmente para o tratamento da leishmaniose, no entanto, houve uma diminuição significativa na morte celular por apoptose e aumentou na morte celular induzida por necrose. Neste trabalho, ainda, detectou-se a presença

abundante de triterpenos, saponinas, taninos hidrolisáveis e alcaloides, níveis moderados de cumarinas e pequenas quantidades de flavanonas e flavonoides e resinas, dados que corroboram com os resultados encontrados por Facundo (2003) e Serra (2006).

Para além da avaliação da eficácia terapêutica foi investigada a segurança e verificou-se que no teste de toxicidade aguda o EEJ (ip.) provocou o óbito dos animais tratados nas maiores doses (1500 e 2500 mg/kg) por paralisia do trem posterior na primeira hora de observação, indicando DL_{50} para essa via de administração de 860 mg/kg para ambos os sexos e nos animais sobreviventes foram observados aumento na concentração de fosfatase alcalina, ureia e creatinina, indicando efeitos metabólicos significativos deste extrato quando administrados por essa via. Além disso, a análise histopatológica revelou algumas anormalidades em órgãos vitais. Portanto, estes resultados indicaram que o EEJ tem impactos negativos quando utilizado por via intraperitoneal (SERRA, 2009).

Dentre os animais tratados por via oral nas doses de 500, 1000, 2000, 3000 e 5000 mg/kg não apresentaram de imediato nem durante o período de observação (14 dias) alterações clínicas. Não houve óbitos no período do experimento nem alterações anatomopatológicas foram observadas nos órgãos avaliados. Além do mais, as diferenças entre os sexos não influenciaram o resultado da toxicidade, sugerindo que por essa via de administração o EEJ apresenta baixa ou nenhuma toxicidade aguda (SERRA, 2009).



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos na atividade antitumoral da espécie vegetal espécie vegetal *Croton triqueter* Lam.

3.2 Específicos

- ✓ Investigar o potencial citotóxico *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Croton triqueter* Lam. (EEJ) sobre células do tumor de Ehrlich e macrófagos RAW 264.7;
- ✓ Acompanhar a sobrevida e o desenvolvimento tumoral de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com o EEJ por via oral;
- ✓ Avaliar os parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss* portadores ou não do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com o EEJ por via oral;
- ✓ Investigar o efeito do tratamento oral do EEJ sobre a celularidade dos órgãos linfoides de camundongos *Swiss* portadores ou não do tumor ascítico de Ehrlich;
- ✓ Avaliar o perfil imunofenotípico das células esplênicas de camundongos *Swiss* inoculados com tumor de Ehrlich e tratados por via oral com o EEJ;
- ✓ Avaliar o perfil de citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α) na ascite e no soro de camundongos *Swiss* portadores ou não do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com o EEJ por via oral;
- ✓ Avaliar a quantificação da liberação *ex vivo* de óxido nítrico (NO);
- ✓ Investigar o efeito do EEJ sobre a ativação de macrófagos murinos RAW;
- ✓ Investigar o efeito do EEJ sobre a polarização de macrófagos RAW 264.7.



Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *Croton triqueter* Lam. foram coletadas de exemplar cultivado no Horto Berta Langes de Morretes, da Cidade Universitária Dom Delgado, da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), no *Campus* do Bacanga, no município de São Luís, MA, Brasil (2° 33' 13"S e 44° 18' 19"O), no mês fevereiro de 2014; estação chuvosa. O material botânico foi identificado pelo Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Júnior da UFMA, sendo uma exsicata depositada no Herbário MAR sob o registro nº. 8675.

4.2 Processamento do material vegetal e Preparação do extrato etanólico

As folhas de *Croton triqueter* Lam. (400 g) foram secas em estufa com circulação de ar à temperatura média de 35°C durante 96 horas. Após a secagem e completa estabilização, o material foi pulverizado em moinho tipo facas, obtendo-se o material vegetal seco e pulverizado das folhas (248,8 g) que foi submetido ao processo extrativo por maceração utilizando etanol P.A., empregando as relações de hidromódulo (droga/solvente) 1:2 por 10 dias. Ao final do processo, o macerado foi filtrado, concentrado em rotoevaporador à pressão reduzida e liofilizado, obtendo-se o extrato etanólico das folhas de *Croton triqueter* Lam. (EEJ). O EEJ Foi acondicionado em frasco âmbar e conservado sob refrigeração. Posteriormente foi avaliado utilizando-se métodos qualitativos e semi quantitativos que detectaram a

presença de saponinas, alcaloides, flavanonas, flavanonóis, taninos hidrolisáveis, triterpenos e cumarinas (MOREIRA, 2013).

4.3 Manutenção do tumor de Ehrlich

A manutenção do tumor de Ehrlich é realizada no Laboratório de Imunofisiologia do Departamento de Patologia da UFMA, por meio de transplantes intraperitoneais (ip.) semanais das células neoplásicas (2×10^6 /animal) em camundongos *Swiss* sadios (BALA et al., 2010). Para obtenção das células neoplásicas, camundongos com aproximadamente sete dias de evolução do tumor ascítico de Ehrlich foram eutanasiados com uma sobredose de anestésico (solução 2:1, Ketamina 10% e Cloridrato de Xilasina 2%, IM). Após a assepsia com álcool 70% e excisão da parede abdominal, o fluido ascítico foi puncionado da cavidade peritoneal e ressuspenso em solução tamponada de fosfato (PBS, pH 7,2). Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada (1200 rpm a 4°C, 10 minutos). Ao término da centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 5 mL de PBS. Para a determinação da concentração de células tumorais presentes nessa suspensão uma alíquota foi diluída, sendo realizada a contagem de células na câmara de Neubauer, e a viabilidade celular determinada pelo teste de exclusão com azul de Trypan. Em todos os protocolos foram empregadas somente as suspensões que apresentaram viabilidade superior a 95%.

4.4 Manutenção das células RAW 264.7

As células RAW 264.7 foram expandidas em frascos de cultura de 25 cm² (Thermo Fisher Scientific) em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma), 23 mM de L-asparagina (Sigma), 0,1 mM de ácido pirúvico (Sigma), 1 mM de ácido fólico (Sigma), 1% de estreptomicina (100 µg/mL, Merck), penicilina G (100 U/mL, Sigma) e 10% de soro fetal bovino (Sigma), a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Após formação de monocamada, ou seja, após as mesmas atingirem confluência, o meio RPMI das garrafas foi descartado, sendo os frascos lavados duas vezes com 10 mL de PBS estéril, a fim de evitar que células mortas fossem plaqueadas. Em seguida foram adicionados 2 mL de meio RPMI completo e as células que permaneceram na superfície do frasco foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico (Cell Scraper, Corning Glass Workers, New York, USA). O meio contendo as células foi retirado e pipetado em um falcon de 15 mL contendo previamente 1 mL de meio RPMI completo. Este foi centrifugado em 1200 rpm a 4°C, 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e 5 mL de meio RPMI completo foram adicionados ao tubo falcon.

A contagem global de células foi efetuada na câmara de Neubauer em solução de azul de Trypan para avaliação da viabilidade celular. Em todos os protocolos foram empregadas somente as suspensões que apresentaram viabilidade superior a 95%.

4.5 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

4.5.1 Tumor de Ehrlich

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o ensaio colorimétrico baseado no sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) (MOSMANN, 1983). O princípio deste método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Para isso, a ascite tumoral coletada foi diluída em PBS e centrifugada (1200 rpm a 4°C, 10 minutos). Ao término da centrifugação o sobrenadante foi descartado e o botão celular foi homogeneizado em 5 mL de meio RPMI completo. Após a avaliação da viabilidade celular, as células tumorais foram cultivadas em meio RPMI completo em placas de 96 poços e fundo chato, a uma concentração de 2×10^6 /mL e tratadas com diferentes concentrações do EEJ (62,5, 125, 250 e 500 µg/mL). Vinte e quatro horas mais tarde foram adicionados aos poços de cultivo celular, 10 µL de MTT na concentração de 5 mg/mL, e após 3 h de incubação com o MTT foram acrescentados 100 µL SDS a 20% diluído em HCL/0,01N. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular, e esta foi calculada a partir da seguinte fórmula: [% Viabilidade = (Absorbância do Tratamento/Absorbância do controle negativo) × 100] (PORTO, 2012). Todos os dados obtidos foram comparados com o grupo controle negativo constituído apenas de meio e células tumorais.

4.5.2 Macrófagos RAW 264.7

As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços e fundo chato a uma concentração de 2×10^6 /animal e incubadas 24 horas em meio RPMI a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após esse período inicial de incubação, as células aderentes foram tratadas com diferentes concentrações do EEJ (62,5, 125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$). Vinte e quatro horas mais tarde foram adicionados aos poços de cultivo celular, 10 μL de MTT na concentração de 5 mg/mL , e após 3 h de incubação com o MTT foram acrescentados 100 μL SDS a 20% diluído em HCL/0,01N. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular, e esta foi calculada a partir da seguinte fórmula: % Viabilidade = (Absorbância do Tratamento/Absorbância do controle negativo) \times 100. Todos os dados obtidos foram comparados com o grupo controle negativo constituído apenas de meio RPMI completo e macrófagos.

4.6 Avaliação da atividade antitumoral do EEJ *in vivo*

4.6.1 Animais

Camundongos *Swiss*, adultos (\pm 60 dias, 30 ± 5 g), machos provenientes do Biotério Central da UFMA foram agrupados em gaiolas de poliacrílico (38 x 23 x 10 cm, 05 animais/gaiola) e mantidos em condições padrão de laboratório ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 horas). Eles tiveram livre acesso ao padrão de dieta *pellet* seco e água *ad libitum*. Os camundongos foram aclimatizados às condições

laboratoriais durante 07 dias antes do início dos experimentos. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão (CEUA/UFMA nº 012975/2008-43).

4.6.2 Delineamento experimental

Os animais foram separados em 12 grupos (n=5/grupo), conforme descrito na Figura 6.

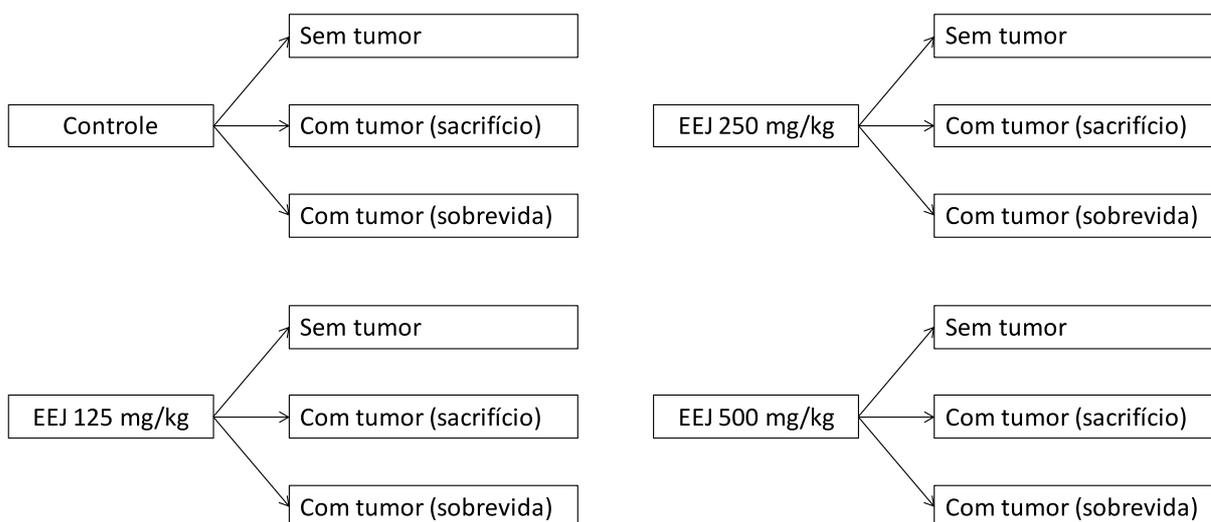


Figura 6 – Divisão dos grupos experimentais.

Para avaliação da atividade antitumoral, os animais foram inoculados com 2×10^6 /animal, ip., de células do tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, por via oral (v.o.) nos dias 3, 5, 7 e 9 após inóculo do tumor. O grupo controle recebeu 0,2 mL de PBS, v.o. (Figura 7). O efeito do EEJ sobre o desenvolvimento tumoral foi avaliado dez dias após o inóculo das células tumorais, quando os animais foram eutanasiados com uma sobredose de anestésico (solução 2:1, Ketamina 10% e Cloridrato de Xilasina 20%, IM). A ascite tumoral foi colhida e o volume quantificado. Uma alíquota do líquido ascítico foi retirada e após diluição em

PBS e azul de Trypan foi feita a quantificação do número de células tumorais (SERRA, 2009).



Figura 7 – Protocolo de tratamento no modelo do Tumor de Ehrlich.

A outra metade dos animais inoculados com tumor foi mantida viva, com comida e água *ad libitum*, para avaliação da sobrevivência. O efeito do EEJ sobre a sobrevivência de animais portadores do tumor de Ehrlich foi avaliado com base na mediana do tempo de sobrevivência (MST) e aumento da expectativa de vida (% ILS). A MST e ILS (%) foram calculadas a partir dos dados da mortalidade no período de observação. O aumento da expectativa de vida foi calculado usando-se a equação: $ILS\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) - 1 \times 100$ (GUPTA et al., 2004). Os animais não inoculados com o tumor de Ehrlich obedeceram ao mesmo esquema terapêutico.

4.6.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Para determinar os parâmetros hematológicos, 100 μL de sangue foram recolhidos pelo plexo orbital no décimo dia após inóculo do tumor. O sangue foi armazenado em tubos de 1,5 mL contendo como anticoagulante o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As análises foram realizadas utilizando-se analisador hematológico automático (Poch-100iV Diff, Sysmex Corp). Foram

avaliados os seguintes parâmetros: número de plaquetas, leucócitos e hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através de esfregaço sanguíneo, corado com o kit panótico rápido (Laborclin), analisado em microscópio óptico comum (Olympus CX40) sob aumento de 1.000X.

4.6.4 Obtenção e quantificação das células dos órgãos linfoides

Após a eutanásia, fêmur, baço e três linfonodos mesentéricos foram retirados. O fêmur foi perfundido com 1 mL de PBS para obtenção de células da medula óssea. O baço foi triturado com 5 mL de PBS com auxílio de tamis. Os linfonodos mesentéricos foram triturados com 1 mL de PBS. Nove partes da suspensão celular foram adicionadas a uma parte de solução de cristal violeta (0,05% dissolvido em ácido acético a 30%). As células foram contadas utilizando-se câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico comum (Olympus CX40) sob aumento de 400X. Após a contagem e ajuste das células do baço, uma parte da suspensão celular foi submetida à cultura para avaliação da produção de NO e outra parte foi utilizada para realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

4.6.5 Determinação da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi determinada *ex vivo* a partir da medida de nitritos nos sobrenadantes da cultura de células do baço estimuladas ou não com

células do tumor de Ehrlich, segundo ensaio descrito por Ding, Nathan, Stuehr (1988). Alíquotas de 100 μL da suspensão de células do baço, na concentração de $2 \times 10^6/\text{animal}$ de meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado como descrito anteriormente, foram transferidas para placa de 96 poços de fundo chato em quadruplicata e em dois poços de cada quadruplicata foram adicionadas células tumorais na proporção 1:10, como estímulo *in vitro*. As células foram cultivadas em placas por 48 h, a 37°C , em estufa contendo 5% de CO_2 . Ao final desse período foram transferidos 50 μL dos sobrenadantes para outra placa aos quais foram adicionados 50 μL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida/0,1% de dihidrocloreto de naftileno/2,5% de ácido orto-fosfórico), à temperatura ambiente, por 10 min. A absorbância foi determinada em um espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384), com filtro de 540 nm, com branco constituído por meio RPMI mais reagente de Griess. Os resultados obtidos em densidade óptica foram transformados em μM de NO_2^- , mediante equação de regressão linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (5, 10, 30 e 60 μM de NO_2^-).

4.6.6 Quantificação de citocinas e quimiocinas pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA)

Para a quantificação das citocinas IL-6, IL-10, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-12 e da quimiocina MCP-1 foi utilizada a técnica de CBA, ensaio citométrico de esferas ordenadas. Todos os reagentes utilizados foram provenientes do Kit *mouse inflammation cytokine Kit* (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA).

A ascite e o soro foram centrifugados à 1500 rcf por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitação de debris. Em cada poço da placa de 96 poços, fundo U, foram adicionados 25 µL da amostra padrão fornecida pelo fabricante ou das amostras a serem testadas. Em seguida receberam 25 µL de cada reagente “*cytokine beads*” para marcar a produção de cada citocina e 25 µL de anticorpo conjugado ao fluorocromo PE. Os poços foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 3 horas protegidos da luz. Após o período de incubação, as amostras foram ressuspensas com 300 µL de solução tampão. A placa foi centrifugada por 10 minutos à 453 rcf e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram, então, ressuspensas em 150 µL de tampão de lavagem para leitura por citometria de fluxo utilizando-se o aparelho FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

4.6.7 Características fenotípicas de células do baço por citometria de fluxo

Para avaliação fenotípica, as células do baço (1×10^6 /mL) foram ressuspensas em 100 µL de PBS e transferidas para uma placa de fundo redondo, marcadas com os anticorpos específicos e incubadas a 4°C por 15 minutos. Foram montados 4 painéis de marcação com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 e anti-Ly6C, conjugados com FITC; anti-CD28, anti-IA-IE e anti-CD49b, conjugados com PE, e anti-CD4, anti-CD8 e anti-NK1.1 conjugados com PerCP; anti-CD86 conjugado com PE-Cy7 (BD Biosciences-

Pharmingen) (Quadro 1). Para calibração do citômetro, foi realizado um “pool” de células, que foram utilizadas no controle branco (sem anticorpo conjugado) e três controles positivos 1, 2 e 3 (marcados com um anticorpo conjugado com fluorocromo da molécula mais expressa para seu canal correspondente). As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) e os dados analisados com o programa FlowJo-vX (TreeStar).

Quadro 1. Painéis para marcação das células do baço.

Fluorocromo	Painel 1	Painel 2	Painel 3	Painel 4
FITC	CD3	CD3	Ly6C	CD3
PE	CD28	CD28	IA-IE	CD49b
PerCP	CD4	CD8	-	NK1.1
PE-Cy7	-	-	CD86	-

A estratégia de análise da imunofenotipagem das células do baço para cada painel se deu da seguinte maneira: inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos linfócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) *versus* complexidade (FSC). Em seguida, para análise dos linfócitos T selecionou-se a região positiva para CD3 nos parâmetros FSC *versus* CD3 (canal 1). Subsequentemente, os linfócitos T foram subdivididos em populações majoritárias, selecionando os parâmetros e as regiões positivas em FSC *versus* CD4 (canal 3) para linfócitos T auxiliares (CD3⁺/CD4⁺) e FSC *versus* CD8 (canal 3) para linfócitos T citotóxicos (CD3⁺/CD8⁺). Para avaliação dos linfócitos T auxiliares (CD3⁺/CD4⁺/CD28⁺) e citotóxicos (CD3⁺/CD4⁺/CD28⁺) ativados foi selecionada a região positiva para o CD28 nos parâmetros FSC *versus* CD28⁺ (Figura 8). Em cada população de linfócitos o valor relativo, absoluto (referente ao número total de células do baço) e a média da intensidade de fluorescência da expressão dos marcadores específicos foram definidos.

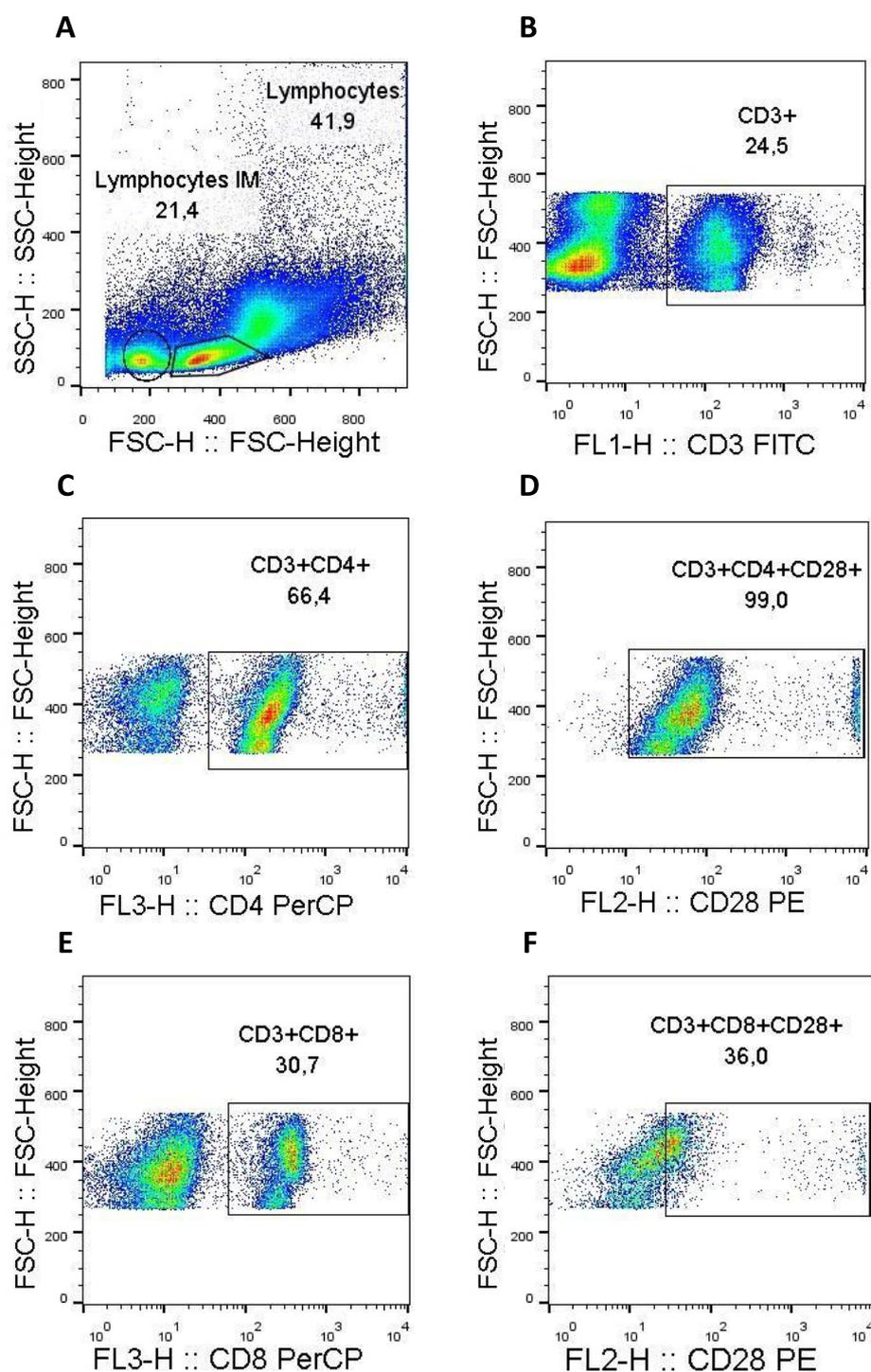


Figura 8 – Estratégia de análise para identificação dos linfócitos T. As células do baço foram obtidas de camundongos *Swiss*. As células foram marcadas com anticorpos específicos para linfócitos T e suas subpopulações. Inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos linfócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC) (A). Em seguida, para análise dos linfócitos T selecionou-se a região positiva para CD3 nos parâmetros FSC *versus* CD3 (B). Subsequentemente, os linfócitos T foram subdivididos em populações majoritárias, selecionando os parâmetros e as regiões positivas em FSC *versus* CD4 (C) para linfócitos T auxiliares (CD3⁺/CD4⁺) e FSC *versus* CD8 (E) para linfócitos T citotóxicos (CD3⁺/CD8⁺). Para avaliação dos linfócitos T auxiliares (CD3⁺/CD4⁺/CD28⁺) e citotóxicos (CD3⁺/CD4⁺/CD28⁺) ativados foi selecionada a região positiva para o CD28 nos parâmetros FSC *versus* CD28⁺ (D/F). Em cada população de linfócitos o valor relativo, absoluto (referente ao número total de células do baço) e a média da intensidade de fluorescência da expressão dos marcadores específicos foram definidos.

Para análise dos macrófagos, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse no gráfico baseado em SSC *versus* FSC, em seguida selecionou-se a região positiva nos parâmetros FSC *versus* IA-IE (canal 2). Posteriormente, foi selecionado os parâmetros FSC *versus* Ly6C (canal 1). Subsequentemente foram analisados os parâmetros FSC *versus* CD86 (canal 3) (Figura 9). Na população de macrófagos o valor relativo, absoluto (referente ao número total de células do baço) e a média da intensidade de fluorescência da expressão dos marcadores específicos foram definidos.

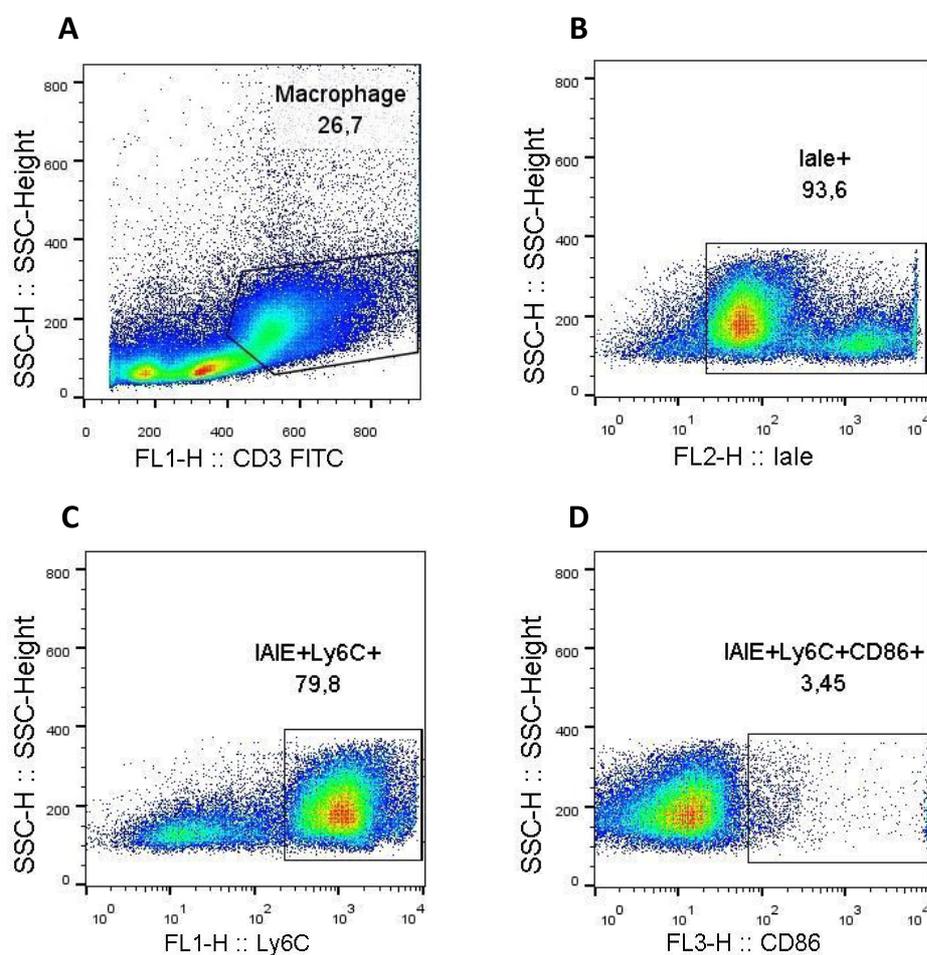


Figura 9 – Estratégia de análise para identificação dos macrófagos do baço de camundongos. As células do baço foram obtidas de camundongos *Swiss*. As células foram marcadas com anticorpos específicos para células apresentadoras de antígenos. Para análise dos macrófagos, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse no gráfico baseado em granulocidade (SSC) *versus* tamanho (FSC) (A), em seguida selecionou-se a região positiva nos parâmetros FSC *versus* IA-IE (B). Posteriormente, foi selecionado os parâmetros FSC *versus* Ly6C (C). Subsequentemente foram analisados os parâmetros FSC *versus* CD86 (D). Na população de macrófagos o valor relativo, absoluto (referente ao número total de células do baço) e a média da intensidade de fluorescência da expressão dos marcadores específicos foram definidos.

Para análise das células NK e NKT, foi feita a seleção da região negativa e positiva para CD3⁺, respectivamente no histograma baseado em CD3 (canal 1) nos parâmetros morfológicos iniciais (SSC *versus* FSC). Seguindo a análise para as células positivas para CD49b e NK1.1. Onde as células NK são as células CD3⁻CD49b⁺NK1.1⁺ e as células NKT as células CD3⁺CD49b⁺NK1.1⁺ (Figuras 10 e 11). Nas populações de células NK e NKT o valor relativo, absoluto (referente ao número total de células do baço) e a média da intensidade de fluorescência da expressão dos marcadores específicos foram definidos.

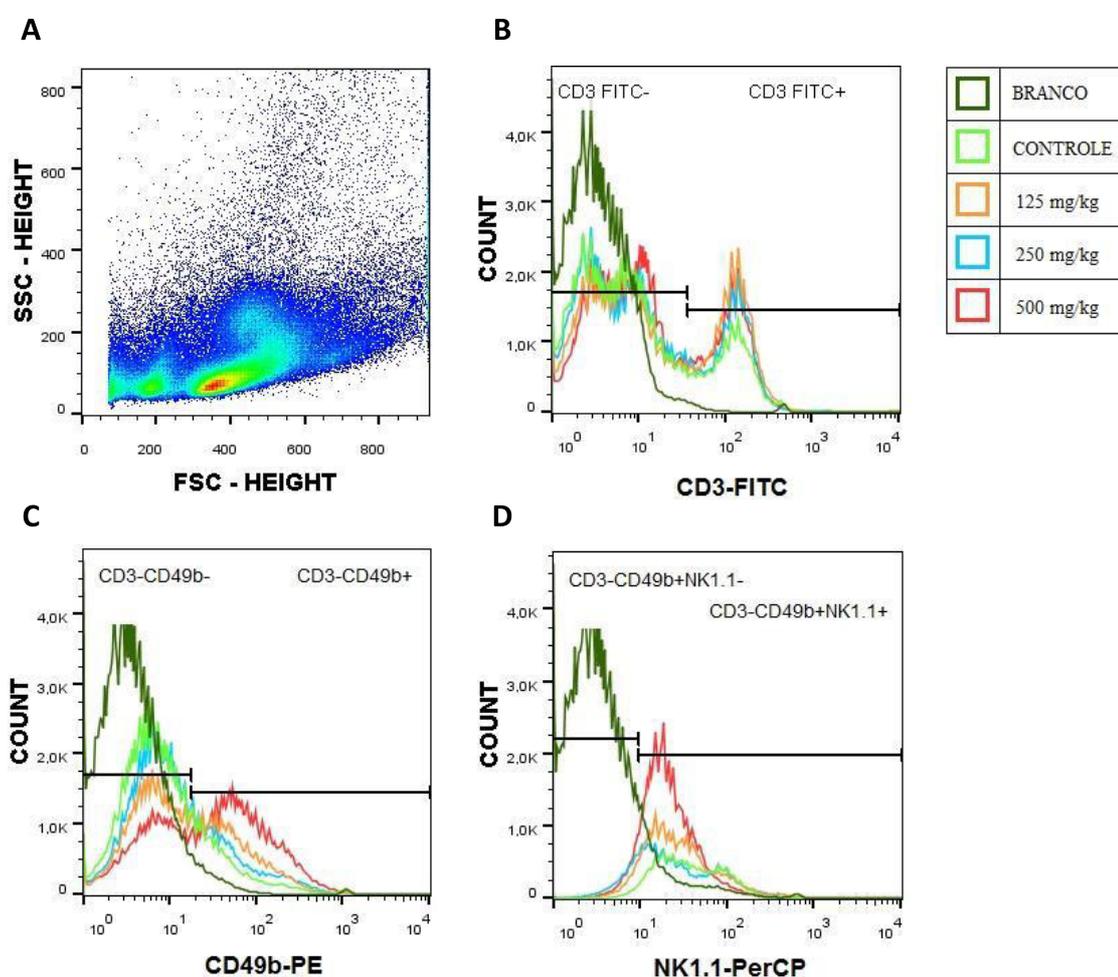


Figura 10 – Estratégia de análise para identificação de células NK do baço de camundongos. As células do baço foram obtidas de camundongos *Swiss*. As células foram marcadas com anticorpos específicos para células NK. Para análise das células NK foi feita a seleção da região negativa para CD3 no histograma baseado em CD3 (canal 1) (B), de acordo com os parâmetros morfológicos iniciais (SSC *versus* FSC) (A). Em seguida, foi feita a análise para as células positivas para CD49b (C) e NK1.1 (D). Na população de células NK os valores relativo e absoluto (referentes ao número total de células do baço) e a média da intensidade de fluorescência da expressão dos marcadores específicos foram definidos.

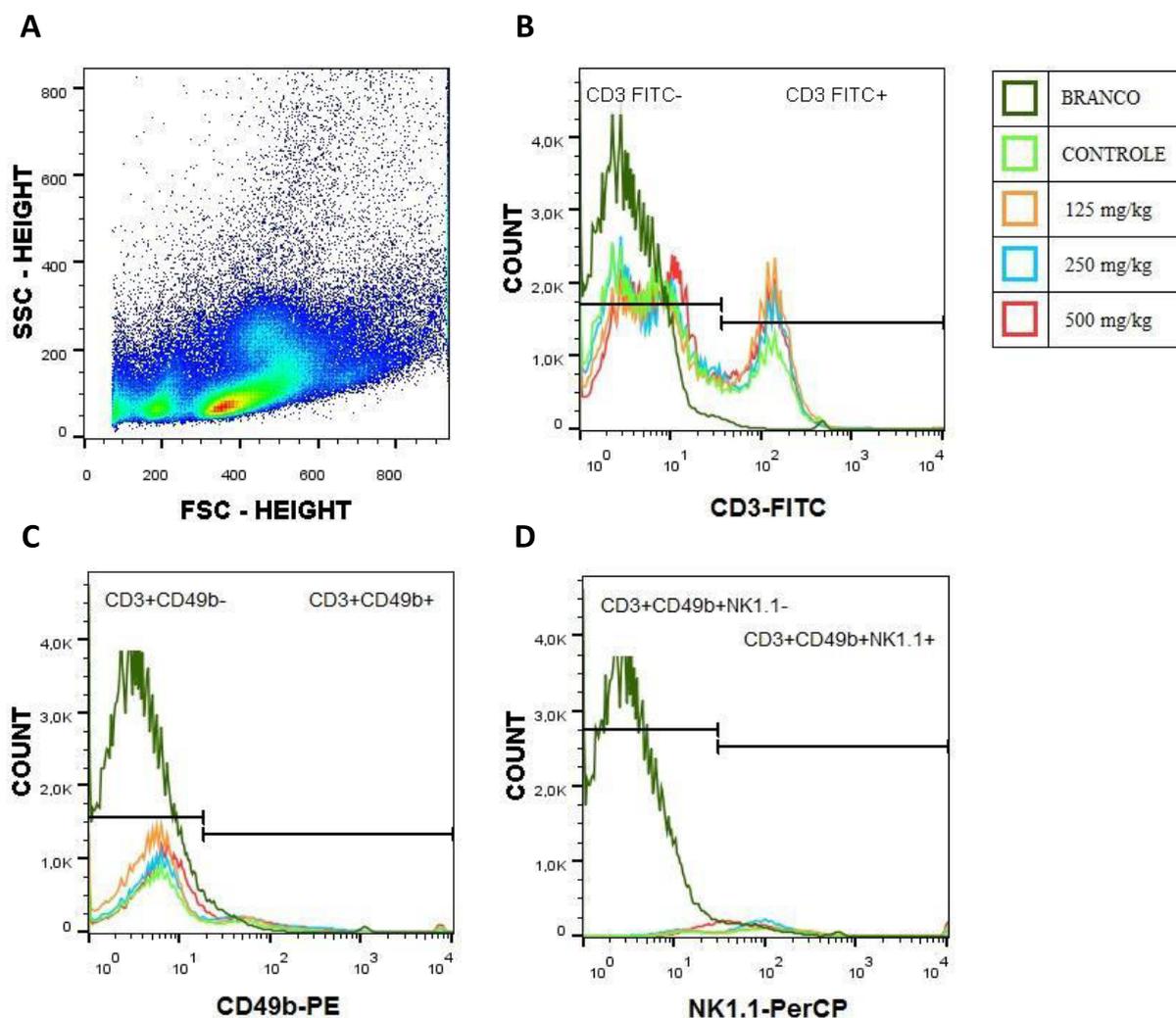


Figura 11 – Estratégia de análise para identificação de células NKT do baço de camundongos. As células do baço foram obtidas de camundongos *Swiss*. As células foram marcadas com anticorpos específicos para células. Para análise das células NKT foi feita a seleção da região positiva para CD⁺ no histograma baseado em CD3 (B), de acordo com os parâmetros morfológicos iniciais (SSC versus FSC) (A). Em seguida, foi feita a análise para as células positivas para CD49b (C) e NK1.1 (D). Na população de células NKT os valores relativos e absoluto (referente ao número total de células do baço) e a média da intensidade de fluorescência da expressão dos marcadores específicos foram definidos.

4.7 Efeito do EEJ em macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS

4.7.1 Plaqueamento e tratamento

Células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 48 poços a uma concentração de 1×10^6 /mL e incubadas 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado como descrito anteriormente, em quadruplicata. Após esse período de incubação, as células aderentes foram tratadas ou não com diferentes concentrações do EEJ (125, 250 e 500 µg/mL) e em dois poços da quadruplicata foi adicionado LPS de *Salmonella typhosa* (67H4045 Sigma®) a uma concentração de 10 µg/mL como estímulo *in vitro*.

4.7.2 Quantificação de NO, citocinas e quimiocinas do sobrenadante de cultura células RAW pelo método CBA

Após 48 horas do tratamento, os sobrenadantes foram coletados para a determinação de NO, citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12) e da quimiocina MCP-1. Para determinação do NO, citocinas e quimiocinas, foram seguidos os protocolos já descritos nos itens 4.6.5 e 4.6.6, respectivamente.

4.7.3 Características fenotípicas de células de cultura RAW 264.7

Para determinação do perfil fenotípico das células cultivadas no item 4.7.1, as células foram removidas das placas de cultura através da incubação com a solução de PBS com 10 mM de EDTA por 10 minutos a 4°C. Após esse período, as células

foram lavadas com PBS e transferidas para uma placa de fundo redondo, marcadas com os anticorpos específicos e incubadas a 4°C por 15 minutos. Foi montado um painel de marcação com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD14 conjugado com FITC; anti-IA-IE, conjugado com PE e anti-CD86 conjugado com PE-Cy7 (BD Biosciences-Pharmingen). Para calibração do citômetro, foi realizado um pool de células, que foram utilizadas no controle branco (sem anticorpo conjugado) e três controles positivos 1, 2 e 3 (marcados com um anticorpo conjugado com fluorocromo da molécula mais expressa para seu canal correspondente). As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) e os dados analisados com o programa FlowJo-vX (TreeStar).

A estratégia de análise da imunofenotipagem se deu da seguinte maneira: inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse no gráfico baseado em SSC *versus* FSC. Em seguida, foi feita a análise simples dos marcadores CD14, IA-IE e CD86, selecionando-se a região positiva no histograma para o CD14 (canal 1), FSC *versus* IA-IE (canal 2) e FSC *versus* CD86 (canal 3), respectivamente (Figura 12). Nas regiões positivas de cada marcador o valor relativo e a média da intensidade de fluorescência foram definidos.

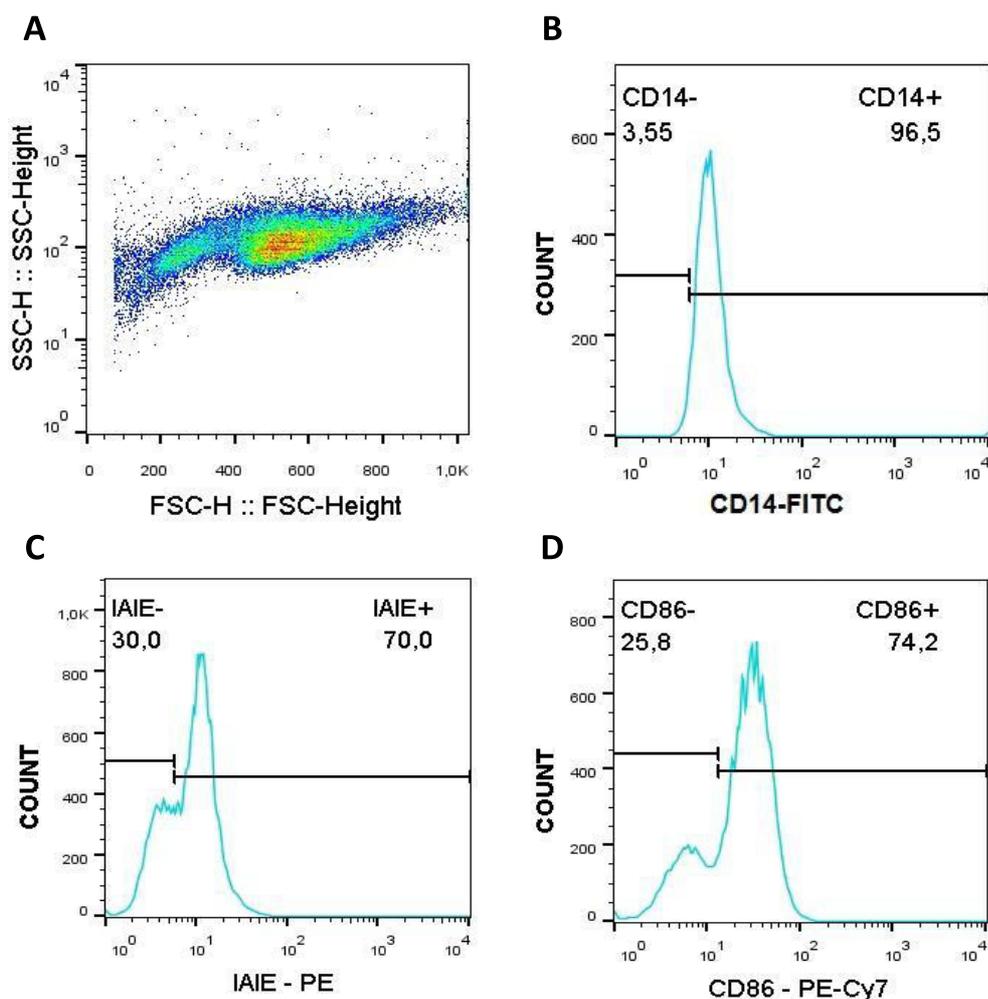


Figura 12 – Estratégia de análise para identificação dos macrófagos RAW 264.7. As células foram cultivadas em placas de 48 poços a uma concentração de $5 \times 10^5/500 \mu\text{L}$, em quadruplicada, e incubadas 48h a 37°C e 5% de CO_2 na presença ou ausência do EEJ (62,5, 125, 250 e $500 \mu\text{g/mL}$) e em dois poços da duplicata foi adicionado LPS ($10 \mu\text{g/mL}$). As células foram marcadas com anticorpos específicos para macrófagos. Para análise dos macrófagos, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse no gráfico baseado em SSC versus FSC (A). Em seguida, foi feita a análise simples dos marcadores CD14, IA-IE e CD86, selecionando-se a região positiva no histograma para o CD14 (canal 1) (B), FSC versus IA-IE (canal 2) (C) e FSC versus CD86 (canal 3) (D), respectivamente. Nas regiões positivas de cada marcador o valor relativo e a média da intensidade de fluorescência foram definidos.

4.8 Efeito do EEJ sobre a polarização de macrófagos RAW 264.7

As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 48 poços e fundo chato a uma concentração de $5 \times 10^5/500 \mu\text{L}$ e incubadas 24 horas em meio RPMI a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após esse período inicial de incubação, induziu-se a polarização dos macrófagos da seguinte forma: Para macrófagos M1

foram utilizados LPS (200 ng/mL) (Sigma) e IFN- γ (10 ng/mL) (Preprotec) e para macrófagos M2 foram utilizadas as citocinas IL-4 (40 ng/mL) (Preprotec) e IL-13 (20 ng/mL) (Preprotec). Como controle, os macrófagos foram cultivados em meio RPMI completo para manter estado de M0. Logo em seguida, as células foram tratadas com o EEJ (500 μ g/mL). Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado para a determinação de NO e uma alíquota foi armazenada em freezer (-80°C) para posterior dosagem de citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12) e da quimiocina MCP-1.

Para determinação das características fenotípicas desses macrófagos após tratamento com o EEJ, as células foram removidas do fundo do poço das placas de cultura através da incubação com a solução de PBS com 10 mM de EDTA por 10 minutos a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e transferidas para uma placa de fundo redondo, marcadas com os anticorpos específicos e incubadas a 4°C por 15 minutos. Foi montado um painel de marcação com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-IA-IE, conjugado com PE e anti-CD86 conjugado com PE-Cy7 (BD Biosciences-Pharmingen). Para calibração do citômetro, foi realizado um pool de células, que foram utilizadas no controle branco (sem anticorpo conjugado) e dois controles positivos 2 e 3 (marcados com um anticorpo conjugado com fluorocromo da molécula mais expressa para seu canal correspondente). As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) e os dados analisados com o programa FlowJo-vX (TreeStar).

A estratégia de análise da imunofenotipagem se deu da seguinte maneira. Inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse no gráfico baseado em SSC *versus* FSC. Em seguida, foi feita a análise simples dos marcadores IA-IE e CD86, selecionando-se a região positiva nos parâmetros FSC *versus* IA-IE

(canal 2) e FSC versus CD86 (canal 3), respectivamente (Figura 13). Nas regiões positivas de cada marcador o valor relativo e a média da intensidade de fluorescência foram definidos.

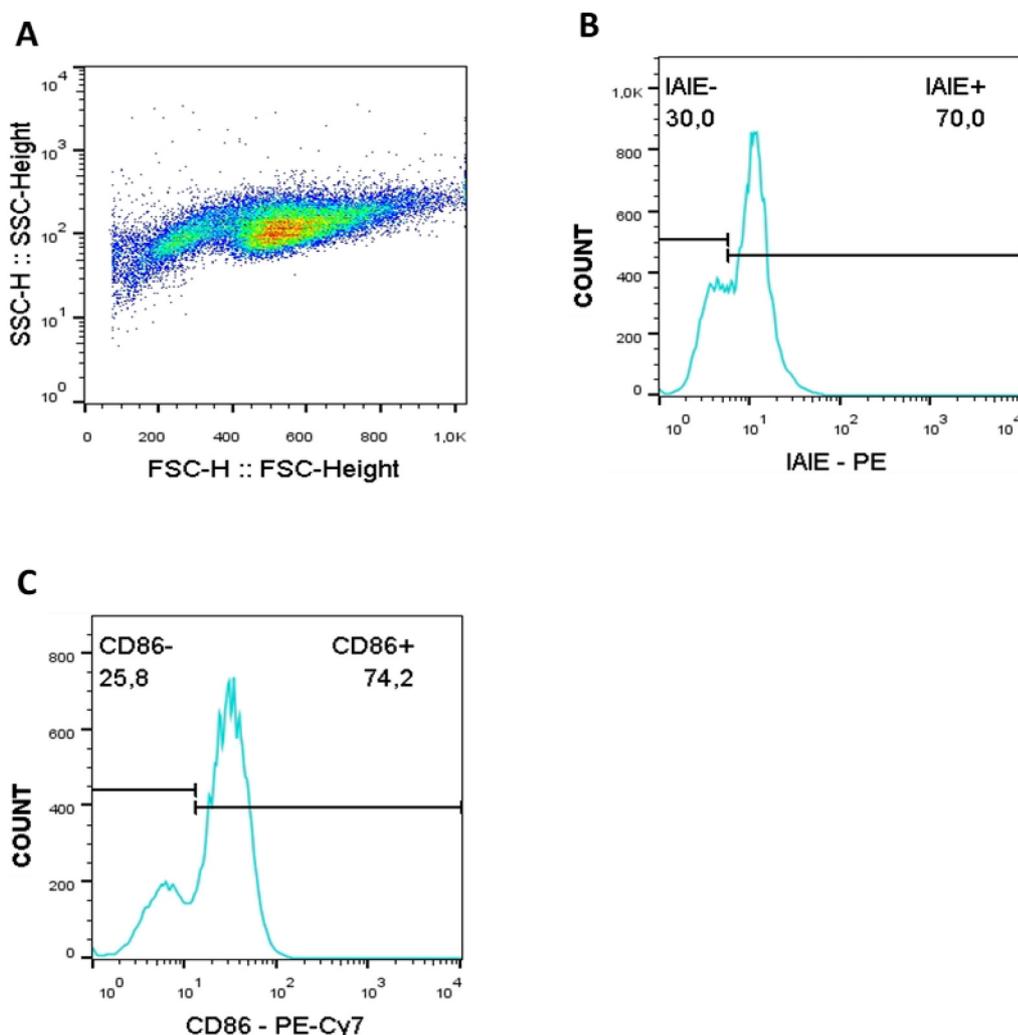


Figura 13 – Estratégia de análise para identificação dos macrófagos RAW 264.7 polarizados para o perfil M1 e M2 e tratados com o EEJ. As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 48 poços e fundo chato a uma concentração de $5 \times 10^5/500 \mu\text{L}$ e incubadas 24 horas em meio RPMI a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período inicial de incubação, induziu-se a polarização dos macrófagos da seguinte forma: Para macrófagos M1 foram utilizados LPS (200 ng/mL) e IFN- γ (10 ng/mL) e para macrófagos M2 foram utilizadas as citocinas IL-4 (40 ng/mL) e IL-13 (20 ng/mL). Como controle, os macrófagos foram cultivados em meio RPMI completo para manter estado de M0. Logo em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações do EEJ (125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Para análise dos macrófagos, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse no gráfico baseado em SSC versus FSC (A). Em seguida, foi feita a análise simples dos marcadores IA-IE e CD86, selecionando-se a região positiva nos parâmetros FSC versus IA-IE (canal 2) (B) e FSC versus CD86 (canal 3) (C), respectivamente. Nas regiões positivas de cada marcador o valor relativo e a média da intensidade de fluorescência foram definidos.

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com *software Graph Pad Prism*, versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A normalidade foi avaliada pelo teste *D'Agostino-Pearson*. Para dados paramétricos, foi utilizado o Teste *t* de Student; para os não-paramétricos, *Mann-Whitney*, sendo para ambos o nível de significância $p < 0,05$. A avaliação da sobrevida foi realizada pelo teste de *Log-Rank*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (e.p.m.) (SOKAL & ROHLF, 1996).



Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de citotoxicidade

5.1.1 Efeito citotóxico do EEJ sobre as células do tumor de Ehrlich

Os resultados obtidos demonstraram que o EEJ nas concentrações de 62,5 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram citotoxicidade sobre as células do carcinoma de Ehrlich, sendo que a concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduziu em 47% a viabilidade das células tumorais (Figura 14). O EEJ apresentou CI_{50} de 3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

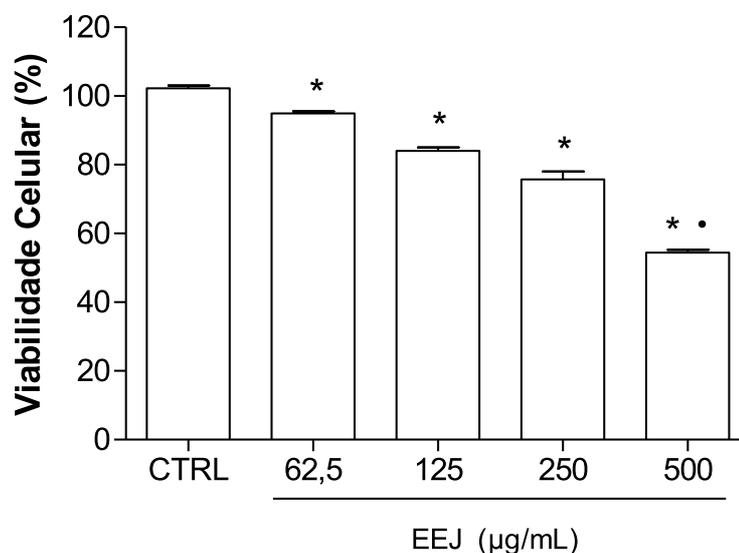


Figura 14 – Efeito do EEJ sobre a viabilidade das células do tumor de Ehrlich. As células do tumor de Ehrlich foram incubadas com diferentes concentrações do EEJ (62,5, 125, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão das médias de dois experimentos realizados em sextuplicata. * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, • ($p < 0,05$) em comparação aos grupos tratados com as concentrações de 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Mann-Whitney*.

5.1.2 Efeito citotóxico do EEJ sobre as células RAW 264.7

Os resultados da viabilidade celular mostraram que o EEJ nas concentrações de 62,5 a 250 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram citotoxicidade em cultura de macrófagos RAW 264.7. Entretanto, a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade em 20,4% (Figura 15).

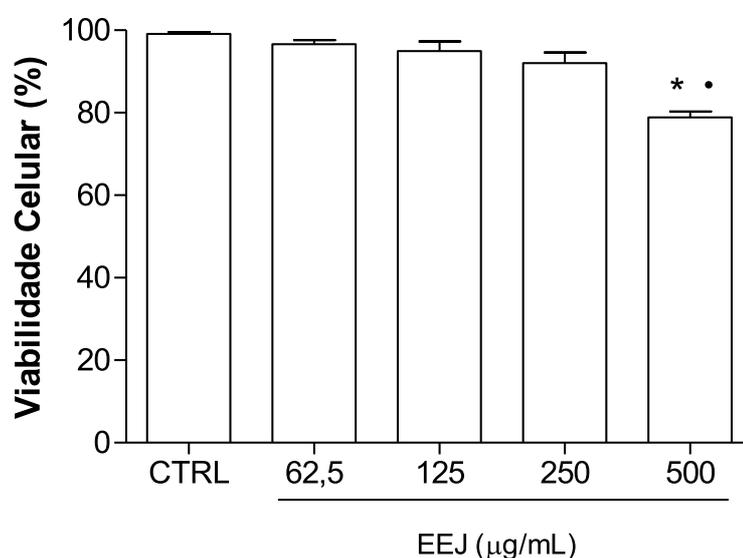


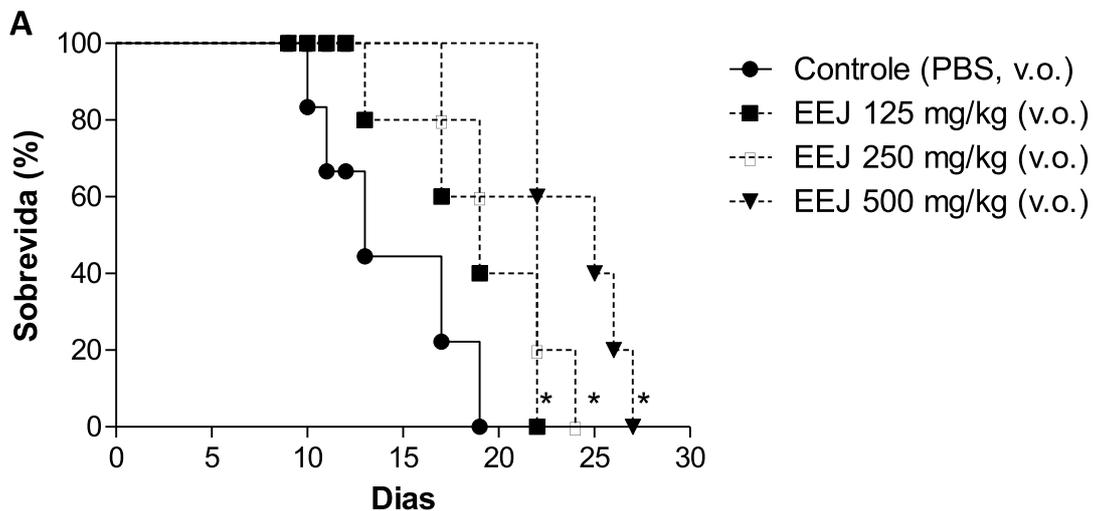
Figura 15 – Avaliação da citotoxicidade do EEJ sobre a linhagem das células RAW 264.7. As células RAW 264.7 foram incubadas na presença ou ausência de EEJ (62,5, 125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão das médias de dois experimentos realizados em sextuplicata. * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, • ($p < 0,05$) em comparação aos grupos tratados com as concentrações de 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$, *Mann-Whitney*.

5.2 Efeito antitumoral *in vivo* do EEJ

5.2.1 Efeito do EEJ sobre a sobrevivência de animais portadores do TAE

Todos os animais do grupo controle morreram até o 19º dia após inóculo do tumor, enquanto que, o tratamento com o EEJ nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg aumentou a sobrevivência dos animais portadores de tumor para 22, 24 e 27 dias, respectivamente.

O tratamento com EEJ foi capaz de aumentar a expectativa de vida dos camundongos portadores de tumor em 46,1% na dose de 125 mg/kg, 69,2% na dose de 250 mg/kg e em 92,3% na dose de 500 mg/kg (Figura 16).



B

Parâmetro	Controle	EEJ (mg/kg)		
		125	250	500
MST (dias)	13	19*	22*	25*
ILS (%)	-	46,1	69,2	92,3

Figura 16 – Aumento da expectativa de vida (% ILS) de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e tratados com o EEJ. Os animais foram tratados nos dias 3, 5, 7 e 9 após inóculo do tumor (2×10^6 /animal) com o EEJ (125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) ou PBS (controle, v.o.). Os animais foram observados 2x/dia. * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, teste de *Log-rank*.

5.2.2 Efeitos do EEJ sobre o desenvolvimento do TAE

O tratamento com EEJ na dose de 500 mg/kg diminuiu o peso dos animais, circunferência abdominal, volume total do fluido ascítico e o número de células tumorais totais na ascite, quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, a dose de 250 mg/kg reduziu a circunferência abdominal e o número de células tumorais totais, enquanto que a dose de 125 mg/kg reduziu apenas o número de células tumorais totais presentes na cavidade peritoneal (Figura 17).

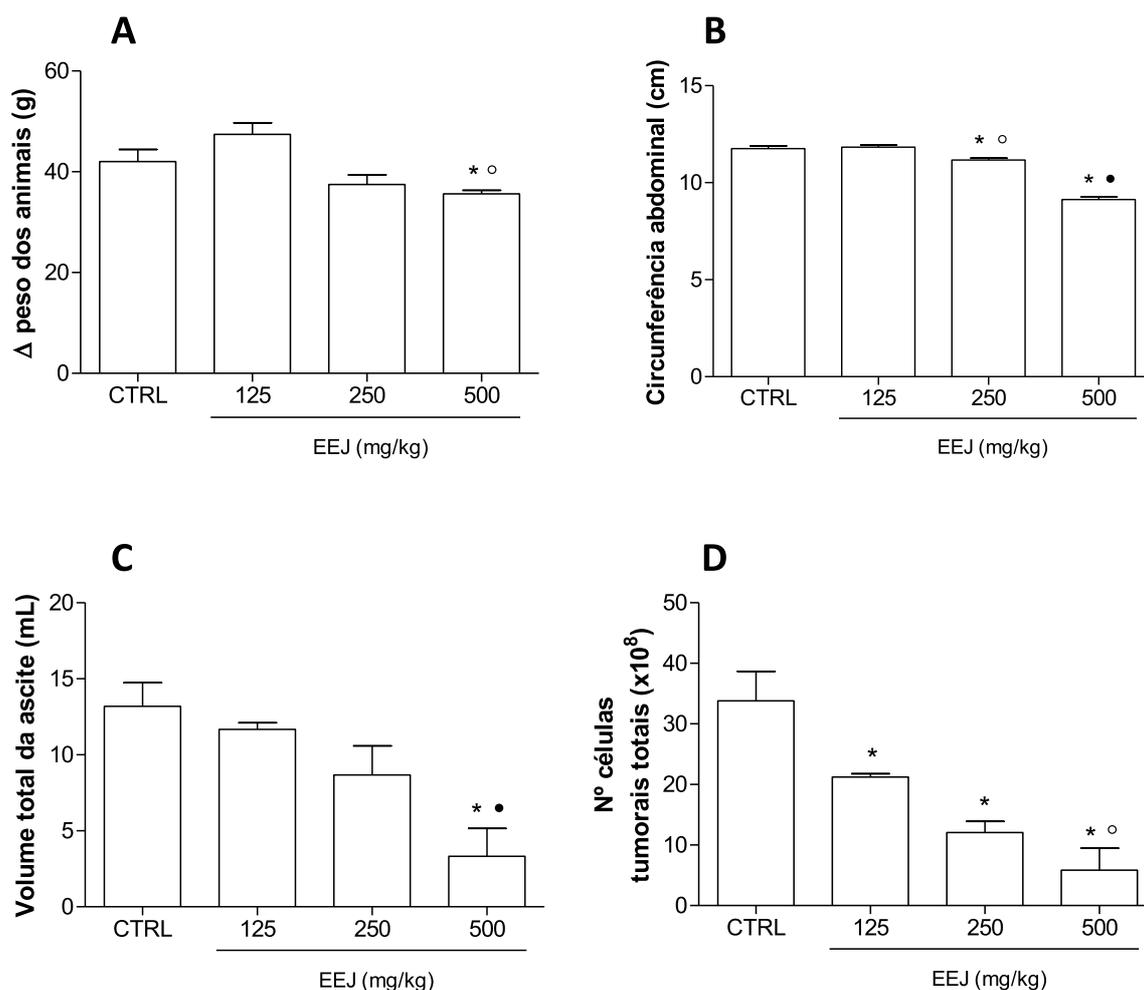


Figura 17 – Efeito do tratamento com EEJ sobre o peso dos animais (A), circunferência abdominal (B), volume total da ascite (C) e número de células tumorais totais na ascite (D). Os animais foram tratados com EEJ (125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) ou PBS (controle, v.o.) nos dias 3, 5, 7 e 9 após inóculo (2×10^6 /animal, ip.) do tumor de Ehrlich. Os animais foram sacrificados no décimo dia. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias de dois experimentos realizados independentes. (n=05/grupo). * (p<0,05) em comparação ao grupo controle, ◦ (p<0,05) em comparação ao grupo tratado com a dose de 125 mg/kg, • (p<0,05) em comparação aos grupos tratados com as doses de 125 e 250 mg/kg, *Mann-Whitney*.

5.2.3 Efeitos do EEJ sobre os parâmetros hematológicos dos animais portadores ou não de TAE

Os dados referentes ao perfil hematológico dos camundongos sadios e tratados com EEJ nas doses de 125, 250, 500 mg/kg ou PBS, v.o. estão descritos na Tabela 2. O EEJ não induziu qualquer mudança significativa nos parâmetros hematológicos, como a contagem total de leucócitos, contagem total de eritrócitos,

hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) e contagem de plaquetas, quando comparado com o grupo controle.

Tabela 2 – Parâmetros hematológicos de camundongos sadios e tratados nos dias 3, 5, 7 e 9 com EEJ, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, v.o. ou PBS (controle, v.o.). Os animais foram sacrificados no décimo dia.

Parâmetros	CTRL	EEJ (mg/kg)		
		125	250	500
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7,4 \pm 0,9 ^a	6,9 \pm 1,4	4,9 \pm 1,2	7,0 \pm 1,2
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,2 \pm 0,4	10,8 \pm 1,3	10,4 \pm 0,7	9,9 \pm 0,8
Hemoglobina (g/dL)	13,2 \pm 0,4	14,6 \pm 1,7	14,5 \pm 1,0	13,1 \pm 1,1
Hematócrito (%)	46,7 \pm 1,2	53,0 \pm 6,6	53,0 \pm 3,9	48,6 \pm 5,2
VCM (fL)	51,7 \pm 0,6	49,0 \pm 0,8	50,7 \pm 0,9	48,8 \pm 1,5
HCM (pg)	14,3 \pm 0,1	13,5 \pm 0,2	13,9 \pm 0,1	13,2 \pm 0,2
CHCM (g/dL)	27,9 \pm 0,2	27,6 \pm 0,2	27,3 \pm 0,3	27,2 \pm 0,8
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1846,0 \pm 16,4	2026,0 \pm 167,4	2021,0 \pm 106,4	1865 \pm 158,3

^a Os valores representam média \pm e.p.m. (n=05/grupo).

De forma semelhante, os animais inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com EEJ com as três doses não apresentaram nenhuma alteração nos mesmos parâmetros hematológicos analisados (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros hematológicos de camundongos com tumor de Ehrlich e tratados nos dias 3, 5, 7 e 9 após inóculo ($2 \times 10^6/\text{animal}$, ip.) com EEJ, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, v.o. ou PBS (controle, v.o.). Os animais foram sacrificados no décimo dia.

Parâmetros	CTRL	EEJ (mg/kg)		
		125	250	500
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13,7 \pm 7,1 ^a	16,5 \pm 3,9	17,6 \pm 13,8	16,1 \pm 5,5
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,5 \pm 1,6	9,6 \pm 1,3	9,5 \pm 1,4	10,5 \pm 0,8
Hemoglobina (g/dL)	13,0 \pm 2,2	13,2 \pm 1,8	13,0 \pm 1,9	14,3 \pm 1,0
Hematócrito (%)	46,9 \pm 8,4	47,1 \pm 7,0	46,3 \pm 7,5	51,3 \pm 3,3
VCM (fL)	49,4 \pm 1,2	49,1 \pm 1,1	48,5 \pm 1,2	48,9 \pm 1,3
HCM (pg)	13,7 \pm 0,4	13,8 \pm 0,2	13,6 \pm 0,2	13,8 \pm 0,4
CHCM (g/dL)	27,7 \pm 0,9	28,0 \pm 0,9	28,0 \pm 0,8	27,9 \pm 0,8
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2202,0 \pm 580,4	2397,0 \pm 165,3	1655,0 \pm 350,3	2185,0 \pm 234,8

^a Os valores representam média \pm e.p.m. (n=05/grupo).

Em relação à contagem diferencial dos leucócitos foi possível observar uma diminuição dos neutrófilos nos animais inoculados com tumor e tratados com o EEJ nas três doses testadas. O EEJ ainda foi capaz de promover um aumento no número

dos linfócitos nos animais inoculados com tumor, quando comparado com o grupo controle (com tumor). Sobre os monócitos, somente as doses de 250 e 500 mg/kg promoveram um aumento no número dessas células nos animais inoculados com tumor. Não houve nenhuma diferença na contagem diferencial dos leucócitos dos animais sadios e tratados com o EEJ, quando comparados com o grupo controle nas mesmas condições (Tabela 4).

Tabela 4 – Contagem diferencial de leucócitos de camundongos *Swiss* inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, v.o. ou PBS (controle, v.o.). Os animais foram sacrificados no décimo dia.

Grupo	Sem Tumor				Com Tumor			
	CTRL	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg	CTRL	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg
Neutrófilo	18 ± 0,1 ^a	17 ± 0,1	17 ± 0,1	15 ± 0,1	35 ± 0,1	24 ± 0,1*	19 ± 0,2*	17 ± 0,1*
Linfócito	78 ± 0,1	80 ± 0,1	79 ± 0,2	81 ± 0,1	54 ± 0,1	65 ± 0,4*	68 ± 0,4*	64 ± 0,2*
Monócito	03 ± 0,3	03 ± 0,5	04 ± 0,6	04 ± 0,3	11 ± 0,1	11 ± 0,1	13 ± 0,1*	19 ± 0,1*
Eosinófilo	01 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-

^a Os valores representam média ± e.p.m. (n=05/grupo).

* (p<0,05) em comparação ao grupo controle, ANOVA (*Newman-Keuls*).

5.2.4 Efeito do EEJ sobre a celularidade dos órgãos linfoides

Os dados referentes à celularidade dos órgãos linfoides dos animais inoculados ou não com tumor ascítico de Ehrlich estão descritos na Figura 18. Pôde-se perceber que o EEJ nas doses de 125 e 500 mg/kg promoveu um aumento no número de células do baço dos animais sadios, quando comparado com o grupo controle (sem tumor). A dose de 500 mg/kg também foi capaz de promover um aumento no número de células do baço dos animais inoculados com tumor, quando comparada com o grupo controle (com tumor). Verificou-se ainda, que esse aumento das células do baço ocorrido com os animais tratados com o EEJ na dose de 500 mg/kg (com e sem tumor) foi estatisticamente significativa, quando comparados com os animais tratados com a dose de 250 mg/kg. Assim como, o aumento no número de

células do baço dos animais sadios e tratados com o EEJ na dose de 125 mg/kg foi estatisticamente significativa quando comparados com os animais tratados com o EEJ dose de 250 mg/kg nas mesmas condições. Com relação às células da medula óssea e do linfonodo mesentérico, não houve nenhuma diferença dos animais (com e sem tumor) tratados com o EEJ nas três doses, quando comparados com seus respectivos grupos controles.

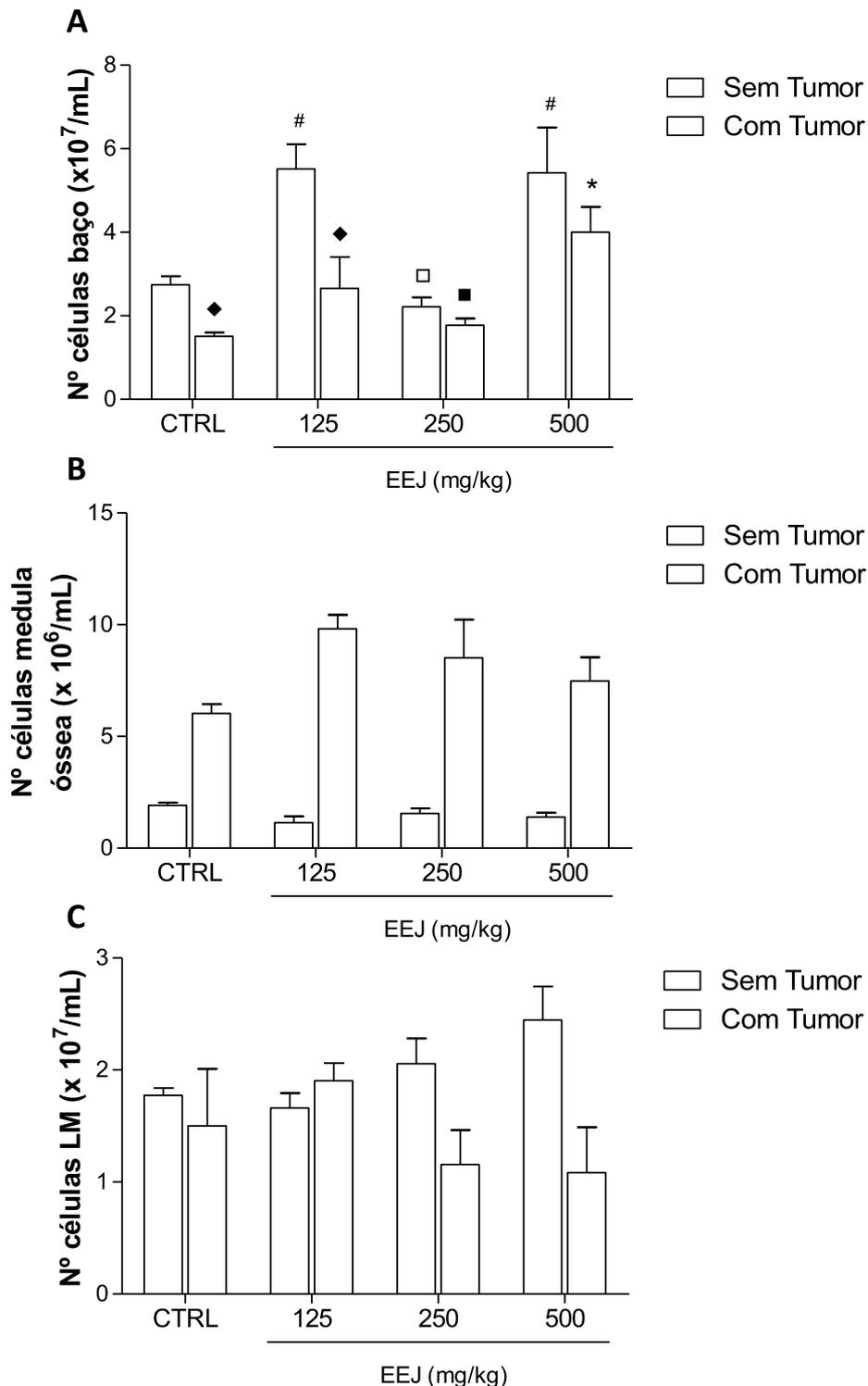


Figura 18 – Efeito do tratamento com EEJ sobre nº de células do baço (A), nº de células da medula óssea (B) e nº de células do linfonodo mesentérico (C). Os animais foram inoculados com 2×10^6 /animal, ip. de células do tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, v.o. nos dias 3, 5, 7 e 9 após inóculo do tumor. O grupo controle recebeu 0,2 mL de PBS, v.o. O efeito do EEJ sobre o a celularidade dos órgãos linfoides foi avaliada dez dias após o inóculo das células tumorais. Os animais não inoculados com o tumor de Ehrlich obedeceram ao mesmo esquema terapêutico. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias de dois experimentos realizados independentes. (n=05/grupo). # ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle sem tumor, * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle com tumor, ♦ ($p < 0,05$) em comparação ao mesmo tratamento sem tumor, □ ($p < 0,05$) em comparação aos grupos tratados com as doses de 125 e 500 mg/kg sem tumor, ■ ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado com a dose de 500 mg/kg com tumor, *Mann-Whitney*.

5.2.5 Produção de óxido nítrico

Não foi detectado NO, após 48 h, na cultura de células do baço estimuladas ou não com o tumor de Ehrlich.

5.2.6 Efeito do EEJ sobre as concentrações de citocinas no soro dos animais portadores ou não TAE

Houve um aumento de IFN- γ no soro dos animais tratados com o EEJ na dose de 125 mg/kg. Foi verificado ainda que esses animais apresentaram redução nas concentrações de IL-6. O aumento de TNF- α foi observado apenas nos animais tratados com o EEJ nas doses de 125 e 250 mg/kg. Nenhuma diferença estatisticamente significativa na concentração de MCP-1 foi observada nos animais tratados com EEJ, quando comparada com o grupo controle. As citocinas IL-12 e IL-10 não foram detectadas no soro desses animais (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentração de citocinas no soro de camundongos *Swiss* albinos machos, inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com EEJ ou PBS (controle, v.o.). Após 10 dias os animais foram sacrificados e o soro foi utilizado para determinar as concentrações IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12 pela técnica de CBA.

Citocinas/ Quimiocina (pg/mL)	CTRL	EEJ (mg/kg)		
		125	250	500
IL-6	25,2 \pm 3,8 ^a	11,8 \pm 3,9 *	18,0 \pm 2,2	23,5 \pm 4,3
IL-10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MCP-1	743,0 \pm 158,0	638,3 \pm 138,1	846,2 \pm 126,3	386,6 \pm 142,1
IFN- γ	ND	0,8 \pm 0,1 *	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
TNF- α	28,4 \pm 5,5	45,9 \pm 10 *	46,4 \pm 2,2 *	14,5 \pm 4,0
IL-12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

IL: Citocina; IFN- γ : Interferon-gama; TNF: Fator de necrose tumoral; N.D.: Não detectado.

^a Os valores representam média \pm e.p.m. (n=05/grupo).

Os valores para cada citocina foram mensurados em pg/mL. * (p<0,05) em comparação ao grupo controle, ANOVA (*Newman-Keuls*).

Com relação à concentração de citocinas dos animais sadios e tratados com o EEJ, foi possível observar um aumento das concentrações de TNF- α nos animais tratados com o EEJ nas três doses testadas. Por outro lado, houve um aumento de IFN- γ somente no soro dos animais tratados com o EEJ nas doses de 250 e 500 mg/kg. As citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 não foram detectadas no soro desses animais (Tabela 6).

Tabela 6 – Níveis de citocinas no soro de camundongos *Swiss* albinos machos sadios, tratados com EEJ ou PBS (controle, v.o.). Após 10 dias os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado para determinar os níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ pela técnica de CBA.

Citocinas/ Quimiocina (pg/mL)	CTRL	EEJ (mg/kg)		
		125	250	500
IL-2	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
IL-4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
TNF- α	0,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,2 *	1,1 \pm 0,0 *	1,2 \pm 0,9 *
IFN- γ	3,4 \pm 1,1 ^a	3,7 \pm 0,7	4,5 \pm 0,7 *	7,7 \pm 0,8 *
IL-10	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
IL-17	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

IL: Citocina; IFN- γ : Interferon-gama; TNF: Fator de necrose tumoral.

^a Os valores representam média \pm e.p.m. (n=05/grupo).

Os valores para cada citocina foram mensurados em pg/mL. * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, ANOVA (*Newman-Keuls*).

5.2.7 Efeito do EEJ sobre as concentrações de citocinas na ascite dos animais portadores de TAE

Os animais tratados com EEJ apresentaram uma diminuição nas concentrações de IL-6 de forma dose dependente. As concentrações de IFN- γ dos animais tratados com o EEJ apresentaram-se aumentados após 10 dias da inoculação do tumor. Um aumento significativo na concentração de IL-10 foi observado após o tratamento com EEJ na dose de 125 mg/kg. Em relação às concentrações de TNF- α , foi observado um aumento significativo apenas nos animais tratados com o EEJ nas doses de 125 e 250 mg/kg. Não foi observada nenhuma alteração nos níveis de MCP-

1 dos animais tratados com o EEJ nas três doses, quando comparados com o grupo controle. A citocina IL-12 não foi detectada na ascite desses animais (Tabela 7).

Tabela 7 – Citocinas e quimiocinas na ascite de camundongos *Swiss* albinos machos, inoculados com do tumor de Ehrlich e tratados com EEJ. Após 10 dias os animais foram sacrificados e a ascite foi coletada para determinar as concentrações de IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12 pela técnica de CBA.

Citocinas/ Quimiocina (pg/mL)	CTRL	EEJ (mg/kg)		
		125	250	500
IL-6	620,6 \pm 118,3	239,4 \pm 55,3 *	217,0 \pm 24,4 *	77,9 \pm 25,4 *
IL-10	1,9 \pm 1,1	28,49 \pm 1,6 *	3,5 \pm 2,2	2,1 \pm 1,3
MCP-1	5893 \pm 653,4	5762 \pm 68,9	5491 \pm 174,7	4148 \pm 790,6
IFN- γ	3,2 \pm 0,7246	10,5 \pm 2,0 *	6,5 \pm 0,7 *	6,7 \pm 0,5 *
TNF- α	49,3 \pm 6,9	103,8 \pm 5,5 *	78,6 \pm 0,5 *	35,9 \pm 10,6
IL-12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

IL: Interleucina; IFN γ : Interferon-gama; TNF: Fator de necrose tumoral; N.D.: Não detectado.

^a Os valores representam média \pm e.p.m. (n=05/grupo).

Os valores para cada citocina foram mensurados em pg/mL. * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, ANOVA (*Newman-Keuls*).

5.2.8 Perfil fenotípico de células do baço

Como pode ser observado na Figura 19, não houve alteração na frequência relativa de células CD3 positivas dos animais tratados com o EEJ, quando comparada com o grupo controle. De forma semelhante, os animais tratados com o EEJ não apresentaram nenhuma alteração na frequência relativa das células CD3⁺ (linfócitos T) que expressavam o marcador CD4, assim como, de linfócitos T CD4 positivos expressando o marcador CD28. Porém ao analisar a frequência absoluta, foi possível observar um aumento de células CD3⁺CD4⁺CD28⁺ nos animais tratados com o EEJ nas doses de 125 e 500 mg/kg.

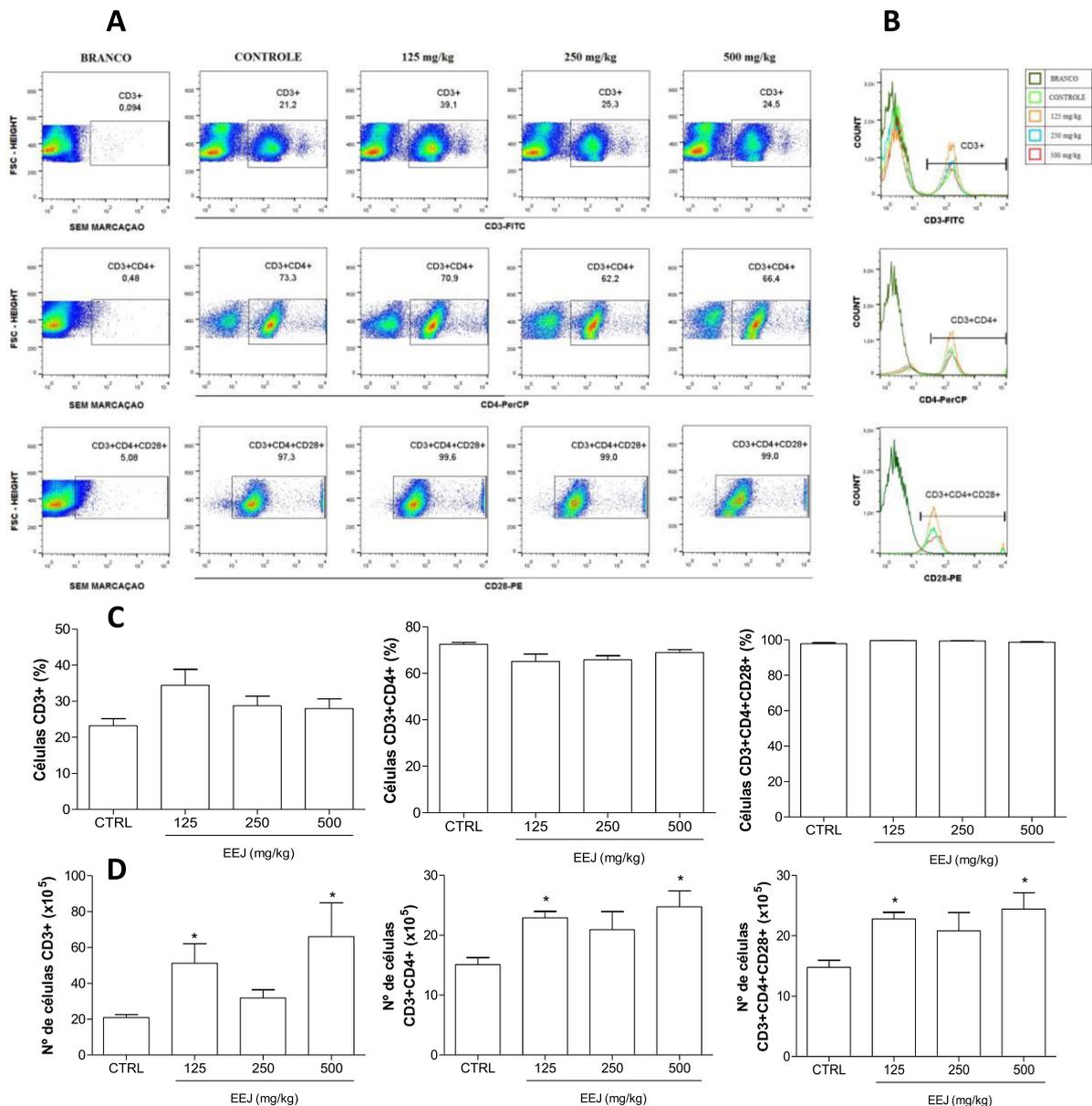


Figura 19 – Análise dos linfócitos T auxiliares ativados do baço de camundongos *Swiss* inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ. As células do baço foram obtidas de camundongos *Swiss* inoculados com tumor de Ehrlich, tratados com o EEJ (125, 250 e 500 mg/kg) e marcadas com anticorpos específicos para análise de linfócitos CD3⁺CD4⁺CD28⁺. Representação ilustrativa do efeito do EEJ nos linfócitos T CD4⁺ (A). Foi realizada análise da intensidade de fluorescência (B), frequências relativa (C) e absoluta (D). Os dados representam a média ± erro padrão das médias de um experimento independente. * (p<0,05) em comparação ao grupo controle, teste de *Mann-Whitney*.

De forma semelhante, os animais tratados com o EEJ não apresentaram alteração na frequência relativa das células CD3⁺ (linfócitos T) que expressavam o marcador CD8, assim como, dos linfócitos T CD8 positivos expressando o marcador CD28. Porém, o EEJ, nas três doses, aumentou a frequência absoluta de células CD3⁺CD8⁺CD28⁺ (Figura 20).

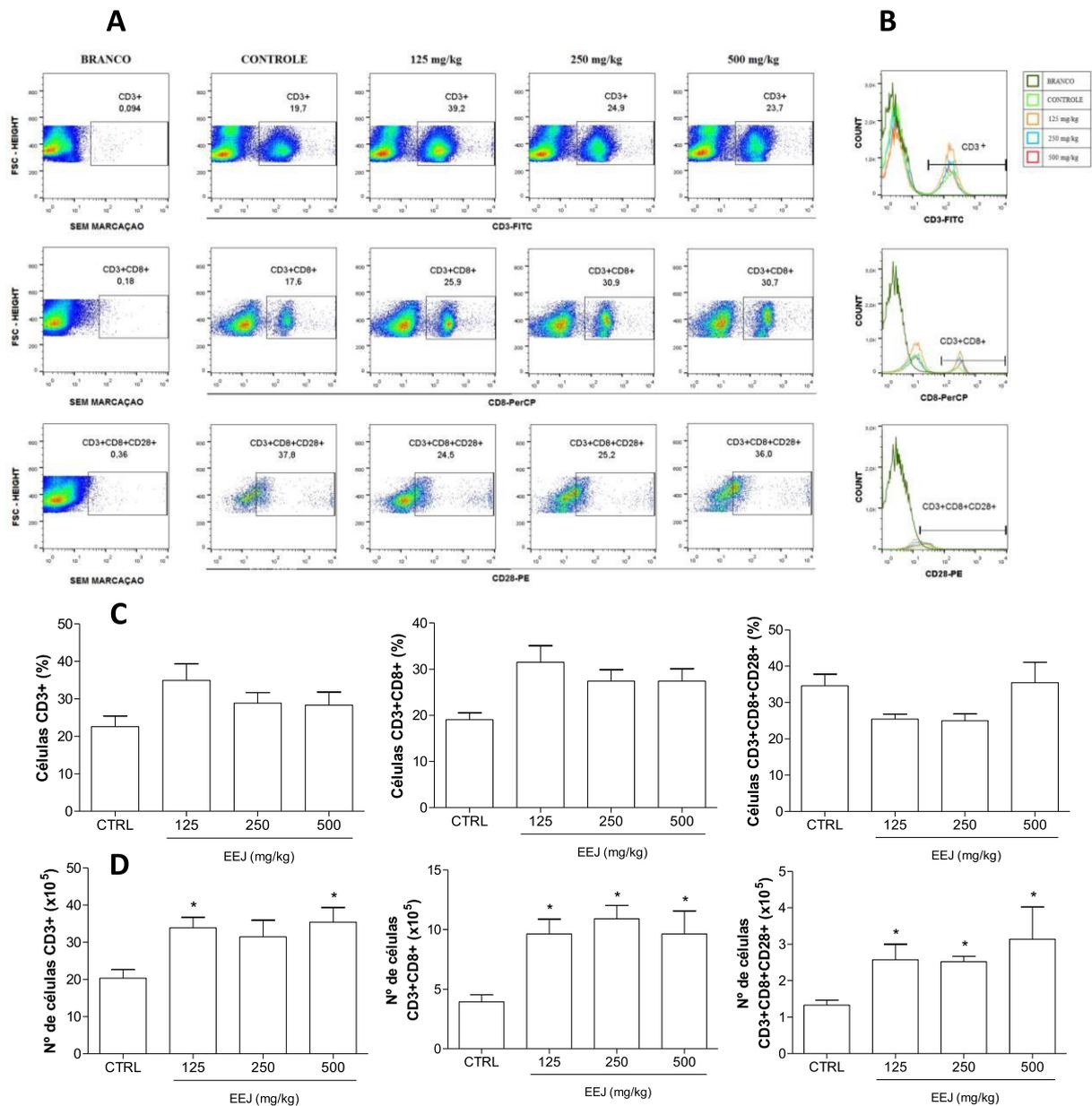


Figura 20 – Análise dos linfócitos T citotóxicos ativados do baço de camundongos *Swiss* inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ. As células do baço foram obtidas de camundongos *Swiss* inoculados com tumor de Ehrlich, tratados com o EEJ (125, 250 e 500 mg/kg) e marcadas com anticorpos específicos para análise de linfócitos CD3⁺CD8⁺CD28⁺. Representação ilustrativa do efeito do EEJ nos linfócitos T CD8⁺ (A). Foi realizada análise da intensidade de fluorescência (B), frequências relativa (C) e absoluta (D). Os dados representam a média ± erro padrão das médias de um experimento independente. * (p<0,05) em comparação ao grupo controle, teste de *Mann-Whitney*.

O EEJ não alterou a frequência relativa de células apresentadoras de antígenos que expressavam a proteína IA-IE, assim como, não houve diferença na frequência relativa dessas células expressando proteína co-estimuladora (CD86) e proteína de adesão (Ly6C). Porém, a frequência absoluta das células que

expressavam IA-IE⁺Ly6C⁺CD86⁺ foi maior nos animais tratados com o EEJ na dose de 500 mg/kg (Figura 21).

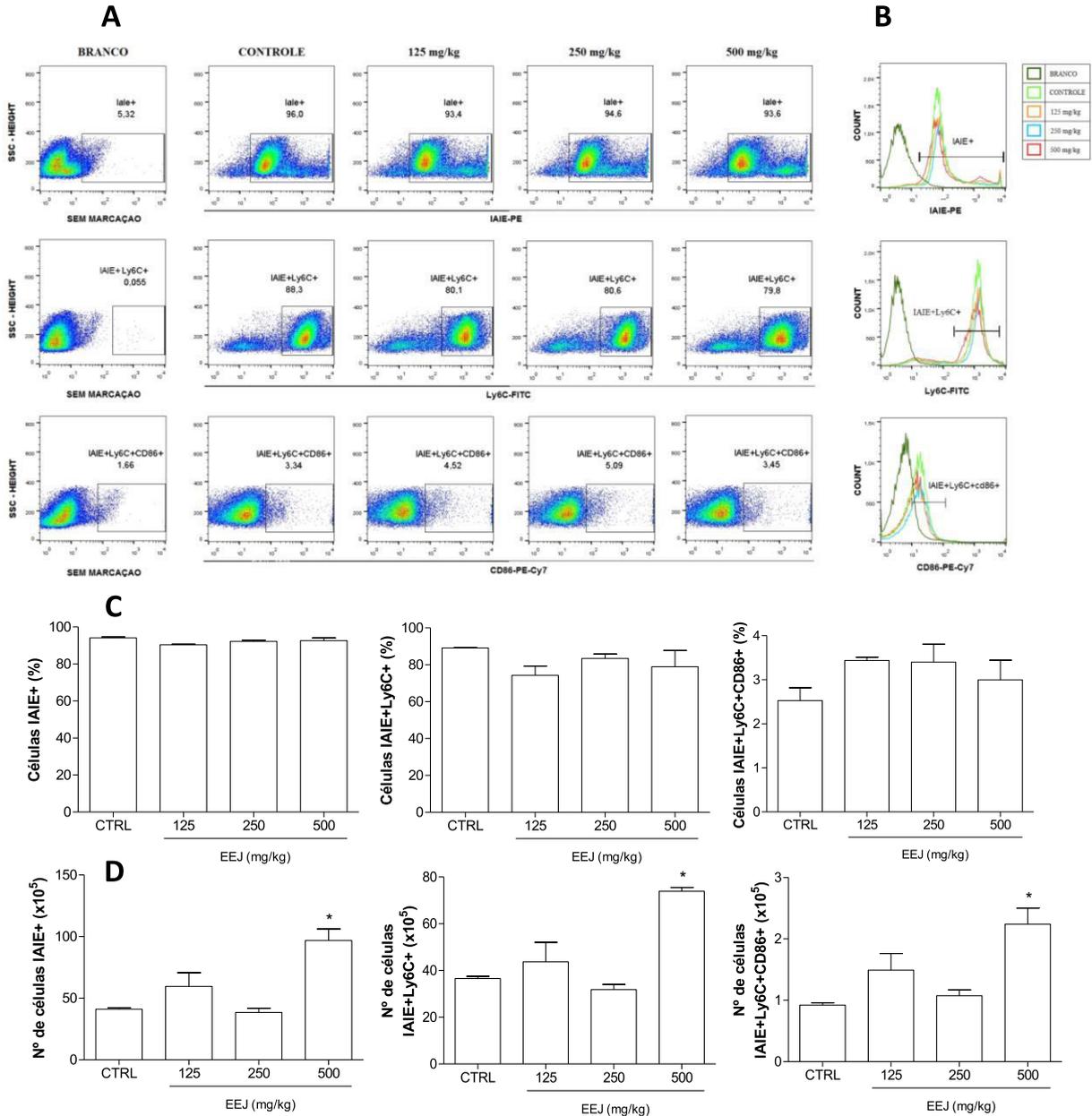


Figura 21 – Análise dos macrófagos do baço de camundongos Swiss inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ. As células do baço foram obtidas de camundongos Swiss inoculados com tumor de Ehrlich, tratados com o EEJ (125, 250 e 500 mg/kg) e marcadas com anticorpos específicos para IA-IE⁺Ly6C⁺CD86⁺. Representação ilustrativa do efeito do EEJ nas células apresentadoras de antígenos (A). Foi realizada análise da intensidade de fluorescência (B), frequências relativa (C) e absoluta (D). Os dados representam a média ± erro padrão das médias de um experimento independente. * (p<0,05) em comparação ao grupo controle, teste de *Mann-Whitney*.

Em relação às células NK, o tratamento com o EEJ nas três doses reduziu a frequência relativa das células CD3-CD49b⁺NK1.1⁺, porém, ao analisar a frequência absoluta observa-se um aumento dessas células nos animais tratados com o EEJ na dose de 500 mg/kg (Figura 22).

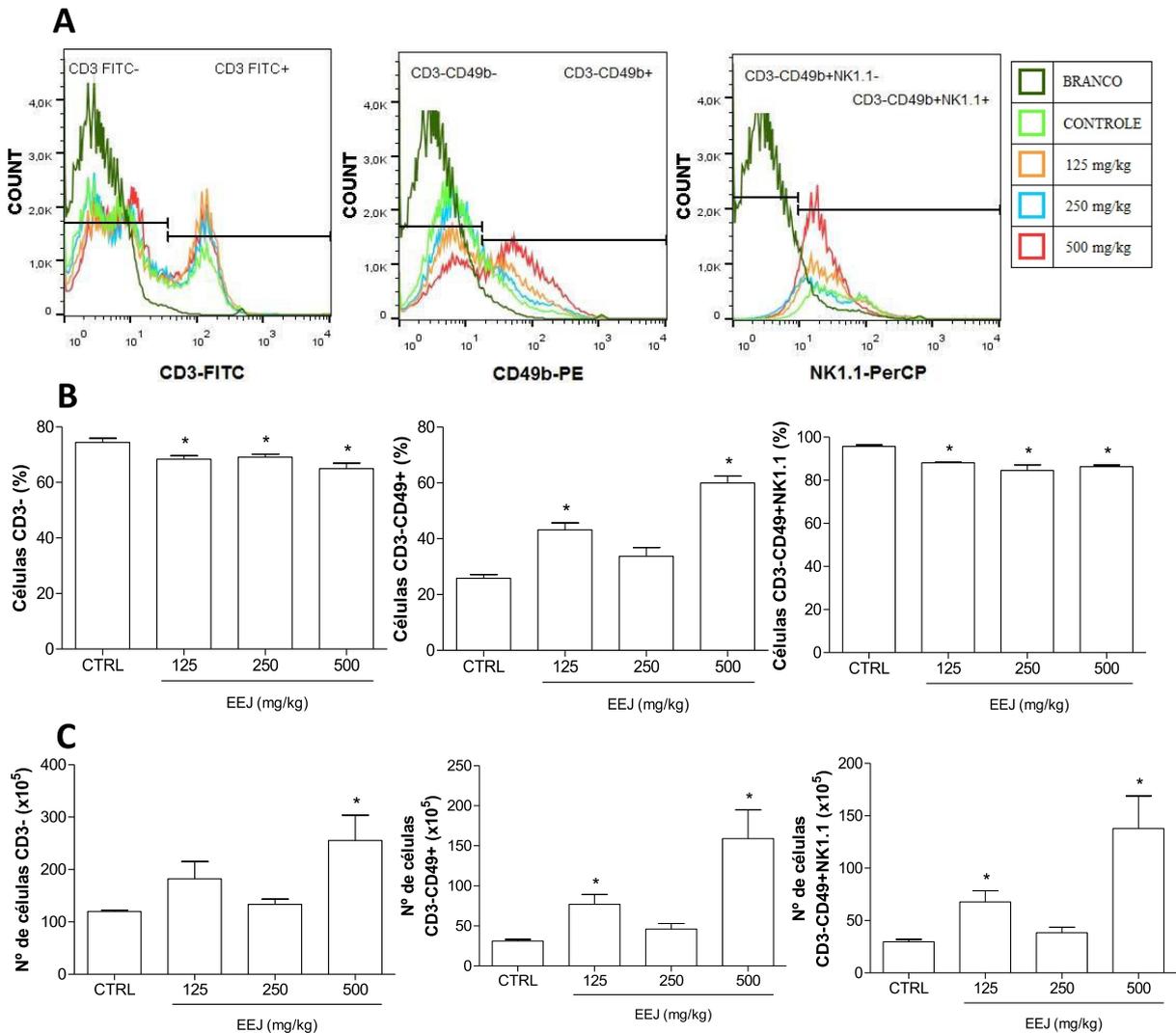


Figura 22 – Análise de células NK de camundongos Swiss inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ. As células do baço foram obtidas de camundongos Swiss inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ (125, 250 e 500 mg/kg). As células foram marcadas com anticorpos específicos para células CD3-CD49b⁺NK1.1⁺. (A) Representação ilustrativa do efeito do EEJ nas células NK. Foi realizada análise da intensidade de fluorescência (B), frequências relativa (C) e absoluta (D). Os dados representam a média ± erro padrão das médias de um experimento independente. * (p<0,05) em comparação ao grupo controle, teste de *Mann-Whitney*.

Quanto a análise de células NKT, o tratamento com o EEJ na dose de 500 mg/kg aumento a frequência absoluta das células CD3⁺CD49b⁺NK1.1⁺ (Figura 23).

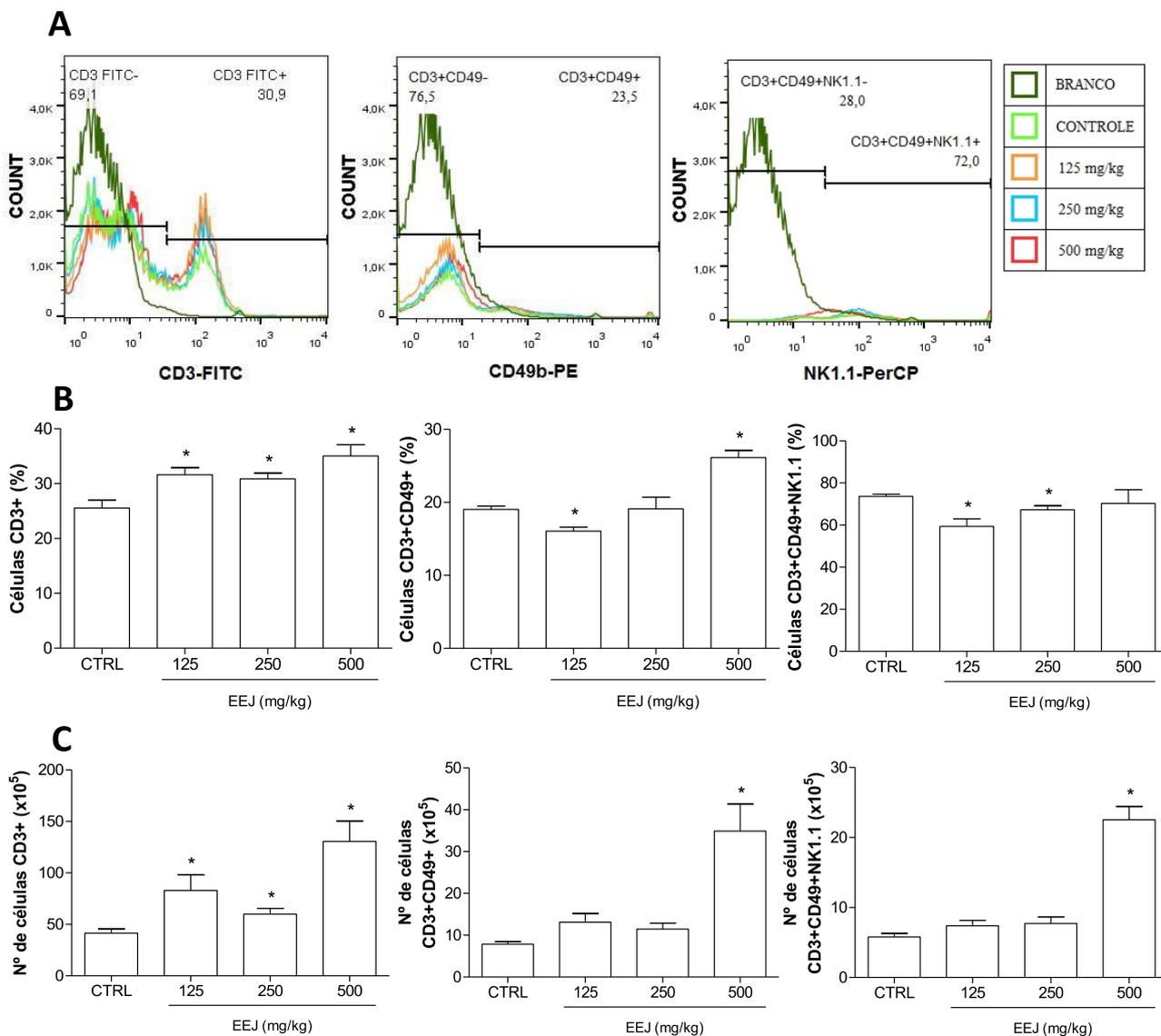


Figura 23 – Análise de células NKT de camundongos *Swiss* inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ. As células do baço foram obtidas de camundongos *Swiss* inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ (125, 250 e 500 mg/kg). As células foram marcadas com anticorpos específicos para células CD3⁺CD49b⁺NK1.1⁺. Representação ilustrativa do efeito do EEJ nas células NKT (A). Foi realizada análise da intensidade de fluorescência (B), frequências relativa (C) e absoluta (D). Os dados representam a média ± erro padrão das médias de um experimento independente. * (p<0,05) em comparação ao grupo controle, teste de *Mann-Whitney*.

5.3 Efeito do EEJ em macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS

5.3.1 Efeitos do EEJ sobre a produção de óxido nítrico, citocinas e quimiocinas na cultura de células RAW

Nos macrófagos RAW 264.7, o EEJ (125, 250 e 500 µg/mL) adicionado ao meio de cultura no mesmo momento que o LPS foi capaz de reduzir a produção de IL-6 em todas as concentrações testadas, quando comparado ao grupo controle (com LPS). Na ausência do estímulo (LPS) a produção de IL-6 pela célula RAW 264.7 foi indetectável (Figura 24A). Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de TNF- α e MCP-1 pelos macrófagos incubados com o EEJ (com ou sem estímulo), quando comparados aos seus respectivos grupos controles (Figuras 24B e 24C). IL-12, IL-10 e IFN- γ não foram detectadas no sobrenadante das culturas dos macrófagos.

Em relação ao efeito do EEJ na produção de óxido nítrico, houve um aumento nos macrófagos (com e sem LPS) após tratamento com o EEJ (125, 250 e 500 µg/mL), quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 24D).

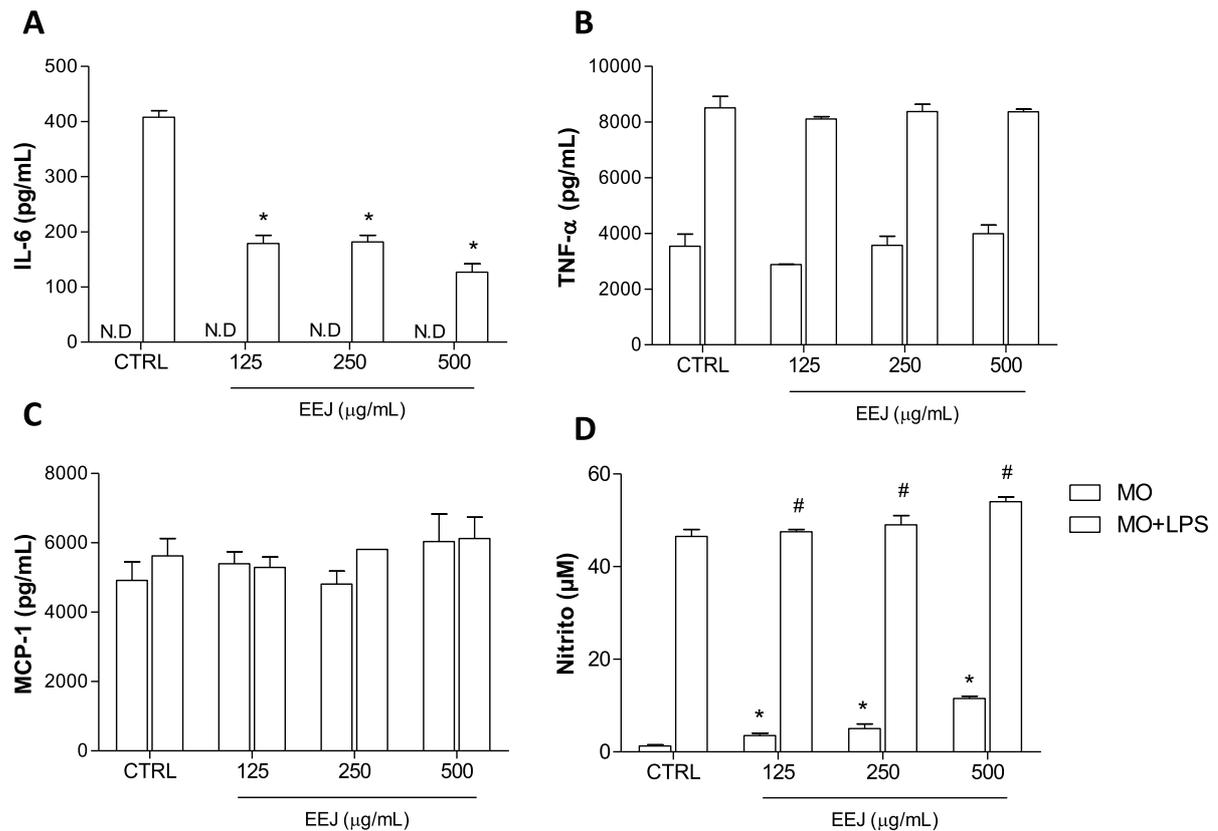


Figura 24 – Efeito do EEJ na liberação de citocinas (IL-6 (A), TNF- α (B)), quimiocina (MCP-1 (C)) e produção de NO (D) em cultura de macrófagos RAW 264.7 pela técnica de CBA. As células foram cultivadas em placas de 48 poços a uma concentração de $5 \times 10^5/500 \mu\text{L}$, em quadruplicada, e incubadas 48h a 37°C e 5% de CO_2 na presença ou ausência do EEJ (125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) e em dois poços da duplicata foi adicionado LPS (10 $\mu\text{g/mL}$). Os dados são apresentados como médias \pm SEM de dois experimentos. # ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle tratado com LPS, * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle com LPS (macrófagos, meio de cultura e LPS), teste de *Mann-Whitney*. N.D. – Não detectado.

5.3.2 Características fenotípicas das células da cultura RAW

Na Figura 25 estão representados os resultados referentes a determinação das características imunofenotípicas de células RAW, após 48 h de incubação na presença ou ausência do EEJ com e sem estímulo de LPS. Foi possível observar um aumento da expressão de CD14 nos macrófagos incubados com o EEJ na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ (com e sem estímulo), quando comparadas aos seus respectivos controles. A concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (com e sem LPS), não provocou nenhuma alteração na expressão desse marcador. Por outro lado, a concentração de

500 µg/mL foi capaz de reduzir a expressão de CD14 nos macrófagos não estimulados com LPS e nos macrófagos estimulados com LPS e incubados com o EEJ nessa mesma concentração, houve um aumento na expressão de CD14.

Foi possível observar que o EEJ, nas concentrações de 125 e 500 µg/mL, promoveu um aumento da frequência relativa, assim como, na expressão de IA-IE⁺ nos macrófagos estimulados ou não com o LPS. Já a concentração de 250 µg/mL promoveu um aumento na frequência relativa dos macrófagos (com e sem LPS) IA-IE⁺ positivos. Por outro lado, essa concentração foi capaz de aumentar a expressão de IA-IE⁺ somente nos macrófagos estimulados com LPS.

Em relação à proteína CD86, verifica-se o EEJ em todas as concentrações testadas, promoveu um aumento da frequência relativa de macrófagos (com e sem estímulo) CD86⁺. Entretanto, ao avaliar a expressão desse marcador, foi possível observar que houve um aumento somente nos macrófagos tratados com o EEJ nas concentrações de 250 e 500 µg/mL.

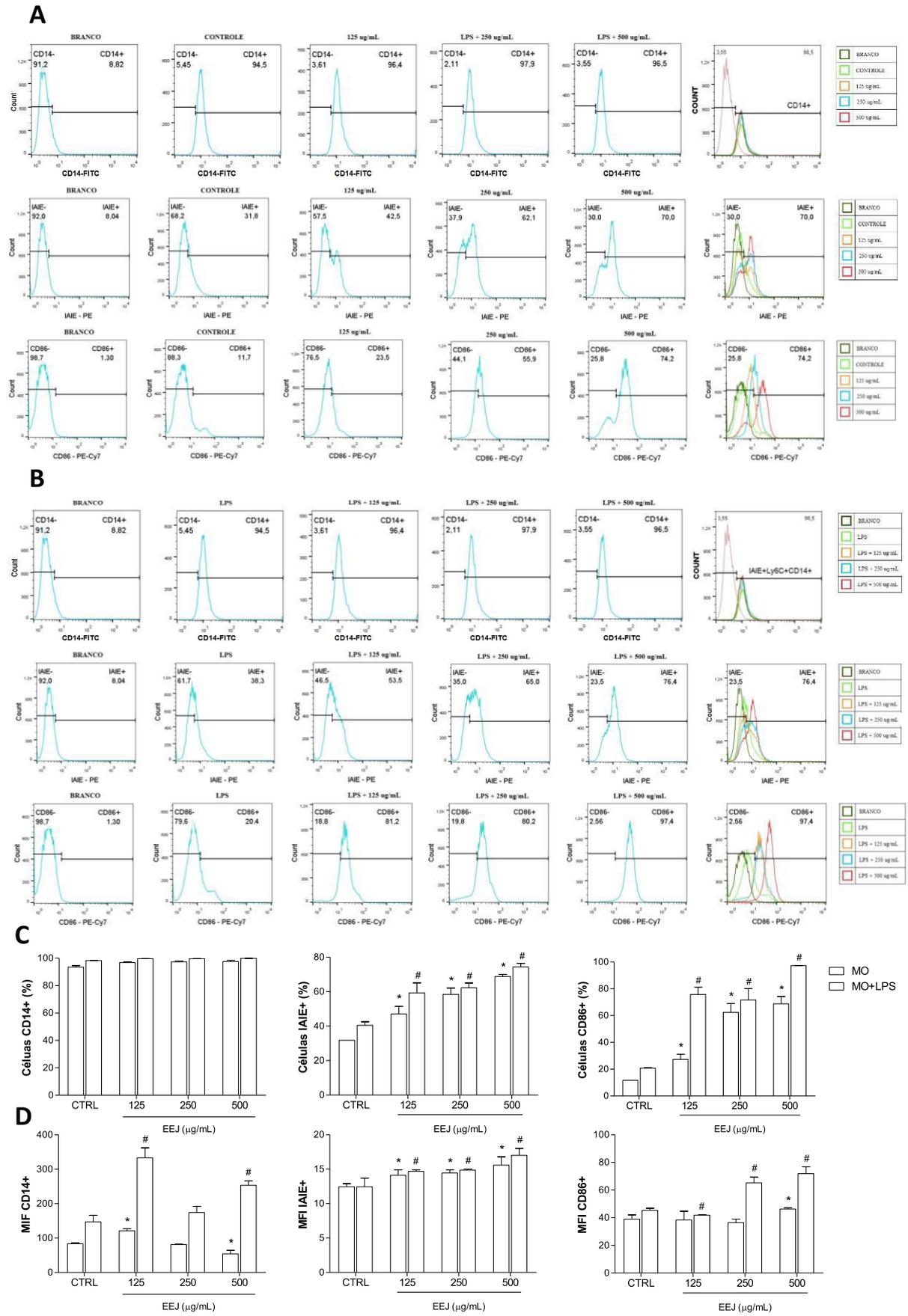


Figura 25 – Efeito do EEJ sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS (10 µg/mL). Células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 48 poços a uma concentração de $5 \times 10^5/500$ µL e incubadas 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, em quadruplicata. Após esse período inicial de incubação, as células aderentes foram tratadas ou não com diferentes concentrações do EEJ (125, 250 e 500 µg/mL) e em dois poços da quadruplicata foi adicionado LPS de *Salmonella typhosa* (67H4045 Sigma®) a uma concentração de 10 µg/mL como estímulo *in vitro*, e após 48 horas foi realizada a imunofenotipagem. As células foram marcadas com os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD14, conjugado FITC, anti-IA-IE, conjugado com PE e anti-CD86 conjugado com PE-Cy7. Em seguida, foi feita a análise simples dos marcadores CD14, IA-IE e CD86. Os dados representam a média ± erro padrão das médias de um experimento independente. # ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle tratado com LPS, * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, teste de *Mann-Whitney*.

5.4 Indução da polarização dos macrófagos

Os resultados referentes à indução da polarização das células RAW 264.7 para os perfis M1/M2 e suas respectivas produções de NO estão descritos no Apêndice A. Foi possível observar um aumento da frequência relativa, assim como, na expressão de IA-IE⁺ nos macrófagos estimulados com LPS e com LPS+IFN- γ . Por outro lado, os macrófagos estimulados com IL-4 e IL-13 apresentaram uma redução na frequência relativa das células IA-IE⁺. Em relação à expressão do CD86⁺, verificase um aumento da frequência relativa de macrófagos CD86⁺ estimulados com LPS ou IFN- γ e com LPS+IFN- γ . Enquanto que, os macrófagos estimulados com IL-4 e IL-13 apresentaram uma redução na frequência relativa dessas células. Somente os macrófagos estimulados com LPS e LPS+IFN- γ tiveram um aumento da expressão de células CD86⁺. Nos macrófagos tratados com LPS ou IFN- γ ou LPS+IFN- γ houve um aumento da produção de NO. Por outro lado, nos macrófagos tratados com IL-4 e IL-13 não foi observada nenhuma diferença na produção de NO, quando comparada com o grupo controle, contendo somente macrófagos e meio de cultura.

5.5 Efeito do EEJ sobre a polarização dos macrófagos

Na Figura 26 estão descritos os resultados do efeito do EEJ sobre macrófagos RAW 264.7 polarizados para os perfis M1/M2 e suas respectivas produções de NO. Verifica-se que o EEJ promoveu um aumento da frequência relativa, assim como, na expressão de IA-IE⁺ e CD86⁺ nos macrófagos polarizados tanto para o perfil M1 como M2 (Figura 26A), bem como, promoveu o aumento da produção de NO nesses macrófagos (Figura 26B).

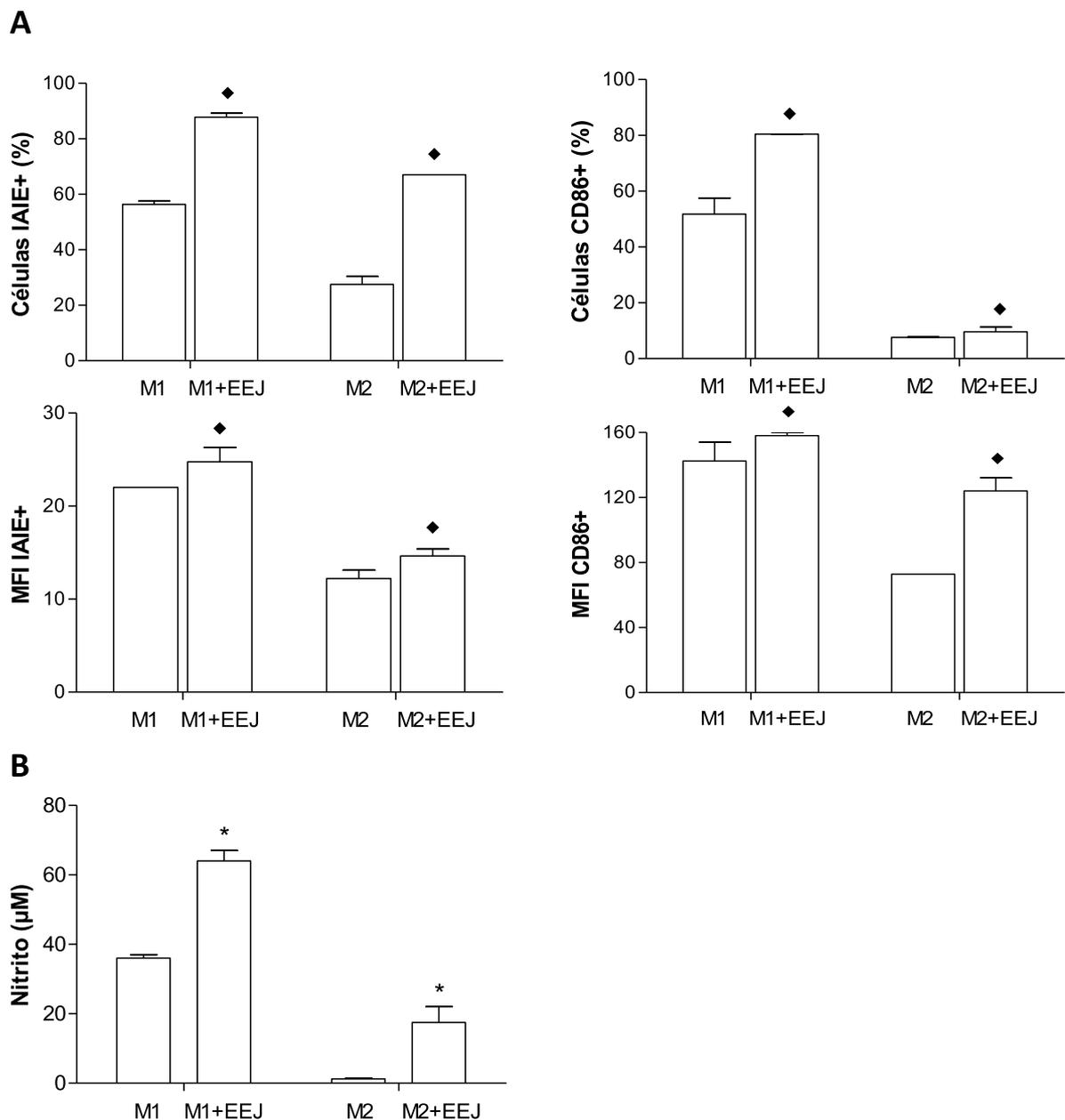


Figura 26 – Efeito do EEJ sobre macrófagos RAW 264.7 polarizados para o perfil M1 e M2 (A) e produção de NO (B). As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 48 poços e fundo chato a uma concentração de $5 \times 10^5/500 \mu\text{L}$ e incubadas 24 horas em meio RPMI a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após esse período inicial de incubação, induziu-se a polarização dos macrófagos da seguinte forma: para macrófagos M1 foram utilizados LPS (200 ng/mL) e $\text{IFN-}\gamma$ (10 ng/mL) e para macrófagos M2 foram utilizadas as citocinas IL-4 (40 ng/mL) e IL-13 (20 ng/mL). Logo em seguida, as células foram tratadas com o EEJ (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e após 24 horas foi realizada a imunofenotipagem. As células foram marcadas com os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-IA-IE, conjugado com PE e anti-CD86 conjugado com PE-Cy7. Em seguida, foi feita a análise simples dos marcadores IA-IE e CD86. Os dados representam a média \pm erro padrão das médias de um experimento independente. * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, teste de *Mann-Whitney*.



Discussão

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho inicialmente foi demonstrado o efeito citotóxico do extrato etanólico das folhas de *Croton triqueter* Lam. (EEJ) contra linhagem de células do tumor de Ehrlich. Estudos demonstrando o potencial citotóxico do EEJ são escassos, porém os dados obtidos neste trabalho corroboram com estudos realizados com espécies vegetais próximas a *Croton triqueter* Lam. sobre diversas linhagens de células tumorais. Compagnone et al. (2010) demonstraram o efeito citotóxico do óleo essencial das flores (CI₅₀: 103,27 e 87,91 µg/mL) e das folhas (CI₅₀: 45,85 e 54,95 µg/mL) sobre a linhagem de células LoVo e HeLa, respectivamente.

Uma vez verificada essa atividade citotóxica em células tumorais, houve a necessidade de se investigar o efeito em células não tumorais considerando que, se a célula normal e a tumoral exibissem sensibilidade similar ao extrato, não haveria janela terapêutica e, na concentração em que o tumor respondesse, a célula normal também responderia e esta seria danificada. Partindo, então, dessas considerações, avaliou-se a citotoxicidade do EEJ em células RAW 264.7, uma linhagem de macrófagos murinos, por meio do ensaio de MTT. Nesse ensaio, o EEJ na maior concentração (500 µg/mL) reduziu em 20,4% a viabilidade das células RAW 264.7, demonstrando, assim, uma citotoxicidade inespecífica desse extrato, fato este observado normalmente na maioria dos agentes antineoplásicos utilizados para o tratamento do câncer.

Dando prosseguimento aos estudos foram realizados ensaios *in vivo* a fim de caracterizar efetivamente a resposta antitumoral da espécie vegetal *Croton triqueter* Lam. Nesses experimentos, observou-se que o EEJ nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg promoveu um aumento na sobrevida dos animais portadores de tumor

ascítico de Ehrlich (TAE), quando comparado ao grupo controle. Além disso, foi investigado o efeito desse mesmo extrato sobre outros parâmetros relacionados com o desenvolvimento tumoral e observou-se que a dose de 500 mg/kg foi capaz de reduzir o peso dos animais, circunferência abdominal, volume total da ascite e o número de células tumorais totais. Por outro lado, as doses de 125 e 250 mg/kg, embora não tenham alterado o peso dos animais e volume total da ascite, foram capazes de reduzir o número de células tumorais presentes na cavidade peritoneal. Segundo Fernandes et al. (2015), a implantação da forma ascítica do tumor de Ehrlich induz uma resposta inflamatória local responsável pelo crescimento do tumor e constitui uma importante fonte nutricional direta para células cancerígenas (FECCHIO et al., 1990; GUPTA et al., 2004), ficando bem estabelecido que o processo inflamatório contribui diretamente para o desenvolvimento desse tipo de tumor. Sendo assim, uma possível explicação para redução do fluido ascítico acumulado na cavidade peritoneal dos camundongos tratados com o EEJ poderia estar relacionada à atividade anti-inflamatória exibida por esse extrato. Serra (2006) demonstrou que o EEJ na dose de 500 mg/kg inibiu a peritonite induzida por carragenina e apresentou efeito antiedematogênico, sugerindo que compostos presentes no extrato atuariam inibindo a liberação ou até mesmo a ação dos mediadores químicos da inflamação. Esses dados quando analisados em conjunto mostram que o EEJ pode estar atuando no processo inflamatório associado ao tumor.

Após essa análise inicial do EEJ sobre a sobrevida de animais inoculados com o tumor e sobre alguns parâmetros relacionados ao crescimento tumoral, decidiu-se avaliar os efeitos desse extrato na resposta imunológica de animais inoculados ou não com o tumor de Ehrlich e verificou-se que tanto nos animais inoculados com o tumor como nos não inoculados, o EEJ não provocou nenhuma alteração na

contagem global dos leucócitos, assim como, não alterou nenhum dos outros parâmetros hematológicos analisados. Porém, quando analisada a contagem diferencial dos leucócitos foi possível observar uma redução no número de leucócitos polimorfonucleares no sangue total dos camundongos inoculados com tumor e tratados com o EEJ, bem como, um aumento de linfócitos e monócitos. Já foi demonstrado que uma resposta neutrofílica inflamatória é essencial para o controle do tumor de Ehrlich. Entretanto, o grande influxo dessas células para a região promove o crescimento tumoral devido à angiogênese e aos fatores de crescimento induzidos pela resposta inflamatória e que são necessários para o desenvolvimento tumoral (BERGAMINI-SANTOS, MARIANO, BARBUTO, 2004).

Ainda foi observado que o EEJ não provocou nenhuma alteração na celularidade da medula óssea, o que o torna bastante promissor para o desenvolvimento de produtos que possam ser utilizados como adjuvantes no tratamento do câncer. Mielossupressão e supressão da resposta imune são consideradas reações adversas comuns à grande maioria dos antineoplásicos, levando aos casos de anemia, trombocitopenia e maior susceptibilidade às infecções. Essas reações acontecem porque a maioria dos antineoplásicos afetam as células normais de rápida divisão celular, como é o caso da medula óssea (SOUZA et al., 2008). De forma semelhante, o EEJ por si só não foi capaz de gerar alterações hematológicas em camundongos saudáveis (RESELL et al., 2014).

Em relação às células do baço, o EEJ na dose de 500 mg/kg foi capaz de promover um aumento no número dessas células em relação ao grupo controle. Esse aumento foi demonstrado tanto para os animais inoculados com tumor quanto nos animais não inoculados, podendo estar relacionado a uma possível ativação do sistema imune (ASSUNÇÃO, 2011). Por outro lado é sabido que o tumor de Ehrlich

tem a capacidade de produzir fatores estimuladores de colônias (CSFs), assim como, receptores para estes CSFs (SUBIZA et al., 1989), induzindo, entre outras alterações, hematopoese extramedular com esplenomegalia (RUIZ DE MORALES, VÉLEZ, SUBIZA, 1999). Logo, essa grande quantidade de células do baço poderia não estar relacionada a uma efetivação da resposta imunológica e esse aumento poderia ser decorrente da proliferação e/ou migração de células imaturas ou supressoras (LIU et al., 2007). Então, a fim de caracterizar as populações celulares presentes no baço dos animais inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com o EEJ foi realizada a avaliação fenotípica das principais subpopulações celulares envolvidas na resposta imunológica frente ao tumor de Ehrlich.

Nesta avaliação, o EEJ promoveu um aumento da frequência absoluta de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço dos animais inoculados com tumor, sugerindo uma participação importante dessas populações celulares na atividade antitumoral exercida pelo EEJ. Como é sabido, os linfócitos T CD8⁺ eliminam as células tumorais por uma ação citotóxica direta, por um mecanismo MHC classe I dependente, já os linfócitos T CD4⁺ participam dessa resposta secretando citocinas que ativam linfócitos T CD8⁺, células NK, macrófagos, entre outras células, que, por sua vez, podem, potencialmente, matar as células tumorais (VESELY et al., 2011). Além disso, o EEJ também induziu um aumento na frequência absoluta de células T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando o receptor CD28.

CD28 é uma proteína expressa em células T que fornecem sinais co-estimuladores necessários para a ativação e proliferação das células T. Estudos mostram que a ligação das moléculas B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86) ao CD28 presentes na superfície dos linfócitos T, em adição à ligação do receptor T (TCR) antígeno-específico ao conjunto principal de histocompatibilidade (MHC)/peptídeo,

leva à ativação e proliferação dos linfócitos T, produção de citocinas e previne a indução de anergia celular (MANZOTTI et al., 2006). Esses resultados indicam uma possível capacidade do EEJ em agir sobre o sistema imunológico dos animais inoculados com tumor e, assim, melhorar a resposta antitumoral.

Somando-se a isso, foi observado que os animais tratados com o EEJ na dose de 500 mg/kg tiveram um aumento no número de células CD3⁻CD49b⁺NK1.1⁺, perfil fenotípico de células NK, assim como, de células NKT (CD3⁺CD49b⁺NK1.1⁺) e células apresentadoras de antígenos (IA-IE⁺Ly6C-Ly6G⁺CD86⁺).

Células NK são células capazes de reconhecer e destruir células tumorais e células infectadas por vírus, por meio de mecanismos líticos diretos e pela secreção de IFN- γ (DESBOIS et al., 2012; YOON, KIM, CHOI, 2015). Essa capacidade tumoricida ainda é aumentada pela liberação de citocinas, incluindo interferons e algumas interleucinas (IL-2 e IL-12) (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Estudos mostram que pacientes com câncer gastrointestinal, cólon e próstata apresentam um elevado nível de células Treg associadas com uma redução do número de células NK, juntamente com sua funcionalidade (DOUBROVINA, et al., 2003; WU et al., 2004; GHIRINGHELLI et al., 2005). Estudos *in vitro* demonstram que células Treg de pacientes com carcinoma hepatocelular inibem a atividade citotóxica de células NK. De forma semelhante, no tumor de Ehrlich, estudos como o de Segura, Barbero, Márquez (2000) afirmam que durante o desenvolvimento tumoral, também ocorre perda progressiva dessas células, o que pode ter sido revertido pela ação do EEJ.

Células NKT correspondem a uma população de células T que desempenham um papel central no sistema imunológico, uma vez que formam uma ponte entre os sistemas imunes inato e adaptativo, elas têm verdadeiros TCR e a especificidade ao antígeno, como as células T convencionais, ainda que por lipídeos,

em vez de peptídeos, mas também têm um repertório mais limitado e característico de resposta rápida do sistema imune inato. As células NKT são descritas por ter um efeito paradoxal em diferentes tipos de tumores, porém não há relatos da participação dessas células durante o desenvolvimento do tumor de Ehrlich (BERZOFSKY & TERABE, 2009; VIVIER et al., 2012; MCEWEN-SMITH, SALIO, CERUNDOLO, 2015). Esse efeito paradoxal descrito na literatura está relacionado pelas diferentes variantes de células NKT que podem agir inibindo ou contribuindo com o desenvolvimento tumoral. Sendo assim, podemos sugerir que neste trabalho, o fato do EEJ (500 mg/kg) ter inibido o desenvolvimento tumoral pode estar relacionado com uma variante relacionada com a inibição do desenvolvimento tumoral, entretanto, são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

Com relação às células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B), estas são células imunes que através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)/peptídeos, moléculas co-estimuladoras e produção de citocinas são essenciais para ativação e regulação da resposta mediada pelos linfócitos T. Neste trabalho foi possível observar que nos animais tratados com o EEJ (500 mg/kg) houve um aumento de células IA-IE⁺Ly6C-Ly6G⁺CD86⁺. IA-IE⁺ corresponde uma proteína do MHC de classe II essencial para apresentação dos antígenos. CD86⁺ é uma das moléculas co-estimuladoras mais bem caracterizadas, sendo expressa predominantemente na superfície das células apresentadoras de antígenos profissionais. A participação dessa molécula na modulação imune de linfócitos T constituiu, possivelmente, uma das principais vias de comunicação celular relevante, atuando na indução da resposta imune efetiva. Por esse motivo, tal molécula é considerada como um dos alvos terapêuticos promissores. Evidências apontam que a ligação com o CD28⁺, presente na superfície do linfócito T, em adição

à ligação do receptor T (TCR) antígeno-específico ao conjunto (MHC)/peptídeo, leva à ativação e proliferação dos linfócitos T e produção de citocinas (BEYERSDORF, KERKAU, HÜNIG, 2015). Sendo assim, esses dados sugerem a capacidade do EEJ em aumentar a apresentação de antígenos e conseqüentemente a ativação dos linfócitos T.

Além dessas alterações no perfil celular, outro fator importante que auxilia o desenvolvimento de células neoplásicas é um desequilíbrio no perfil de citocinas, sendo bem evidenciado durante o desenvolvimento do tumor de Ehrlich (VALADARES, KLEIN, QUEIROZ, 2004; RAMOS, TORELLO, QUEIROZ, 2010). Segundo Fernandes et al. (2015), o tumor de Ehrlich quando inoculado na cavidade peritoneal induz um aumento acentuado dos níveis de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6. Sendo assim, este trabalho ainda investigou o efeito do EEJ sobre a concentração de citocinas na ascite e no soro de animais inoculados ou não com o tumor de Ehrlich, na qual foi possível observar que o EEJ promoveu um aumento de IFN- γ nos animais inoculados com o tumor.

IFN- γ está relacionado ao reconhecimento e destruição de células-alvo por regulação positiva de moléculas do MHC de classes I e II, ativação de macrófagos e linfócitos. A ativação de macrófagos pelo IFN- γ tem sido considerado um excelente marcador de resposta imune contra patógenos intracelulares, células tumorais, bem como certas reações autoimunes (KODAMA, KOMUTA, NANBA, 2002; FURUSAWA et al., 2003). Além disso, IFN- γ consegue estimular os macrófagos a produzirem citocinas que são capazes de desempenhar mecanismos antimicrobianos, tumorocidas e ativar APCs (FARRAR & SCHREIBER, 1993; MURRAY, 1994). Assim, esse aumento de IFN- γ pode estar relacionado a maior capacidade de ativação dos linfócitos T citotóxicos e células APCs.

Por outro lado, somente as doses de 125 e 250 mg/kg aumentaram a concentração de TNF- α . Essa é uma citocina considerada por levar a célula tumoral à apoptose ou causar coagulação, obstruindo capilares do microambiente tumoral, levando o tumor à necrose (JONASCH & HALUSKA, 2001; VAN HORSSSEN, TEN HAGEN, EGGERMONT, 2006). Por outro lado, revisões recentes apontam a participação do TNF- α no processo de iniciação, promoção e progressão tumoral, seu efeito pró-inflamatório ligado a várias doenças está relacionado à sua capacidade para ativar NF-KB, na qual aumenta a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimento, enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). TNF- α tem sido, portanto, uma citocina considerada como um importante fator de crescimento para muitas células tumorais (BALKWILL, 2009; VIANA et al., 2015).

Em relação à IL-6, foi demonstrado, que nos animais tratados com o EEJ houve uma redução dose dependente desta citocina. Estudos revelam que a IL-6 está envolvida na transformação maligna, progressão do tumor e caquexia através da inibição da apoptose de células cancerígenas e na indução de angiogênese tumoral. Para Chaftari et al. (2015), a IL-6 corresponde uma potente estimuladora de metástase, uma vez que regula a expressão de receptores de adesão em células endoteliais, assim como, estimula a produção de fatores de crescimento. Em geral, a detecção de IL-6 em amostras de soro ou de tecidos de pacientes com câncer ou de animais portadores de tumor correlaciona-se com mau prognóstico (GRIVENNIKOV & KARIN, 2008; WALDNER & NEURATH, 2008; NAUGLER & KARIN, 2008).

Além disso, a IL-6 também é responsável pela expressão de várias citocinas regulatórias como TGF- β e IL-10 via STAT3 nos linfócitos T, que auxiliam as células tumorais a escaparem da resposta imunológica (DUNN, OLD, SCHREIBER,

2004; STUMHOFER et al., 2007; SARAIVA & O'GARRA, 2010). Neste trabalho, verificamos um aumento de IL-10 somente nos animais tratados com o EEJ na dose de 125 mg/kg, porém, o extrato nessa dose promoveu aumento não só de IL-10 como também de outras citocinas, o que pode estar relacionado a uma tentativa de controlar o desenvolvimento tumoral (VALADARES, KLEIN, QUEIROZ, 2004; RAMOS, TORELLO, QUEIROZ, 2010).

Considerando que o EEJ aumentou a frequência absoluta de células apresentadoras de antígenos no baço, e que os macrófagos ocupam um papel central no combate a células neoplásicas, decidiu-se investigar o efeito desse extrato sobre os macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS. Sendo possível observar que nos macrófagos estimulados com LPS e tratados com o EEJ, houve uma redução dos níveis de IL-6, indicando que o EEJ apresenta uma capacidade de reduzir a liberação dessa citocina.

Quanto a análise fenotípica desses macrófagos, foi possível observar que após tratamento com o EEJ houve um aumento da expressão de CD14⁺, IA-IE⁺ e CD86⁺, mostrando a capacidade do EEJ em polarizar os macrófagos para o perfil M1. Macrófagos M1 são reconhecidos por sua capacidade de produzir níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, elevada expressão de iNOS, MHC de classe II, moléculas co-estimuladoras, eficiência na apresentação de antígenos, atividade microbicida e tumoricida. Essa capacidade do EEJ em polarizar os macrófagos para o perfil M1 pode contribuir com a atividade antitumoral *in vivo*, embora muitos autores descrevam que uma resposta inflamatória contribui para desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (FERNANDES et al., 2015).

Por fim, ainda foi avaliado o efeito do EEJ sobre macrófagos polarizados para os perfis M1 e M2. Inicialmente, foi demonstrado que macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS e IFN- γ apresentaram um aumento da expressão IA-IE, CD86, assim como aumento na produção de NO, porém, os macrófagos quando estimulados só com IFN- γ , embora não tenham tido aumento na expressão de IA-IE e CD86, foram capazes de aumentar a produção de NO. Em relação aos macrófagos estimulados com IL-4 e IL-13, estes apresentaram diminuição da produção de NO, fato já esperado, pois macrófagos estimulados com essas citocinas são polarizados para o perfil M2. De posse desses dados, considerou-se, então, macrófagos polarizados para o perfil M1 aqueles estimulados com LPS+IFN- γ e para o perfil M2 aqueles estimulados com IL-4 e IL-13 e, semelhantemente ao observado no ensaio com os macrófagos não polarizados, o EEJ aumentou a expressão dos marcadores IA-IE e CD86⁺, tanto no perfil M1 quanto no perfil M2 e, apesar de não terem sido analisados marcadores específicos para o perfil M2, observa-se essa capacidade do EEJ em polarizar os macrófagos para o perfil M1.

Desta forma, pode-se concluir que o EEJ apresenta atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* e que os mecanismos descritos neste trabalho como aumento do número de linfócitos T *helper*, citotóxicos, células NK e apresentadoras de antígenos no baço, assim como, a ativação dos macrófagos e a polarização dos macrófagos para o perfil M1 podem estar contribuindo na resposta antitumoral.



Considerações Finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir que o extrato etanólico das folhas de *Croton triqueter* Lam. apresenta efeito direto sobre as células do tumor de Ehrlich, assim como, efeito sobre o sistema imunológico dos animais portadores de tumor, uma vez que a indução da morte do tumor pode ter ocorrido não só pela atividade citotóxica desse extrato, como também uma capacidade em ativar células importantes da resposta antitumoral. Assim, a espécie vegetal *Croton triqueter* Lam. demonstrou ser uma excelente fonte para produção de medicamentos que possam ser utilizados como adjuvantes no tratamento do câncer.

Diante dessas considerações, nossos resultados apresentam novas vias de estudos que podem ser exploradas, dentre elas a necessidade de isolar e caracterizar a(s) substância(s) ativa(s) responsável(eis) por tal(is) atividade(s), assim como, caracterizar o efeito do EEJ sobre a polarização de macrófagos no tumor de Ehrlich.

Conclusões Gerais

8 CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ O EEJ apresentou citotoxicidade *in vitro* sobre as células do carcinoma de Ehrlich em todas as concentrações testadas (62,5, 125, 250 e 500 µg/mL);
- ✓ Apenas a concentração de 500 µg/mL apresentou citotoxicidade em cultura de macrófagos RAW 264.7;
- ✓ O tratamento com o EEJ aumentou a sobrevida e reduziu o número de células tumorais presentes na cavidade peritoneal de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich;
- ✓ O EEJ não alterou o hemograma, o número de células da medula óssea e do linfonodo mesentérico dos animais inoculados ou não com o tumor de Ehrlich;
- ✓ O EEJ nas doses de 125 e 500 mg/kg promoveu um aumento no número de células do baço dos animais sadios. A dose de 500 mg/kg também foi capaz de promover um aumento no número de células do baço dos animais inoculados com tumor;
- ✓ Houve uma redução de IL-6, de forma dose dependente, e um aumento de IFN- γ na ascite dos animais inoculados com tumor e tratados com o EEJ;
- ✓ Houve um aumento de TNF- α na ascite dos animais tratados com o EEJ (125 e 250 mg/kg);
- ✓ Os animais inoculados com o tumor de Ehrlich e tratados com EEJ (125 mg/kg) apresentaram um aumento da produção de IL-10 na ascite;
- ✓ Os animais inoculados com o tumor de Ehrlich e tratados com EEJ (125 mg/kg) apresentaram uma redução de IL-6 e um aumento de IFN- γ no soro;
- ✓ O EEJ (125 e 250 mg/kg) promoveu um aumento de TNF- α no soro;

-
- ✓ O EEJ (500 mg/kg) aumentou a frequência absoluta de células NK, NKT e apresentadoras de antígenos ativadas no baço;
 - ✓ O EEJ em todas as doses aumentou a frequência absoluta de células T citotóxicas ativadas no baço;
 - ✓ O EEJ (125 e 500 mg/kg) aumentou a frequência absoluta de células T *helper* ativadas no baço;
 - ✓ O EEJ reduziu *in vitro* a produção de IL-6 em células RAW 264.7 estimuladas com LPS;
 - ✓ O EEJ aumentou a expressão de CD14⁺, IA-IE⁺ e CD86⁺ em macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS. Assim como, aumentou a expressão IA-IE⁺ e CD86⁺ em macrófagos polarizados para os perfis M1 e M2.



Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ABOAGYE, F. A.; SAM, G. H.; MASSIOT, G.; LAVAUD C. Julocrotine, aglutarimide alkaloid from *Croton membranaceus*. **Fitoterapia**, v.71, pp.461-462, 2000.
- ADEEGBE, D. O.; NISHIKAWA, H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. **Frontiers in immunology**, v.4, pp.1-14, 2013.
- ALONSO-CASTRO, A. J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; DOMÍNGUEZ, F.; LÓPEZ-TOLEDO, G.; CHÁVEZ, M.; ORTIZ-TELLO ADE, J.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, n.2, pp.438-442, 2012.
- ASSUNÇÃO, A. K. M. **Efeito antitumoral do tratamento com extrato Bhidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em modelo experimental de tumor de Ehrlich**. 2011. 107f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA, 2011.
- BALA, A.; KAR, B.; HALDAR, P. K.; MAZUMDER, U. K.; BERA, S. Evaluation of anticancer activity of *Cleome gynandra* on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, pp.131-134, 2010.
- BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.9, n.5, pp.361-371, 2009.
- BARBOSA, P. S.; ABREU, A.; BATISTA, E. F.; GUILHON, G. M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, A. C.; SECCO, R. S. Glutarimide alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var *glabrior* Lanj. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, pp.887-890, 2007.
- BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; FREITAS, J. V. B.; PINTO, F. C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; TORRES, D. S. C. Flavonoids and terpenoids from *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v.36, n.5, pp. 675-679, 2013.
- BERGAMINI-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, pp.245-255, 2004.
- BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN EE, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v.92, pp.1520-1534, 2005.
- BERZOFKY, J. A.; TERABE, M. The Contrasting Roles of NKT Cells in Tumor Immunity. **Current Molecular Medicine**, v.9, n.6, pp.667-672, 2009.
- BEYERSDORF, N.; KERKAU, T.; HÜNIG, T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. **ImmunoTargets and Therapy**, v.4, pp.111-122, 2015.

- BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBÊLO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16(supl.), pp.631-637, 2006.
- BINCOLETTO, C.; EBERLIN, S.; FIGUEIREDO, C. A.; LUENGO, M. B.; QUEIROZ, M. L. Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. **International Immunopharmacology**, v.5, pp.679-688, 2005.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v.11, pp.889-896, 2010.
- CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, v.73, n.2, pp.116-120, 2002.
- CARNEIRO-TORRES, D. S. **Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Bioma Caatinga**. 2009. 296 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana – BA, 2009.
- CATARINO, R.; PETIGNAT, P.; DONGUI, G.; VASSILAKOS P. Cervical cancer screening in developing countries at a crossroad: Emerging technologies and policy choices. **World Journal of Clinical Oncology**, v.6, n.6, pp.281-290, 2015.
- CHAFTARI, A. M.; HACHEM, R.; REITZEL, R.; JORDAN, M.; JIANG, Y.; YOUSIF, A.; GAROGE, K.; DESHMUKH, P.; AL HAMAL, Z.; JABBOUR, J.; HANANIA, A.; RAAD, S.; JAMAL, M.; RAAD, I. Role of Procalcitonin and Interleukin-6 in Predicting Cancer, and Its Progression Independent of Infection. **PLoS One**, v.10, n.7, e0130999, 2015.
- CHEN, P.; HUANG, Y.; BONG, R.; DING, Y.; SONG, N.; WANG, X.; SONG, X.; LUO, Y. Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. **Clinical Cancer Research**, v.17, n.23, pp.7230-7239, 2011.
- COMPAGNONE, R. S.; CHAVEZ, K.; MATEU, E.; ORSINI, G.; ARVELO, F.; SUÁREZ, A. I. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Records of Natural Products**, v.4, n.2, pp.101-108, 2010.
- CORDEIRO, I. Euphorbiaceae. In: Stannard, B.L. (ed.). Flora do Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia-Brasil. **Kew, Royal Botanic Gardens**, pp.300-317, 1995.
- CORDELL, G. A. **Introduction to alkaloids: a biogenetic approach**. New York: Wiley Interscience, 1981.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura; 1984.
- DA SILVA, R. J.; DA SILVA, M. G.; VILELA, L. C.; FECCHIO, D. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with *Bothrops jararaca* venom. **Mediators of Inflammation**, v.11, pp.197-201, 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, pp.97-103, 1992.
- DAI, F.; LIU, L.; CHE, G.; YU, N.; PU, Q.; ZHANG, S.; MA, J.; MA, L.; YOU, Z. The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer. **BMC Cancer**, v.10, n.220, pp.1-10, 2010.
- DESBOIS, M.; RUSAKIEWICZ, S.; LOCHER, C.; ZITVOGEL, L.; CHAPUT, N. Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies. **Frontiers in Immunology**, v.3, n.395, pp.1-12, 2012.
- DIDKOWSKA, J.; WOJCIECHOWSKA, U.; MAŃCZUK, M.; ŁOBASZEWSKI J. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. **Annals of Translational Medicine**, v.4, n.8, p.150, 2016.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v.141, pp. 2407-2412, 1988.
- DOUBROVINA, E. S.; DOUBROVIN, M. M.; VIDER, E.; SISSON, R. B.; O'REILLY, R. J.; DUPONT, B.; VYAS, Y. M. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. **Journal of Immunology**, v.171, pp.6891-6899, 2003.
- DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity**, v.21, pp.137-149, 2004.
- EHRlich, P. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. **Arb. Inst. Exp. Ther. Frankfurt**, v.1, pp.78-80, 1906.
- ELGERT, K. D.; ALLEVA, D. G.; MULLINS, D. W. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **Journal of Leukocyte Biology**, v.64, pp.275-290, 1998.
- FACUNDO, F. C. **Análise fitoquímica da espécie vegetal *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter* coletadas em períodos diferentes**. 2003. 62p. Monografia (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA, 2003.
- FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annual Review of Immunology**, v.11, pp.571-611, 1993.
- FARNSWORTH, N. R.; BLOMSTER, R. N.; MESSMER, W. M.; KING, J. C.; PERSINOS, G. J.; WILKES, J. D. A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. **Lloydia**, v.32, n.1, pp.1-28, 1969.
- FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANEAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v.14, pp.125-131, 1990.
- FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil

of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v.569, n.3, pp.228-236, 2007.

FERNANDES, P. D.; GUERRA, F. S.; SALES, N. M.; SARDELLA, T. B.; JANCAR, S.; NEVES, J. S. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.71, pp.83-89, 2015.

FORSSELL, J.; OBERG, A.; HENRIKSSON, M. L.; STENLING, R.; JUNG, A.; PALMQVIST, R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. **Clinical Cancer Research**, v.13, n.5, pp.1472-1479, 2007.

FURUSAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY, S.; JENSEN, J. Antitumour potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma 180 ascites tumour in mice. **Phytotherapy Research**, v.17, n.10, pp.1158-1164, 2003.

GHIRINGHELLI, F.; MÉNARD, C.; TERME, M.; FLAMENT, C.; TAIEB, J.; CHAPUT, N.; PUIG, P. E.; NOVAULT, S.; ESCUDIER, B.; VIVIER, E.; LECESNE, A.; ROBERT, C.; BLAY, J. Y.; BERNARD, J.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; FREITAS, A.; TURSZ, T.; WAGNER-BALLON, O.; CAPRON, C.; VAINCHENCKER, W.; MARTIN, F.; ZITVOGEL, L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. **The Journal of Experimental Medicine**, v.202, pp.1075-1085, 2005.

GRIVENNIKOV, S.; KARIN, M. Autocrine IL-6 Signaling: A Key Event in Tumorigenesis? **Cancer Cell**, v.13, n.1, pp.7-9, 2008.

GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de Tumor de Ehrlich**. 1983. 87f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo – SP, 1983.

GUPTA, M. U.; MAZUMDER, K.; KUMAR, R. S.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L. M. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.94, pp.177-184, 2004.

HAAS, M.; DIMMLER, A.; HOHENBERGER, W.; GRABENBAUER, G. G.; NIEDOBITEK, G.; DISTEL, L. V. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. **BMC Gastroenterology**, v.9, n.65, pp.1-10, 2009.

HAO, N. B.; LÜ, M. H.; FAN, Y. H.; CAO, Y. L.; ZHANG, Z. R.; YANG, S. M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, v.2012, pp.01-11, 2012.

HASHIMOTO, I.; KODAMA, J.; SEKI, N.; HONGO, A.; MIYAGI, Y.; YOSHINOCHI, M.; KUDO, T. Macrophage infiltration and angiogenesis in endometrial cancer. **Anticancer Research**, v.20, pp.4853-4856, 2000.

HUME, D. A. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. **Mucosal Immunology**, v.1, pp.432-441, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade de câncer no Brasil. 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>>. Acesso em: 15/12/2015.

ISLAM, F.; KHATUN, H.; KHATUN, M.; ALI, S. M.; KHANAM, J. A. Growth inhibition and apoptosis of Ehrlich ascites carcinoma cells by the methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis*. **Pharmaceutical Biology**, v.2, n.3, pp.281-90, 2014.

JAKÓBISIAK, M.; LASEK, W.; GOLAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, v. 90, pp.103-122, 2003.

JONASCH, E.; HALUSKA, F. G. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. **Oncologist**, v.6, pp.34-55, 2001.

JÚNIOR, F. E.; DE OLIVEIRA, D. R.; BENTO, E. B.; LEITE, L. H.; SOUZA, D. O.; SIEBRA, A. L.; SAMPAIO, R. S.; MARTINS, A. O.; RAMOS, A. G.; TINTINO, S. R.; LACERDA-NETO, L. J.; FIGUEIREDO, P. R.; OLIVEIRA, L. R.; RODRIGUES, C. K.; SALES, V. S.; FIGUEIREDO, F. R.; NASCIMENTO, E. P.; MONTEIRO, A. B.; AMARO, E. N.; COSTA, J. G.; DOUGLAS MELO COUTINHO, H.; DE MENEZES, I. R.; KERNTOPF, M. R. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in Rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, 579346, 2013.

JUSTO, G. Z.; DURAN, N.; QUEIROZ, M. L. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation, and cytokine profile in tumor-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.25, pp.305-319, 2003.

KODAMA, N.; KOMUTA, K.; NANBA, H. Can maitake MD-fraction aid cancer patients? **Alternative Medicine Review**, v.7, n.3, pp.236-239, 2002.

LIMA, S. G.; NETO, J. M. M.; CITO, A. M. G. L.; DA COSTA, J. G. M.; REIS, F. A. M. Monoterpenes, sesquiterpenes and fatty acids from *Julocroton triqueter* (Euphorbiaceae) from Ceará-Brasil. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.54, n.1, pp.55-57, 2009.

LIU, C.; YU, S.; KAPPES, J.; WANG, J.; GRIZZLE, W. E.; ZINN, K. R.; ZHANG, H. G. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. **Blood**, v.109, pp.4336-4342, 2007.

LIU, H.; WANG, S.; CHEN, S.; CHEN, C.; LO, J.; LIN, T. Immune modulation of CD4+CD25+ regulatory T cells by zoledronic acid. **BMC Immunology**, v.17, n.45, 2016.

LIU, X.; MA, X.; LEI, Z.; FENG, H.; WANG, S.; CEN, X.; GAO, S.; JIANG, Y.; JIANG, J.; CHEN, Q.; TANG, Y.; TANG, Y.; LIANG, X. Chronic Inflammation-Related HPV: A Driving Force Speeds Oropharyngeal Carcinogenesis. **PLoS One**, v.10, n.7, e0133681, 2015.

LIU, Q.; TIAN, Y.; ZHAO, X.; JING, H.; XIE, Q.; LI, P.; LI, D.; YAN, D.; ZHU, X. NMAAP1 Expressed in BCG-Activated Macrophage Promotes M1 Macrophage Polarization. **Molecules and Cells**, v.38, n.10, pp.886-894, 2015.

MALE, D.; BROSTOFF, J.; ROTH, D. **Immunology** 7th., St. Louis Mosby, 564p. 2006.

- MANTOVANI, A.; BOTTAZZI, B.; COLOTTA, F.; SOZZANI, S.; RUCO, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunology Today**, v.13, pp.265-270, 1992.
- MANTOVANI, A.; GERMANO, G.; MARCHESI, F.; LOCATELLI, M.; BISWAS, S. K. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. **European Journal of Immunology**, v.41, n.9, pp.2522-2525, 2011.
- MANZOTTI, C. N.; LIU, M. K.; BURKE, F.; DUSSABLY, L.; ZHENG, Y.; SANSOM, D. M. Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86. **European Journal of Immunology**, v.36, n.6, pp.1413-1122, 2006.
- MCEWEN-SMITH, R. M.; SALIO, M.; CERUNDOLO, V. The Regulatory Role of Invariant NKT Cells in Tumor Immunity. **Cancer Immunology Research**, v.3, n.5, pp.425-435, 2015.
- MELVOLD, R. W.; STICCA, R. P. Basic and tumor immunology: a review. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v.16, n.4, pp.711-735, 2007.
- MOUGIAKAKOS, D.; CHOUDHURY, A.; LLADSER, A.; KIESSLING, R.; JOHANSSON, C. C. Regulatory T cells in cancer. **Advances in Cancer Research**, v.107, pp.57-117, 2010.
- MOREIRA, V. R.; DIAS, A. C.; MARTINS, A. R.; LIMA, M. I.; SERRA, I. C. P. B.; RIBEIRO, M. N.; NASCIMENTO, F. R.; PEREIRA, S. R. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of antileishmanial extract from *Julocroton triqueter* (Euphorbiaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.12, n.2, pp.132-142, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, pp.55-63, 1983.
- MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; COFFELT, S. B.; LEWIS, C. E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v.8, pp.618-631, 2008.
- MURRAY, H. W. Interferon- γ and host antimicrobial defense. **American Journal of Medicine**, v.97, pp.459-467, 1994.
- NARDI, G. M.; FELIPPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; MONACHE, F. D. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* Bark. **Phytomedicine**, v.10, n.2-3, pp.176-184, 2003.
- NASCIMENTO, F. R. F.; CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, E. S. B.; GUERRA, R. N. M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v.78, pp.2650-2653, 2006.
- NAUGLER, W. E.; KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v.14, n.3, pp.109-119, 2008.
- NEGRIN, L. G. C. Epidemiology of cervical cancer in Latin America. **Ecancermedicalscience**, v.9, n.577, 2015.

- NISHIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. **Current Opinion in Immunology**, v.27, pp.1-7, 2014.
- OKOKON, J. E.; NWAFOR, P. A. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of ethanolic root extract of *Croton zambesicus*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n.4, pp.385-392, 2010.
- ONG, S. M.; TAN, Y. C.; BERETTA, O.; JIANG, D.; YEAP, W. H.; TAI, J. J.; WONG, W. C.; YANG, H.; SCHWARZ, H.; LIM, K. H.; KOH, P. K.; LING, K. L.; WONG, S. C. Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. **European Journal of Immunology**, v.42, n.1, pp.89-100, 2012.
- OCHSENBEIN, A. F. Immunological ignorance of solid tumor. **Springer Seminars in Immunology**, v.27, pp.19-35, 2005.
- OLEINIKA, K.; NIBBS, R. J.; GRAHAM, G. J.; FRASER, A. R. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. **Clinical & Experimental Immunology**, v.171, n.1, pp.36-45, 2013.
- PALMEIRA JR., S. F.; ALVES, V. L.; MOURA, F. S.; VIEIRA, L. F. A.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, pp.397-402, 2006.
- PARDOLL, D. M.; TOPALIAN, S. L. The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity. **Current Opinion in Immunology**, v.10, pp.588-594, 1998.
- PAYO HILL, A.; DOMINICIS, M. E.; MAYOR, J.; OQUENDO, M.; SARDUY, R. Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmácia**, v.35, n.3, pp.203-206, 2001.
- PEDROZA-PACHECO, I.; MADRIGAL, A; SAUDEMONT, AURORE. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. **Cellular and Molecular Immunology**, v.10, n.3, pp.222-229, 2013.
- PETRILLO, M.; ZANNONI, G. F.; MARTINELLI, E.; PEDONE ANCHORA, L.; FERRANDINA, G.; TROPEANO, G.; FAGOTTI, A.; SCAMBIA, G. Polarisation of Tumor-Associated Macrophages toward M2 Phenotype Correlates with Poor Response to Chemoradiation and Reduced Survival in Patients with Locally Advanced Cervical Cancer. **PLoS One**, v.10, n.9, e0136654, 2015.
- PIRES, A. M. S. **Atividade anti-leishmania de *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter***. 2012. 116f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal: Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA, 2012.
- POGGI, A.; ZOCCHI, M. R. Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v.54, pp.323-333, 2006.
- PORTO, H. K. P. **Avaliação do potencial antitumoral de dois novos complexos de rutênio (II) contendo alanina e triptofano em suas estruturas**. 2012. 75p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO, 2012.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v.19, n.11, pp.1423-1437, 2013.

QUEIROZ, M. L.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R.; MULLER, A. H. Adjuvant effect of *Pluchea quitoc* extract on the resistance of tumor-bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.23, n.2, pp.215-228, 2001.

RAMOS, A. L.; TORELLO, C. O.; QUEIROZ, M. L. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**, v.62, pp.1170-1180, 2010.

RANAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.4, pp.89-96, 2004.

RESELL, T. I.; PORFIRIO, L. C.; SOUZA, A. S.; SILVA, I. S. Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.29, n.5, pp.306-312, 2014.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.6, pp.1895-1901, 2003.

RUIZ DE MORALES, J.; 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. **Experimental Hematology**, v.27, pp.1757-1767, 1999.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal of Immunology**, v.155, n.3, pp.1151-1164, 1995.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, pp.11-33, 2007.

SANTOS, O. J.; SAUAIA FILHO, E. N.; NASCIMENTO, F. R.; JÚNIOR, F. C.; FIALHO, E. M.; SANTOS, R. H.; SANTOS, R. A.; SERRA, I. C. Use of raw *Euphorbia tirucalli* extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **A Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.43, n.1, pp.18-21, 2016.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v.10, n.3, pp.170-181, 2010.

SCHREIBER, R. D. Cancer vaccines 2004 opening address: the molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Cancer Immunity*, v.5, supl.1, pp.1-8, 2005.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MÁRQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Lett.*, v.414, p.1-6, 1997.

- SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MÁRQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cell to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunology Letters*, v.74, p.111-115, 2000.
- SERRA, I. C. P. B. **Atividades analgésica e antiinflamatória de *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter* (velame)**. 2006. 61p. Monografia (Graduação em Farmácia-Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA, 2006.
- SERRA, I. C. P. B. ***Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter*: estudos antitumorais e toxicológicos**. 2009. 86f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA, 2009.
- SHAMMA, M. **The isoquinoline alkaloids, chemistry and pharmacology**. Academic Press, New York & London, v.25, 1972.
- SHEEJA, K.; KUTTAN, G. Activation of cytotoxic T lymphocyte responses and attenuation of tumor growth in vivo by *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v.29, n.1, pp.81-93, 2007.
- SHIMURA, S.; YANG, G.; EBARA, S.; WHEELER, T. M.; FROLOV, A.; THOMPSON, T. C. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Research*, v.60, pp.5857-5861, 2000.
- SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v.3, n.6, pp.452-456, 2001.
- SMYTH, M. J.; GODFREY, D. I.; TRAPANI, J. A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*, v.2, pp.293-299, 2001.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. *Biometry: The principle and practice of statistics. Biological Research*, 2.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1996.
- SOUZA, W. A.; NEGRÃO, A. J. M.; GARCIA FILHO, C.; FERREIRA, V. H.; LINO, R. S.; FREITAS, R. E.; BIAZOTTO, G.; PEREIRA, D. M. Toxicidade de antineoplásicos. Revisão bibliográfica. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.6, pp.1-6, 2008.
- SREEDEVI, A.; JAVED, R.; DINESH A. Epidemiology of cervical cancer with special focus on India. *International Journal of Women's Health*, v.7, pp.405-414, 2015.
- STARLING, M. F. V. Aspectos taxonômicos do *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter* do Campus da UFES, Vitória-ES. **Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC-MG**, v.1, n.1, pp.7-13, 1993.
- STUMHOFER, J. S.; SILVER, J. S.; LAURENCE, A.; PORRETT, P. M.; HARRIS, T. H.; TURKA, L. A.; ERNST, M.; SARIS, C. J.; O'SHEA, J. J.; HUNTER, C. A. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nature Immunology*, v.8, n.12, pp.1363-1371, 2007.

- SUÁREZ, A. I.; BLANCO, Z.; DELLE MONACHE, F.; COMPAGNONE, R. S.; ARVELO, F. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. **Natural Product Research**, v.18, n.5, pp.421-426, 2004.
- SUÁREZ, A. I.; COMPAGNONE, R. S.; SALAZAR-BOOKAMAN, M. M.; TILLET, S.; DELLE-MONACHE, F.; DI GIULIO, C.; BRUGES, G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.1, pp.11-14, 2003.
- SUBIZA, J. L.; VINUELA, J. E.; RODRIGUEZ, R.; GIL, J.; FIGUEREDO, M. A.; DE LA CONCHA, E. G. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. **International Journal of Cancer**, v.44, pp.307-314, 1989.
- THONGTAN, J.; KITTAKOOP, P.; RUANGRUNGSI, N.; SAENBOONRUENG, J.; THEBTARANONTH, Y. New antimycobacterial and antimalarial 8,9-secokaurane diterpenes from *Croton kongensis*. **Journal of Natural Products**, v.66, n.6, pp.868-870, 2003.
- TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.65, n.2, pp.87-108, 2015.
- TORREZINI, T.; ATHANAZIO, D. A. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.54, p. 63-77, 2008.
- TROPICOS: Missouri (USA): **Missouri Botanical Garden**. 2014. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 12/02/2016.
- UTSUMI, K.; TAKAI, Y.; TADA, T.; OHZEKI, S.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T. Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. **Journal of Immunology**, v.145, n.1, pp.397-403, 1990.
- VALADARES, M. C.; KLEIN, S. I.; QUEIROZ, M. L. Titanocene modulation of cytokine imbalance induced by Ehrlich ascites tumour progression. *European Journal of Pharmacology*, v.503, pp.203-208, 2004.
- VALADARES, M. C.; RAMOS, A. L.; REHMANN, F. J.; SWEENEY, N. J.; STROHFELDT, K.; TACKE, M.; QUEIROZ, M. L. 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, pp.264-270, 2006.
- VAN HORSSEN, R.; TEN HAGEN, T. L.; EGGERMONT, A. M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **Oncologist**, v.11, n.4, pp.397-408, 2006.
- VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annual Review of Immunology**, v.29, pp.235-271, 2011.
- VIANA, C. T. R.; CASTRO, P. R.; MARQUES, S. M.; LOPES, M. T. P.; GONÇALVES, R.; CAMPOS, P. P.; ANDRADE, S. P. Differential Contribution of Acute and Chronic

- Inflammation to the Development of Murine Mammary 4T1 Tumors. **PLoS One**, v.10, n.7, e0138408, 2015.
- VIGOR, C.; FABRE, N.; FOURASTÉ, I.; MOULIS, C. Three clerodane diterpenoids from *Croton eluteria* Bennett. **Phytochemistry**, v.57, n.8, pp.1209-1212, 2001.
- VIVIER, E.; UGOLINI, S.; BLAISE, D.; CHABANNON C.; BROSSAY, LAURENT. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. **Nature Reviews Immunology**, v.12, n.4, pp.239-252, 2012.
- WALDNER, M. J.; NEURATH, M. F. Cytokines in colitis associated cancer: potential drug targets? **Inflammation and Allergy Drug Targets**, v.7, n.3, pp.187-194, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Globocan 2012 – Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [Internet]. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en>>.
- WU, J. D.; HIGGINS, L. M.; STEINLE, A.; COSMAN, D.; HAUGK, K.; PLYMATE, S. R. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v.114, pp.560-568, 2004.
- YOON, S. R.; KIM, T. D.; CHOI, I. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. **Experimental & Molecular Medicine**, v.47, n.2, pp.1-11, 2015.
- ZHANG, D.; ZHOU, B.; YU, J.; XU, C.; DING, J.; ZHANG, H.; YUE, J. Cytotoxic tiglane-type diterpenoids from *Croton tiglium*. **Tetrahedron**, v.71, pp.9638-9644, 2015.
- ZHANG, Q. W.; LIU, L.; GONG, C. Y.; SHI, H. S.; ZENG, Y. H.; WANG, X. Z.; ZHAO, Y. W.; WEI, Y. Q. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **PLoS One**, v.7, n.12, e50946, 2012.
- ZOU, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v6, pp.295-307, 2006.



Apêndices

APÊNDICE A. Indução da polarização dos macrófagos

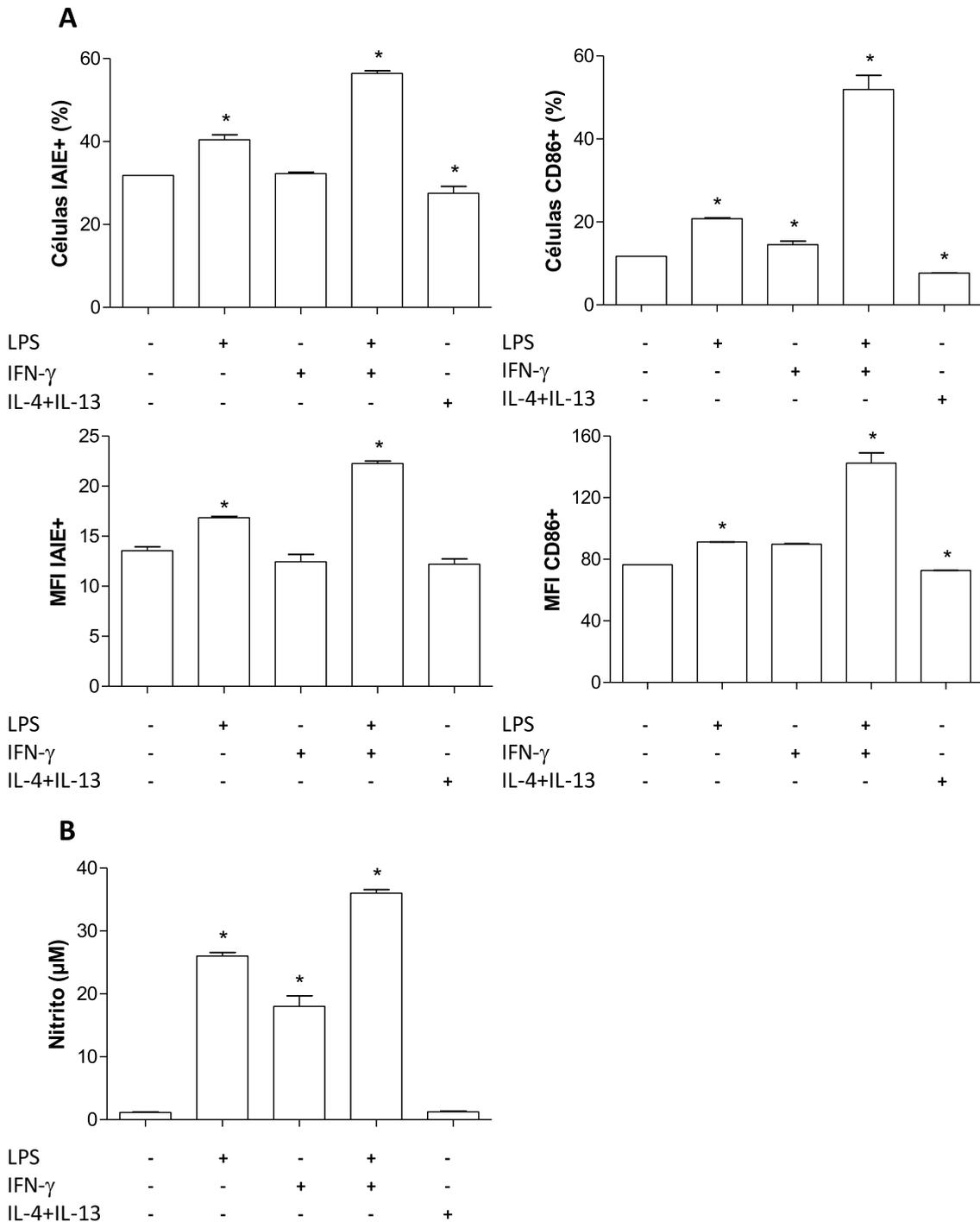


Figura 1 – Indução da polarização de macrófagos RAW 264.7 para o perfil M1 e M2 (A) e produção de NO (B). As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 48 poços e fundo chato a uma concentração de $5 \times 10^5/500 \mu\text{L}$ e incubadas 24 horas em meio RPMI a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após esse período inicial de incubação, as células foram tratadas da seguinte forma: LPS (200 ng/mL) ou IFN- γ (10 ng/mL), LPS (200 ng/mL) e IFN- γ (10 ng/mL) ou IL-4 (40 ng/mL) e IL-13 (20 ng/mL). Como controle, os macrófagos foram cultivados em meio RPMI completo para manter estado de M0. Após 24 horas foi realizada a imunofenotipagem. As células foram marcadas com os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-IA-IE, conjugado com PE e anti-CD86 conjugado com PE-Cy7. Em seguida, foi feita a análise simples dos marcadores IA-IE e CD86. Os dados representam a média \pm erro padrão das médias de um experimento independente. * ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, teste de *Mann-Whitney*.

APÊNDICE B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract and tertiary alkaloid fraction from *Croton triqueter* Lam.

Izabel C. P. B. Serra^a, Sonia M. F. Freire^b, Flávia R. F. Nascimento^a,
Maria N. S. Ribeiro^c

^a *Immunophysiology Laboratory, Pathology Department, Federal University of Maranhão, Portugueses Avenue, University City, 65085-580, São Luís, Maranhão, Brazil*

^b *Physiological Sciences Department, Federal University of Maranhão, Portugueses Avenue, University City, 65085-580, São Luís, Maranhão, Brazil*

^c *Pharmacognosy Department, Federal University of Maranhão, Portugueses Avenue, University City, 65085-580, São Luís, Maranhão, Brazil*

Abstract

Various species from the genus *Croton* have scientifically confirmed analgesic and anti-inflammatory properties; however, there are no studies demonstrating such activities in the plant species *Croton triqueter* Lam. Therefore, this study investigated the analgesic and anti-inflammatory effects of an ethanolic extract from *C. triqueter* Lam. leaves (EEJ) and the tertiary alkaloid fraction (FAL). Anti-inflammatory activity was evaluated using carrageenan-induced paw edema and peritonitis assays, whereas the analgesic activity was evaluated using an acetic acid-induced writhing test. The oral administration of EEJ (0.50 g/kg) reduced the formation of paw edema over 5 h of observation. The EEJ (0.50 and 1.00 g/kg) decreased leukocyte migration in the carrageenan-induced peritonitis model in a dose-dependent manner (37.6% and 52.9%). Similarly, the FAL (0.25 and 0.50 g/kg) inhibited leukocyte migration by 24.4% and 62% at different doses, respectively. In the chemical nociception model, EEJ (0.50 and 1.00 g/kg) decreased acetic acid-induced writhing in a dose-dependent manner by 52.2% and 60.9%, respectively. FAL (0.25 and 0.50 g/kg) inhibited writhing by 71.7% and 86.4%, respectively. These results indicate that the species *C. triqueter* Lam. shows anti-inflammatory and antinociceptive activities and that alkaloids appear to be involved in these properties.

Keywords: *Croton triqueter* Lam.; anti-inflammatory activity; antinociceptive activity; alkaloids.

1 INTRODUCTION

The genus *Croton* is the second largest and most diverse in the family Euphorbiaceae, with approximately 1,200 species of trees, shrubs, herbs and vines distributed throughout the tropics and subtropics [1]. Plant species in this genus are commonly used in popular medicine to treat cancer, intestinal constipation, diarrhea and other digestive problems, diabetes, wounds, fever, high cholesterol, hypertension, malaria, pain, inflammation, ulcers and obesity [2], and some of these uses have already been scientifically evaluated and confirmed with pre-clinical studies. The anti-inflammatory and analgesic properties of *Croton celtidifolia* [3], *Croton cuneatus* [4], *Croton zambesicus* [5], *Croton crassifolius* [6] and *Croton stellatopilosus* [7] have been confirmed in different pain and inflammation models. In addition to these studies, many others are ongoing to assess the therapeutic potential of extracts, fractions and active components in species from the genus *Croton*.

Croton triqueter Lam. is a neotropical plant species popularly known as *velame*, found from the southern United States to Uruguay [8]. In Brazil, it is distributed in the states of Pará, Piauí, Maranhão, Minas Gerais and São Paulo and is commonly used in powdered form as an antiulcerogenic, antisyphilitic, diuretic, stimulant and purifying agent [9]. Leishmaniacidal activity against the promastigotes of *Leishmania amazonensis* has also been reported [10]. Phytochemical analysis on hydroalcoholic extracts from *Julocroton triqueter* leaves, another name for *C. triqueter* Lam. [11, 12, 13], indicated the presence of triterpenes, saponins, alkaloids, flavonoids and hydrolysable tannins [14]. These types of compounds are traditionally described in the literature as possessing excellent therapeutic properties, including anti-inflammatory and analgesic properties [15, 16, 17, 18]. The alkaloid taspine has been isolated from *Croton lechleri* and found to have anti-inflammatory and anti-tumor properties [19, 20].

Therefore, based on the analgesic and anti-inflammatory potential shown by various species of the genus *Croton* and the results from phytochemical screening showing the abundant presence of alkaloids, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of an ethanolic extract from *Croton triqueter* Lam. (EEJ) and of the tertiary alkaloid fraction (FAL) purified from this extract.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material collection

Leaves from *C. triqueter* Lam. were collected from a specimen cultivated at the Berta Langes de Morretes Orchard, Ático Seabra Herbarium, Department of Pharmacy, Federal University of Maranhão (Universidade Federal do Maranhão - UFMA), Bacanga Campus, located in São Luís, Maranhão (MA), Brazil (2° 33' 13"S and 44° 18' 19"W) in February during the rainy season. The plant material was identified by Dr. Eduardo B. de Almeida Júnior (UFMA). The voucher specimen was deposited in the MAR Herbarium as no. 8675.

2.2 Plant material processing and ethanolic extract preparation

Approximately 300 g of leaves from *C. triqueter* Lam. were dried in a forced-air oven at a mean temperature of 35°C for 96 h. After drying and complete stabilization, the material was pulverized in a knife mill to obtain dry and pulverized leaf material (111.6 g). This material was then extracted by maceration using ethanol P.A. for 72 h

with solvent replacement every 72 h for 16 days. At the end of the process, the macerate was filtered and concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure to obtain an ethanolic extract from *C. triqueter* Lam. leaves with yield of 3.5%. The EEJ was stored in an amber flask and kept under refrigeration. Later, the EEJ was evaluated using qualitative and semi-quantitative methods [21] that detected the presence of alkaloids, saponins, flavanones, flavanonols, hydrolysable tannins, triterpenes and coumarins.

2.3 Extraction of alkaloids

Total alkaloids were extracted from the crude extract using the acid-base method with organic solvent in a separation funnel [22]. The EEJ was acidified with 0.1 N HCL until reaching a pH of 1-3. The filtrate (acid solution) was extracted with ethyl acetate and reacted with Dragendorff's and Mayer's reagents. After concentration under vacuum, the ethyl acetate phase generated a 1.5 g residue (14.10% yield) named the FAL, which was stored in an amber flask at 4°C.

2.4 Animals

Adult male Swiss mice (\pm 60 days, 30 ± 5 g) and *Rattus norvegicus* rats (\pm 45 days, 200 ± 50 g) were obtained from the Central Vivarium of the UFMA and maintained in the Sector Vivarium of the Laboratory of Pharmacology, UFMA, under standard laboratory conditions ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-h light/dark cycle) with free access to the standard dry pellet diet and water *ad libitum*. All of the procedures described were approved by the UFMA Ethics Committee for the Use of Animals (no. 012975/2008-43).

2.5 Anti-inflammatory evaluation

2.5.1 Carrageenan-induced paw edema

The antiedematogenic activity of the EEJ was tested in a paw edema model induced by 1% carrageenan [23, 24, 25]. Male rats ($n = 5/\text{group}$) were treated with EEJ (0.50 g/kg orally [v. o.]), indomethacin (0.01 g/kg, v. o.), or a 0.9% sodium chloride solution (control, v. o.). After 30 minutes, all of the animals were injected in the sub-plantar region with 0.1 mL 1% carrageenan in the right rear paw and an equal volume of 0.9% saline (control solution) in the left rear paw. The volume of the paws was measured with a digital plethysmometer (Ugo Basile, Italy) immediately after administration of the irritating agent (time zero) and every 60 min for a maximum period of 5 h. The measurements were based on the differences in volume caused by immersion of the paw up to the lateral malleolus of the ankle. The antiedematogenic response was determined by comparing the difference in rear paw volume in the control group with the mean increase in rear paw volume from the group treated during the same time interval.

2.5.2 Peritonitis test

The peritonitis test was performed as previously reported by Vinegar et al. [26] and Ferrándiz & Alcaraz [27]. Male Swiss mice ($n = 6/\text{group}$) were treated with EEJ (0.50 g/kg, v. o.), FAL (0.25 g/kg and 0.50 g/kg, v. o.), dexamethasone (0.001 g/kg

intraperitoneally [i. p.] or distilled water (control, v. o.) for 30 min prior to carrageenan injection (0.25 mL, 1% w/v in saline solution) in the peritoneal cavity. Four hours after application of the irritating agent, the animals were sacrificed under deep ether anesthesia, and the peritoneal cavity was immediately washed with 2 mL of heparin/PBS solution. After a gentle massage, the peritoneal fluids were removed, and the leukocytes were counted in a Neubauer chamber with a common optical microscope under 40X magnification. The results are expressed as the mean of the total number of leukocytes \pm standard error of the mean ($\times 10^3/\text{mm}^3$) for each group.

2.6 Antinociceptive evaluation

2.6.1 Acetic acid-induced writhing test

Using the method described by Koster et al. [28] and Vacher et al. [29], experimental groups of 8 mice were treated (v. o.) with EEJ (0.50 g/kg), FAL (0.25 g/kg and 0.50 g/kg), indomethacin (0.01 g/kg) or distilled water (control). After 60 minutes, all of the animals were injected with 0.8% acetic acid (0.1 mL/10 g weight, i. p.), a pain-inducing agent, and evaluated every 5 min for a total of 20 min. The manifestation of pain was noted by writhing followed by torsions of the trunk and extension of the posterior limbs. The results are expressed as the mean number of writhing \pm standard error of the mean as a function of the observation time.

2.7 Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Significant differences in the experimental data were assessed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test. All of the statistical analyses were performed using Graph Pad Prism software, version 4.03. The level of significance for rejection of the null hypothesis was 5% ($p < 0.05$) [30].

3 RESULTS

3.1 Carrageenan-induced paw edema

The anti-inflammatory effect of the EEJ assessed with the carrageenan-induced paw edema model is shown in Table 1. Sub-plantar carrageenan injection produced inflammatory edema that increased gradually, reaching a peak in the third hour after injection of the irritant. The EEJ significantly inhibited edema for the first 5 h of observation, reaching maximum activity in the fifth hour (79.5%). Indomethacin, the reference drug, also reduced edema throughout the observation period.

3.2 Peritonitis test

The effects of EEJ and FAL on carrageenan-induced leukocyte migration are shown in Table 2. Carrageenan administration enhanced the total number of leukocytes to 2.35 ± 213.1 leukocytes $\times 10^3/\text{mm}^3$. Pre-treatment with EEJ at doses of 0.50 and 1.00 g/kg reduced leukocyte number in a dose-dependent manner corresponding to an inhibition of 37.1% and 52.9%, respectively. The 0.25 and 0.50 g/kg FAL doses also reduced leukocyte migration by 24.4% and 62%, respectively.

Dexamethasone (reference drug) decreased the cellular infiltrate by 61% relative to the vehicle.

3.3 Acetic acid-induced writhing test

Table 3 shows the effects of EEJ and FAL on the acetic acid-induced writhing test in mice. Oral treatment with EEJ at the 0.50 and 1.00 g/kg doses reduced the number of writhing 60 min after administration in a dose-dependent manner. Reductions of 52.2% (18 ± 1.5 writhing) and 60.9% (14.9 ± 2.5 writhing), respectively, compared to the control group were observed. Similarly, the 0.25 and 0.50 g/kg FAL doses reduced writhing up to 71.7% (10.6 ± 2.0 writhing) and 86.4% (5.1 ± 1.1 writhing), respectively. Indomethacin (reference drug) generated 81.9% inhibition (7.0 ± 1.3 writhing).

4 DISCUSSION

Many conventional anti-inflammatory drugs used today to treat inflammatory disorders are considered unsafe for treatment, as they cause various side effects and serious adverse reactions in addition to being very expensive. Thus, additional research is needed to develop more accessible, effective and safe products. In this sense, natural products represent an excellent source of bioactive compounds that have the potential to provide new therapeutic agents.

In this study, the anti-inflammatory effect of the EEJ was evaluated in a rat carrageenan-induced paw edema model. Edema is one of the five cardinal signs of inflammation and therefore is one of the parameters used to evaluate anti-inflammatory processes and the anti-inflammatory activity of pharmaceuticals. In this model, carrageenan is used to induce edema with a biphasic response. The initial phase is observed during the first hour and is attributed to the release of histamine, serotonin, bradykinin and cytokines that strongly contribute to cellular migration (primarily neutrophils) to the inflammation site. The second phase of edema is characterized by elevated prostaglandin production, COX-2 activation and NO release [31, 32]. In this inflammation model, the EEJ was shown to reduce paw edema for the first 5 h of observation and caused an anti-inflammatory response comparable to indomethacin, the reference drug. This observed effect can be attributed to inhibition of the biphasic response induced by carrageenan, and although the mechanism of action is still unknown, it is possible that multiple mechanisms are involved, such as inhibition of cyclooxygenase and/or lipoxygenase or inhibition of the synthesis, release and action of other inflammatory mediators.

Similar results were found with other species in the genus *Croton* that also have anti-inflammatory activity. *C. cuneatus* significantly inhibited paw edema for 4 h of observation [4], and *C. crassifolius* inhibited paw edema in the third and fourth hour of observation, but was ineffective in the first and second hour. It has been suggested that these species act by inhibiting one or more inflammatory mediators [06]. The effects reported for other species of the genus *Croton* were primarily attributed to the presence of terpenes, alkaloids, flavonoids, tannins and sterols [33, 34, 19]. These phytochemicals are also present in *C. triqueter* Lam. Therefore, it is possible that the antiedematogenic activity shown by the EEJ might be caused by these biologically active constituents. Due to the abundant presence of alkaloids and considering that

this class of compounds is known for its anti-inflammatory properties, [35] we decided to separate the FAL and assess its properties in other inflammation and pain models.

Another model used was the carrageenan-induced peritonitis test. In this model, carrageenan, a sulfated polysaccharide, triggers acute inflammation causing the sequential release of various pro-inflammatory mediators, especially histamine, serotonin, kinins, prostaglandins and thromboxanes [36, 37]. This model allows the quantification of leukocytes that migrated to the peritoneal cavity because of chemotactic agents to measure sensitivity to steroidal anti-inflammatories [26, 38, 39]. Considering that the inhibition of leukocyte migration is one of the characteristic effects of drugs with anti-inflammatory properties, we evaluated the influence of EEJ and FAL on leukocyte migration to the peritoneal cavity. The oral administration of EEJ and FAL reduced the number of leukocytes that migrated to the peritoneal cavity in a dose-dependent manner, similar to dexamethasone, which was used as a positive control, confirming the anti-inflammatory properties of EEJ and suggesting that alkaloids are responsible for this activity.

Leukocyte migration is a fundamental inflammation processes that depends on the production and release of chemotactic mediators, in addition to involving multiple events such as leukocyte marginalization and rolling as well as adherence and transmigration in the direction of the injured region. In this sense, it is possible that the EEJ and FAL act in a manner similar to dexamethasone, an agent that reduces migration by blocking the synthesis and/or release of chemotactic mediators [40].

In general, inflammatory processes are caused by the action of aggressors or phlogistic agents that induce tissue lesions. In this process, various inflammatory mediators are released that, in addition to acting on damaged tissues, are also capable of generating pain. Thus, this study also evaluated pain from inflammation using the acetic acid-induced writhing test in an attempt to observe whether both EEJ and FAL can affect the inflammatory process and inflammatory pain.

In this model, administration of acetic acid causes inflammatory pain by inducing capillary permeability and the release of endogenous substances that stimulate pain nerve endings, such as prostaglandin E1 (PGE 1) and prostaglandin E2 (PGE 2) [41]. Additionally, it has been well established that the nociceptive response induced by acetic acid is also dependent on the release of cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-8 by modulating macrophages and mast cells located in the peritoneal cavity [42].

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are known to inhibit the COX enzyme in peripheral tissues and therefore interfere in the transduction mechanism of primary afferent nociceptors [43]. Thus, the reduction in the writhing number caused by EEJ and FAL might be caused by blocking the synthesis and/or release of endogenous substances that excite the pain nerve endings in a manner similar to indomethacin and other NSAIDs, suggesting a possible peripheral analgesic action. However, this test is non-specific, and analgesic opioids, tricyclic antidepressants and NSAIDs also inhibit the nociceptive response in this model [44]. Similar results were also found with *Croton cordiifolius* Baill. [45], *Croton adamantinus* [46] and *Croton malambo* [47], which also inhibited pain in the same chemical nociception model.

In summary, this study demonstrated that EEJ and FAL have significant anti-inflammatory and anti-nociceptive properties that are likely related to inhibition of the synthesis and/or release of inflammatory mediators; however, further studies must be performed to determine the exact mechanism of action for this plant species.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). SERRA, I. C. P. B. is grateful to CNPq for a research fellowship.

REFERENCES

- [1] G. A. Asare, A. Sittie K. Bugyei, B. A. Gyan, S. Adjei, P. Addo, E. K. Wiredu, A. K. Nyarko, L. S. Otu-Nyarko, D. N. Adjei. "Acute toxicity studies of *Croton membranaceus* root extract". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 134, pp. 938-943, 2011.
- [2] A. Salatino, M. L. F. Salatino, G. Negri. "Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae)". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 18, pp. 11-33, 2007.
- [3] G. M. Nardi, R. Felippi, S. Dalbo, J. M. Siqueira-Júnior, D. C. Arruda, F. D. Monache, A. K. Timbola, M. G. Pizzolatti, K. Ckless, R. M. Ribeiro-do-Vale. "Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark". *Phytomedicine*, vol. 10, pp. 176-184, 2003.
- [4] A. I. Suárez, Z. Blanco, R. S. Compagnone, M. M. Salazar-Bookaman, V. Zapata, C. Alvarado. "Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 105, no. 1-2, pp. 99-101, 2006.
- [5] J. E. Okokon, P. A. Nwafor. "Antimicrobial activity of root extract of *Croton zambesicus*". *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 23, no. 1, pp. 114-118, 2010.
- [6] J. Zhao, F. Fang, L. Yu, G. Wang, L. Yang. "Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton crassifolius* ethanol extract". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 142, no. 2, pp. 367-373, 2012.
- [7] C. Premprasert, S. Tewtrakul, A. Plubrukarn, J. Wungsintaweekul. "Anti-inflammatory activity of diterpenes from *Croton stellatopilosus* on LPS-induced RAW264.7 cells". *Journal of Natural Medicines*, vol. 67, no. 1, pp. 174-181, 2013.
- [8] I. Cordeiro. "Euphorbiaceae. In: Stannard, B.L. (ed.). Flora do Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia-Brasil". Kew, *Royal Botanic Gardens*, pp. 300-317, 1995.
- [9] M. P. Corrêa. "Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas". Rio de Janeiro: *Ministério da Agricultura/IBDF*, pp. 6, 1984.
- [10] J. L. Bezerra, G. C. Costa, T. C. Lopes, I. C. D. S. Carvalho, F. J. Patrício, S. M. Sousa, F. M. M. Amaral, J. M. M. Rebelo, R. N. M. Guerra, M. N. S. Ribeiro, F. R. F. Nascimento. "Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 16, pp. 631-637, 2006.
- [11] P. E. Berry, I. Cordeiro, A. C. Wiedenhoef, M. A. Vitorino-Cruz, L. R. Lima. "Brasiliocroton, a new crotonoid genus of Euphorbiaceae s.s. from eastern Brazil". *Systematic Botany*, vol. 30, pp. 357-365, 2005.
- [12] P. E. Berry, A. L. Hipp, K. J. Wurdack, B. Van Ee, R. Riina. "Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data". *American Journal of Botany*, vol. 92, no. 9, pp. 1520-1534, 2005.

- [13] K. J. Wurdack, P. Hoffmann, M. W. Chase. "Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using plastid rbcL and trnL-F DNA sequences". *American Journal of Botany*, vol. 92, no. 8, pp. 1397-1420, 2005.
- [14] Tropicos: Missouri (USA): Missouri Botanical Garden. 2014. Available in: <http://www.tropicos.org>.
- [15] J. Moreira, L. C. Klein-Júnior, V. Cechinel-Filho, F. de Campos-Buzzi. "Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae)". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 146, no. 1, pp. 318-323, 2013.
- [16] S. Sannigrahi, U. K. Mazumder, D. Pal, M. L. Mishra, S. Maity. "Flavonoids of *Enhydra Fluctuans* exhibits analgesic and anti-inflammatory activity in different animal models". *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 24, no. 3, pp. 369-375, 2011.
- [17] W. A. Kaleem, N. Muhammad, M. Qayum, H. Khan, A. Khan, L. Aliberti, V. De Feo. "Antinociceptive activity of cyclopeptide alkaloids isolated from *Ziziphus oxyphylla* Edgew (Rhamnaceae)". *Fitoterapia*, vol. 91, pp. 154-158, 2013.
- [18] N. Muhammad, R. L. Shrestha, A. Adhikari, A. Wadood, H. Khan, A. Z. Khan, F. Maione, N. Mascolo, V. De Feo. "First evidence of the analgesic activity of govaniadine, an alkaloid isolated from *Corydalis govaniiana* Wall". *Natural Product Research*, vol. 29, no. 5, pp. 430-437, 2015.
- [19] G. P. Perdue, R. N. Blomster, D. A. Blake, N. R. Farnsworth. "South American plants II: taspine isolation and anti-inflammatory activity". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 68, no. 1, pp. 124-126, 1979.
- [20] M. Montopoli, R. Bertin, Z. Chen, J. Bolcato, L. Caparrotta, G. Foldi. "*Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 144, no. 3, pp. 747-753, 2012.
- [21] F. J. Matos. "Introdução à fitoquímica experimental". 2.ed. Fortaleza: *Edições UFC*, 141 p. 1997.
- [22] J. B. Harborne. "Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis". pp. 1-36, 1984.
- [23] C. A. Winter, E. A. Risley, G. W. Nuss. "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 111, pp. 544-547, 1962.
- [24] S. M. Freire, L. M. Torres, N. F. Roque, C. Souccar, A. J. Lapa. "Analgesic activity of a triterpene isolated from *Scoparia dulcis* L. (Vassourinha)". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 86, no. 2, pp. 149-51, 1991.
- [25] S. M. Freire, J. A. S. Emim, A. J. Lapa, C. Souccar, L. M. B. Torres. "Analgesic and antiinflammatory properties of *Scoparia dulcis* L. extracts and glutinol in rodents". *Phytotherapy Research*, vol. 7, no. 6, pp. 408-414, 1993.
- [26] R. Vinegar, J. F. Truax, J. L. Selph. "Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rat". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 143, no. 3, pp. 711-714, 1973.

- [27] M. L. Ferrándiz, M. J. Alcaraz. "Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids". *Agents and actions*, vol. 32, no. 3-4, pp. 283-288, 1991.
- [28] R. Koster, M. Anderson, E. J. Beer. "Acetic acid for analgesic screening". *Federation proceedings*, vol. 18, pp. 412-418, 1959.
- [29] J. Vacher, P. Duchêne-Marullaz, P. Barrat. "A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques". *Medicina Experimentalis*, vol. 11, pp. 51-58, 1964.
- [30] R. R. Sokal, F. J. Rohlf. "Biometry: The principle and practice of statistics". *Biological Research*. 2.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1996.
- [31] C. J. Morris. "Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse". *Methods in Molecular Biology*, vol. 225, pp. 115-121, 2003.
- [32] I. Posadas, M. Bucci, F. Roviezzo, A. Rossi, L. Parente, L. Sautebin, G. Cirino. "Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression". *British Journal of Pharmacology*, vol. 142, no. 2, pp. 331-338, 2004.
- [33] F. F. Rochal, E. M. N. Neves, E. A. Costa, L. G. Matos, A. H. Müller; G. M. S. P. Guilhon; W. S. Cortes, F. A. Vanderlinde. "Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, no. 3, pp. 344-349, 2008
- [34] P. C. Kuo, M. L. Yang, T. L. Hwang, Y. Y. Lai, Y. C. Li, T. D. Thang, T. S. Wu. "Anti-inflammatory diterpenoids from *Croton tonkinensis*". *Journal of Natural Products*, vol. 76, no. 2, pp. 230-236, 2013.
- [35] G. M. Nardi, J. M. Siqueira Junior, F. Delle Monache, M. G. Pizzolatti, K. Ckless, R. M. Ribeiro-do-Valle. "Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats". *Phytomedicine*, vol. 14, no. 2-3, pp. 115-122, 2007.
- [36] M. Di Rosa, J. P. Giroud, D. A. Willoughby. "Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine". *The Journal of Pathology*, vol. 104, pp. 15-28, 1971.
- [37] J. Damas, V. Baurdon, G. Remade-Volon, A. Adam. "Kinins and Peritoneal exudates induced by carrageenan and zymosan". *British Journal of Pharmacology*, vol. 101, pp. 418-422, 1990.
- [38] G. A. Higgs, K. E. Eakins, K. G. Mugridge, S. Moncada, J. R. Vane. "The effects of non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenan-induced inflammation". *European Journal of Pharmacology*, vol. 66, pp. 81-86, 1980.
- [39] T. Mikami, K. Miyasaka. "Effects of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin-induced pleurisy". *European Journal of Pharmacology*, vol. 95, pp. 1-12, 1983.
- [40] W. A. Muller. "Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response". *Laboratory Investigation*, vol. 82, pp. 521-533, 2002.
- [41] R. Arslan, N. Bektas, Y. Ozturk. "Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 131, pp. 28-32, 2010.

- [42] R. A. Ribeiro, M. L. Vale, S. M. Thomazzi, A. B. P. Paschoalato, S. Poole, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha. "Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice". *European Journal of Pharmacology*, vol. 387, no. 1, pp. 111-118, 2000.
- [43] N. Bribi, F. Algieri, A. Rodriguez-Nogales, J. Garrido-Mesa, T. Vezza, F. Maiza, M. P. Utrilla, M. E. Rodriguez-Cabezas, J. Galvez. "Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Total Alkaloid Extract from *Fumaria capreolata*". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, 736895, 2015.
- [44] J. S. Mogil, S. G. Wilson, and Y. Wan, "Assessing nociception in murine subjects". *Methods in Pain Research*, L. Kruger, Ed., pp. 26-27, CRC Press, 2001.
- [45] L. M. Nogueira, M. R. Silva, S. M. Santos, J. F. C. Albuquerque, I. C. Ferraz, T. T. Albuquerque, C. R. F. C. Mota, R. M. Araújo, G. S. B. Viana, R. D. Martins, A. Havt, R. M. Ximenes. "Antinociceptive Effect of the Essential Oil Obtained from the Leaves of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae) in Mice". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, 620865, 2015.
- [46] R. M. Ximenes, L. M. Nogueira, N. M. R. Cassundé, R. J. B. Jorge, S. M. Santos, L. P. M. Magalhães, M. R. Silva, G. S. B. Viana, R. M. Araújo, K. X. F. R. Sena, J. F. C. Albuquerque, R. D. Martins. "Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil". *Journal of Natural Medicines*, vol. 67, no. 4, pp. 758-764, 2013.
- [47] A. I. Suárez, R. S. Compagnone, M. M. Salazar-Bookaman, S. Tillett, F. Delle-Monache, C. Di Giulio, G. Bruges. "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 88, no. 1, pp. 11-14, 2003.

Table 1. Effects of ethanolic extract of *Croton triquetar* Lam. (EEJ) (0.5 g/kg, p.o.) or indomethacin (Indo) (0.01 g/kg) on carrageenan-induced paw oedema in rats.

Group	Paw volume (mL)				
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Control	1.21 ± 0.59	1.45 ± 0.57	1.55 ± 0.55	1.53 ± 0.58	1.35 ± 0.57
EEJ	0.39 ± 0.20* (69.8)	0.84 ± 0.35* (42.0)	0.58 ± 0.18* (62.6)	0.32 ± 0.26* (79.0)	0.27 ± 0.20* (79.5)
Indo	0.20 ± 0.06* (83.5)	0.33 ± 0.10* (77.2)	0.61 ± 0.16* (60.6)	0.28 ± 0.11* (81.7)	0.20 ± 0.11* (85.2)

Test extracts or drugs were administered 60 min before experiment. Values were expressed as mean ± S.E.M. (N=5). Significantly different from control ($P<0.05$). In parentheses: inhibition %.

Table 2. Effects of ethanolic extract of *Croton triquetar* Lam. (EEJ), Total Tertiary Alkaloidal Fraction (FAL) or dexamethasone (Dexa) on carrageenan-induced peritoneal leukocyte migration in mice.

Group	Dose	Number of leucocytic $\times 10^3/\text{mm}^3$	Inhibition (%)
Control		2,350 ± 213.1	---
EEJ	0.50 g/kg	1,467 ± 47.1*	37.6
EEJ	1.00 g/kg	1,108 ± 77.9*	52.9
Control		2,975 ± 355.0	---
FAL	0.25 g/kg	2,250 ± 416.8	24.4
FAL	0.50 g/kg	1,130 ± 222.8*	62.0
Dexa	0.001 g/kg	900 ± 122.5*	61.7

Test extracts or drugs were administered 60 min before acetic acid injection. Values were expressed as mean ± S.E.M. (N=8). Significantly different from control ($P<0.05$).

Table 3. Effects of ethanolic extract of *Croton triquetar* Lam. (EEJ), Total Tertiary Alkaloids Fraction (FAL) or indomethacin (Indo) on acetic acid-induced writhing test in mice.

Group	Dose	Number of writhes	Inhibition (%)
Control		38.2 ± 2.7	---
EEJ	0.50 g/kg	18.0 ± 1.5*	52.2
EEJ	1.00 g/kg	14.9 ± 2.5*	60.9
Control		38.7 ± 4.7	---
FAL	0.25 g/kg	10.6 ± 2.0*	71.7
FAL	0.50 g/kg	5.1 ± 1.1*	86.4
Indo	0.01 g/kg	7.0 ± 1.3*	81.9

Test extracts or drugs were administered 60 min before acetic acid injection. Values were expressed as mean ± S.E.M. (N=8). Significantly different from control ($P<0.05$).