



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado



MARTA REGINA DE CASTRO BELFORT

**MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ASSOCIADA AO
MODELO ASCÍTICO DE TUMOR DE EHRLICH
DA FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA CONTENDO
O EXTRATO DAS FOLHAS DE *Fridericia Platyphylla***

São Luís

2024

MARTA REGINA DE CASTRO BELFORT

**MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ASSOCIADA AO
MODELO ASCÍTICO DE TUMOR DE EHRlich
DA FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA CONTENDO
O EXTRATO DAS FOLHAS DE *Fridericia Platyphylla***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

Coordenador: Prof. Dr. André Alvares M. Vale

São Luís

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Belfort, Marta Regina de Castro.

MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ASSOCIADA AO MODELO ASCÍTICO DE TUMOR DE EHRLICH DA FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA CONTENDO O EXTRATO DAS FOLHAS DE Fridericia Platyphylla / Marta Regina de Castro Belfort. - 2024.

93 f.

Coorientador(a) 1: André Alvares Marques Vale.

Orientador(a): Rafael Cardoso Carvalho.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2024.

1. Formulação. 2. Produtos Naturais. 3. Citocinas.
4. Quimioterápicos. I. Carvalho, Rafael Cardoso. II. Vale, André Alvares Marques. III. Título.

MARTA REGINA DE CASTRO BELFORT

**MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ASSOCIADA AO MODELO ASCÍTICO DE
TUMOR DE EHRLICH
DA FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA CONTENDO O EXTRATO DAS
FOLHAS DE *Fridericia Platyphylla***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Aprovado em: 19 de dezembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho (**Orientador**)
Doutor em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Prof. Dr. André Alvares Marques Vale (**Coorientador**)
Doutor em Ciências da Saúde
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Joicy Cortez de Sá Sousa
Doutora em Biotecnologia
(Examinadora)

Profa. Dra. Ana Paula S.A. Santos
Doutora em Imunologia
(Examinadora)

Prof. Dr. Marcelo S. Andrade
Doutor em Biotecnologia
(Examinador)

Prof. Dr. Johnny R. Nascimento
Doutor em Ciências da saúde
(Examinador)

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas.”
(Marie Curie)

Dedico

A Deus por ser meu protetor e abençoar meu caminho
Aos meus amados pais Maria e Isaac por tamanho amor por mim
Aos meus irmãos Marcia e Isaac Filho pelo companheirismo, carinho e ternura

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre segurar a minha mão e permitir a realização de um grande sonho.

Aos meus amados pais: **Maria Belfort** e **Isaac Belfort**, que durante esses anos distantes nunca deixaram de me apoiar. Mãe, minha luz, obrigada por todas as orações, incentivo e por me ensinar que a fé nos fortalece. Pai amado, obrigada por acreditar em mim em todos os momentos, por todas as palavras de ternura e abraços apertados. Obrigada por todos os valores ensinados e por ter vocês em minha vida. Dedico a vocês esta tese de doutorado.

Aos meus queridos irmãos **Marcia** e **Isaac Filho**, por todas as palavras de carinho e confiança.

Aos meus orientadores **Rafael Cardoso** e **André Vale**, obrigada por tudo! Agradeço à confiança depositada e por acreditarem no meu trabalho. Levarei vocês como inspiração para minha vida profissional.

Ao **Laboratório de Imunologia do câncer** (LIAC) pela parceria, apoio, dedicação e pelas amizades construídas ao longo deste trabalho. Vocês deixaram meus dias mais leves e felizes. A Professora **Ana Paula Azevedo** pelo carinho, respeito e por me ensinar que as dificuldades são passageiras e a vitória inabalável.

Ao **Laboratório de Química e produtos Naturais** (LQPN) pela colaboração e aprendizado. Em especial a **Camila Silva** que se tornou uma inspiração.

À professora **Rachel Ribeiro** por ter gentilmente cedido o extrato hidroalcoólico para a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo.

Aos meus amigos **Denner Rodrigo**, **Francinete Alves**, **Letícia Millene**, **João Victor Carvalho**, **Ranielly Nogueira** e **Victor Maulen**. Obrigada por cada palavra de afeto e por anos de aprendizado.

As minhas amigas e irmãs **Ana Carolina Dias**, **Nadja Gaido**, **Ana Paula Cunha**, **Edilma Martins**, **Thalita Moura**, **Thaís Moraes**, **Isabelle Viegas**, **Rosi Penha**, **Mariana Arruda** e **Tainã Katrine**. Obrigada por serem luz na minha vida e por acreditarem que este dia se realizaria. Dedico também a vocês esta vitória.

À **FAPEMA** e ao **CNPQ** pelo financiamento do projeto.

À **UFMA**, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

RESUMO

O câncer é uma doença multifatorial que surge a partir de mutações gênicas mediada por erros durante a replicação do DNA. Os tratamentos tradicionais disponíveis além de apresentarem muitos efeitos adversos e toxicidade, se tornam ineficazes no tratamento de tumores resistentes. Assim, é essencial a busca por novas estratégias terapêuticas com baixa toxicidade, maior especificidade e mais eficazes. Nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação da inflamação mediada pela formulação nanoestruturada contendo o extrato das folhas de *Fridericia platyphylla* em modelo de tumor ascítico de Ehrlich. Para o ensaio experimental foram utilizados 44 camundongos Swiss distribuídos em 6 grupos (Saudável, controle negativo, controle positivo, veículo, e formulação nanoestruturada em duas doses, 10 e 25 mg/Kg) e tratados por 8 dias consecutivos. Nos dias 1, 5 e 8, foram registrados o peso e a circunferência abdominal dos animais. Após o último dia de tratamento, os animais foram eutanasiados para a coleta do líquido ascítico, órgãos linfoides, revestimento da cobertura interna da parede peritoneal, medula e sangue para os ensaios de viabilidade celular, dosagem de citocinas, óxido nítrico, ciclo celular, morte celular e Imunofenotipagem. Em relação ao tumor ascítico de Ehrlich, ocorreu o aumento do peso total dos animais devido ao crescimento das células tumorais. Os tratamentos, particularmente na dose de 25 mg/kg, reduziram os parâmetros associados ao desenvolvimento tumoral, como peso, circunferência abdominal, volume, celularidade. Além disso, não demonstraram efeitos relevantes no tipo de morte celular desencadeada ou modificações no ciclo celular das células tumorais. O tratamento na maior concentração foi capaz de aumentar a frequência de células CD11c+, linfócitos T auxiliares e células CD3⁺CD4⁺. O aumento da população de células dendríticas no líquido ascítico e o perfil de citocinas no microambiente tumoral, sugere um perfil mais supressor, notadamente pela diminuição das citocinas TNF- α , IFN- γ e até mesmo IL-10. A formulação das folhas de *F. platyphylla* não promoveu efeitos citotóxicos diretos *in vivo*, porém apresentou um interessante potencial imunomodulador, particularmente na regulação da inflamação associada ao tumor.

Palavras-chave: formulação; produtos naturais; citocinas; quimioterápicos.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease that arises from gene mutations mediated by errors during DNA replication. Traditional treatments available, in addition to presenting many adverse effects and toxicity, are ineffective in treating resistant tumors. Therefore, the search for new therapeutic strategies with low toxicity, greater specificity and greater efficacy is essential. In this scenario, the objective of this study was to evaluate the modulation of inflammation mediated by the nanostructured formulation containing the extract of *Fridericia platyphylla* leaves in an Ehrlich ascites tumor model. For the experimental assay, 44 Swiss mice were distributed in 6 groups (healthy, negative control, positive control, vehicle, and nanostructured formulation in two doses, 10 and 25 mg/kg) and treated for 8 consecutive days. On days 1, 5 and 8, the weight and abdominal circumference of the animals were recorded. After the last day of treatment, the animals were euthanized for collection of ascitic fluid, lymphoid organs, lining of the inner lining of the peritoneal wall, bone marrow and blood for cell viability assays, cytokine levels, nitric oxide, cell cycle, cell death and immunophenotyping. Regarding Ehrlich ascitic tumor, there was an increase in the total weight of the animals due to the growth of tumor cells. The treatments, particularly at a dose of 25 mg/kg, reduced the parameters associated with tumor development, such as weight, abdominal circumference, volume, cellularity. In addition, they did not demonstrate relevant effects on the type of cell death triggered or changes in the cell cycle of tumor cells. Treatment at the highest concentration was able to increase the frequency of CD11c⁺ cells, T helper lymphocytes and CD3⁺CD4⁺ cells. The increase in the population of dendritic cells in the ascites fluid and the cytokine profile in the tumor microenvironment suggests a more suppressive profile, notably due to the decrease in the cytokines TNF- α , IFN- γ and even IL-10. The formulation of *F. platyphylla* leaves did not promote direct cytotoxic effects in vivo, but presented an interesting immunomodulatory potential, particularly in the regulation of tumor-associated inflammation.

Keywords: formulation, natural products; cytokines; chemotherapeutics

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COX-2	Ciclooxigenase- 2
BCL-2	Linfoma de células B 2
BCL-XL	Linfoma de células B- extra grande
DCM	Diclorometano
F 127	Copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno
FDA	Food and Drug Administration
HIF-1α	Fator induzido por hipóxia-1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IFN-γ	Interferon-gama
IP	Iodeto de propídeo
MDSCs	Células mieloides supressoras
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Célula natural killer
NO	Óxido nítrico
OH	Hidroxila
OCH₃	Metóxi
PCR	Proteína C Reativa
PEO	Óxido de etileno
PPO	Óxido de propileno
PC-3	Linhagem celular de câncer de próstata
PBS	Solução salina tamponada com fostato
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro bovino fetal
STAT-3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
Tregs	Células T reguladoras
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Características do câncer.....	16
Figura 2.	Vias que conectam a inflamação e câncer.....	21
Figura 3.	<i>Fridericia platyphylla</i>	31
Figura 4.	Estrutura química das braquidinas isoladas da <i>F. platyphylla</i>	39
Figura 5.	Nanopartículas utilizadas no transporte de fármacos.....	36
Figura 6.	Estrutura geral dos copolímeros triblocos do tipo Pluronic®.....	36
Figura 7.	Representação esquemática dos mecanismos de associação do Pluronic F127 em água.....	37
Figura 8.	Desenho experimental e avaliação dos parâmetros inflamatórios.....	42
Figura 9.	Efeito do tratamento com a formulação nanoestruturada no peso e contagem total de células do sangue.....	50
Figura 10.	Efeito do tratamento com a formulação nanoestruturada no peso do fígado.....	51
Figura 11.	Medida da circunferência abdominal e volume do líquido ascítico.....	52
Figura 12.	Celularidade do líquido ascítico.....	53
Figura 13.	Análise dos órgãos linfoides.....	54
Figura 14.	Avaliação da angiogênese nos grupos experimentais.....	56
Figura 15.	Fenótipo de células imunes no líquido ascítico.....	57
Figura 16.	Fenótipo de células imunes no líquido ascítico.....	58
Figura 17.	Concentração de citocinas inflamatórias no soro e no líquido ascítico.....	62
Figura 18.	Concentração do óxido nítrico no líquido ascítico.....	62
Figura 19.	Análise do tipo de morte celular utilizando a técnica de coloração com laranja de acridina e brometo de etídio nas células do líquido ascítico.....	64
Figura 20.	Análise do ciclo celular por meio da marcação com iodeto de propídio nas células do líquido ascítico.....	65
Figura 21.	Fotomicrografia do fígado de animais com tumor de Ehrlich tratados e não tratados com a formulação nanoestruturada.....	68
Figura 22.	Fotomicrografia do rim de animais com tumor de Ehrlich tratados e não tratados com a formulação nanoestruturada.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição dos grupos experimentais conforme o tratamento e indução tumoral.....	43
Tabela 2.	Contagem diferencial de leucócitos no sangue de animais dos grupos experimentais tratados e não com a formulação nanoestruturada.....	58
Tabela 3.	Análise histopatológica do fígado de animais dos grupos experimentais tratados e não tratados com a formulação nanoestruturada.....	68
Tabela 4.	Análise histopatológica do rim de animais dos grupos experimentais tratados e não tratados com a formulação nanoestruturada.....	70

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. Câncer	18
2.2. Inflamação e câncer	19
2.3. Papel da inflamação na carcinogênese	21
2.3.1. Citocinas	24
2.3.2. Quimiocinas	28
2.3.3. Fatores de transcrição	29
2.4. Tumor de Ehrlich	30
2.5. O gênero <i>Fridericia</i> (Bignoniaceae)	32
2.6. Potencial biológico da <i>Fridericia platyphylla</i> (Cham.) LG Lohmann (sinonímia <i>Arrabidaea brachypoda</i>)	33
2.7. Braquidinas	35
2.8. Sistema de veiculação de fármacos- Copolímero Plurônico F127	37
3. OBJETIVOS	41
3.1. Geral	41
3.2. Específicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Coleta e processamento da espécie vegetal	42
4.2. Preparação da formulação nanoestruturada contendo o extrato das folhas da <i>Fridericia platyphylla</i>	42
4.3. Animais para ensaio experimental	42
4.4. Manutenção do tumor ascítico de Ehrlich e tratamento dos animais	43
4.5. Celularidade e viabilidade das células tumorais	45
4.6. Contagem diferencial por microscopia	45
4.7. Dosagem de citocinas	45
4.8. Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	46
4.9. Avaliação da angiogênese	47
4.10. Avaliação histopatológica do fígado e rim	48
4.11. Determinação de Óxido Nítrico no líquido ascítico	49
4.12. Determinação de apoptose e necrose por microscopia de fluorescência	49
4.13. Análise do ciclo celular em células tumorais do líquido ascítico	50
4.14. Análise estatística	50
5. RESULTADOS	51

5.1.	Caracterização físico-química das micelas poliméricas F127	51
5.2.	Avaliação do tratamento no peso e na celularidade do sangue periférico	51
5.3.	Efeito no desenvolvimento da ascite	52
5.4.	Efeito do tratamento na celularidade do líquido ascítico	54
5.5.	Determinação da apoptose e necrose do líquido ascítico	54
5.6.	Análise do ciclo celular	56
5.7.	Contagem diferencial por microscopia óptica	57
5.8.	Perfil imunofenotípico de células do líquido ascítico	58
5.9.	Efeito do tratamento na produção de óxido nítrico	60
5.10.	Avaliação da angiogênese	61
5.11.	Efeito do tratamento nos órgãos linfoides.....	62
5.12.	Efeito do tratamento no peso do fígado	63
5.13.	Efeito do tratamento da formulação nanoestruturada de <i>Fridericia platyphylla</i> na produção de citocinas.....	64
5.14.	Avaliação histopatológica do fígado e rim dos grupos experimentais	67
5.14.1.	Avaliação histopatológica do fígado (Figura 21)	67
6.	DISCUSSÃO	72
7.	CONCLUSÃO.....	76
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9.	APÊNCIDE A- PRODUÇÃO CIENTÍFICA (2019-2024).....	86
10.	ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA.....	93

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética que surge em decorrência de mutações cumulativas no DNA da célula, sendo considerada a segunda principal causa de mortalidade em todo mundo (Hassanpour; Dehghani, 2017; Yuan; Fuchs, 2024).

Nas últimas décadas surgiram indícios de que a resposta inflamatória desregulada, a nível molecular, é responsável pela maioria das doenças crônicas, incluindo o câncer (Fernandes *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2021). A interação entre as células normais e células geneticamente alteradas no microambiente tumoral fornecem informações importantes a respeito do desenvolvimento tumoral (Sgambato; Cittadini, 2010).

Os fatores de crescimento e mediadores inflamatórios desempenham papéis essenciais em todas as etapas do processo de carcinogênese, influenciando a proliferação celular, a resistência à morte celular por apoptose, as mutações genéticas, a angiogênese, a invasão e a metástase (Fares *et al.*, 2020). Nos últimos anos, a ciência tem testemunhado avanços significativos no tratamento do câncer. Apesar das vantagens das terapias tradicionais, como a quimioterapia e a radioterapia, é importante reconhecer suas limitações, que incluem toxicidade, efeitos colaterais graves e o desenvolvimento de resistência medicamentosa (Jafari *et al.*, 2022).

Muitos agentes quimioterápicos empregados na terapia do câncer atuam a nível de DNA, afetando diretamente o ciclo celular de forma inespecífica, e por consequência ocasionando muitos efeitos adversos (Khazir *et al.*, 2014; Reuvers *et al.*, 2020). Essas desvantagens limitam o uso de drogas antitumorais por diminuírem a qualidade de vida dos pacientes (Rayan *et al.*, 2017). Assim, sistemas de nanocarreadores têm sido utilizados para veiculação de fármacos tóxicos minimizando sua toxicidade e maximizando o efeito terapêutico (Ribeiro *et al.*, 2016). Em vista disso, o copolímero do tipo Pluronic, particularmente o F127 (poli (óxido de etileno)-(poli(óxido de propileno)-(poli(óxido de etileno) é uma alternativa para a produção de micelas poliméricas por possuírem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) para uso parenteral (Silva *et al.*, 2022).

Apesar da biotecnologia auxiliar a terapia combinada mediante o emprego de nanotransportadores para reduzir a toxicidade de fármacos convencionais,

faz-se necessário a busca por novas drogas antineoplásicas (Ribeiro *et al.*, 2016). Nesse contexto, os produtos naturais têm contribuído de forma significativa na descoberta de novos medicamentos, especialmente voltados para o tratamento de doenças infecciosas e câncer (Atanasov *et al.*, 2021).

As plantas medicinais têm sido durante décadas uma importante fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos. O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo e durante gerações, inúmeros povos tinham as plantas como única fonte de tratamento para as doenças (Atanasov *et al.*, 2015; Resende *et al.*, 2017).

Entre as plantas brasileiras com potencial biológico, destaca-se a *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann (sinonímia *Arrabidaea brachypoda*), conhecida popularmente como "tinteiro" ou "cipó-una". Esta espécie é uma importante representante do gênero *Fridericia*, possuindo diversas classes de metabólitos, como flavonoides e triterpenos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes, leishmanicidas, anti-inflamatórias e antitumorais (Nascimento *et al.*, 2022).

Os vários constituintes presentes nas diferentes espécies do gênero *Fridericia* demonstraram ampla propriedade farmacológica para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, entretanto, seu potencial tem sido pouco explorado (Nascimento *et al.*, 2022). Foi descrito recentemente que extratos hidroetanólicos brutos e compostos isolados de *F. platyphylla* revelaram propriedades antitumorais, no entanto, os mecanismos pelos quais esses compostos modulam a atividade no microambiente tumoral é pouco compreendido (Nunes *et al.*, 2020).

De acordo com Rocha *et al.* (2014) a partir da fração diclorometano (DCM) do extrato das raízes da *F. platyphylla*, foi possível identificar e caracterizar três novos compostos que foram classificados como flavonoides diméricos de estruturas incomuns, chamadas de braquidinas A, B e C. Os flavonoides fazem parte de um grupo de compostos fenólicos complexos, podendo modular o papel das enzimas antioxidantes por meio do sequestro de radicais livres ou quelando íons metálicos. Além disso, participam da inibição da proliferação celular, induzem a apoptose e modificam a expressão de genes pró-inflamatórios em células tumorais (Ullah *et al.*, 2020).

Sabe-se que a resposta inflamatória representa um componente fundamental do microambiente tumoral, sendo responsável por mediar a rede de comunicação biológica e o fluxo de sinalização molecular, que caracterizam o tecido neoplásico (Khandia; Munjal, 2019). As células inflamatórias presentes no tecido tumoral podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção do câncer pela liberação de potentes mediadores solúveis que regulam a sobrevivência e proliferação celular, angiogênese, remodelamento tecidual, metabolismo e integridade genômica (Zhao *et al.*, 2021).

Nesse cenário, os modelos experimentais de câncer em animais desempenham um papel crucial ao permitir a avaliação da ação dos compostos bioativos sobre o crescimento, cinética e principalmente no que diz respeito a resposta imunológica do hospedeiro ao tumor. Uma vez que, as células cancerosas, bem como as células estromais e inflamatórias circundantes, se envolvem em interações recíprocas bem orquestradas para formar o microambiente tumoral inflamatório (Queiroz *et al.*, 2004; Ozaslan *et al.*, 2011; Greten; Grivennikov, 2019).

Um dos modelos mais comuns é o do carcinoma de Ehrlich, que pode se desenvolver na forma ascítica, quando inoculado por via intraperitoneal, ou na forma sólida, quando inoculado por via subcutânea em camundongos (Ozaslan *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2013). Além disso, sua reprodutibilidade é fácil e o desenvolvimento rápido da neoplasia restringe o tempo de estudo (Campos *et al.*, 2013).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial antitumoral da formulação nanoestruturada contendo o extrato das folhas de *F. platyphylla* através da modulação da resposta inflamatória no microambiente tumoral.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer

O câncer é uma doença genética e a maioria das modalidades de tratamentos convencionais se concentram em matar diretamente as células tumorais (Zhao *et al.*, 2021). Nesse contexto, a resistência medicamentosa das células cancerígenas é uma das razões para a baixa eficácia da terapia e aumento da mortalidade (Bray *et al.*, 2024).

As neoplasias malignas são responsáveis por 3 em cada 10 mortes prematuras globais causadas por doenças não transmissíveis (30,3% entre as faixas etárias de 30-69 anos) e está entre as três principais causas de morte em 177 países (Bray *et al.*, 2021). O estudo das diferentes neoplasias que acomete a população humana permitiu identificar as características gerais que permitem a sobrevivência e a progressão tumoral. Esses mecanismos e propriedades fornecem uma compreensão mais abrangente sobre possíveis estratégias terapêuticas e medicamentosas que poderiam ser utilizados no tratamento do câncer (Hanahan; Weinberg, 2011; Feitosa *et al.*, 2021).

As características primordiais do câncer que permitem o crescimento do tumor e disseminação metastática fornecem uma base sólida para sua compreensão (Figura 1). Elas incluem o aumento da sinalização proliferativa, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, inativação de supressores de crescimento, angiogênese e metástase (Hanahan; Weinberg, 2011).

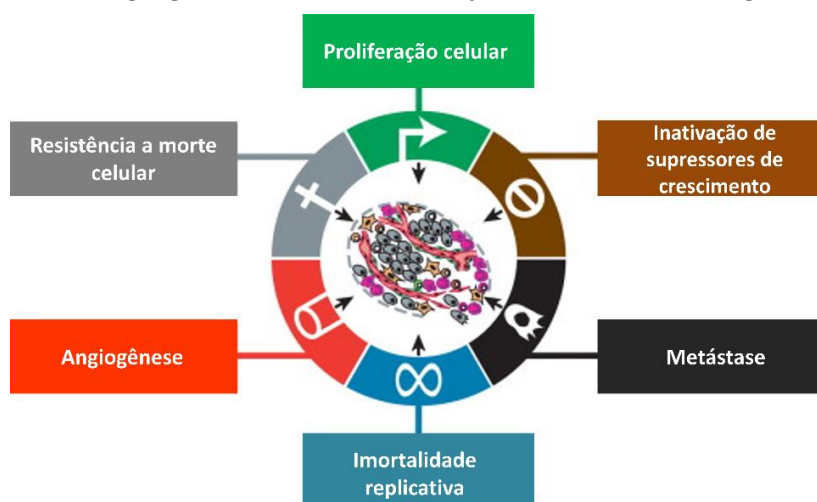


Figura 1. Características do câncer. Representação das características do câncer que permitem que a doença se estabeleça. As características incluem: proliferação celular, inativação de supressores de crescimento, metástase, imortalidade replicativa, angiogênese e resistência à morte celular

Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

A aquisição dessas características pelas células tumorais está diretamente ligada a mutações genéticas. Destas, apenas 5-10% ocorrem na linhagem germinativa, enquanto a maioria (90%) está relacionada a mutações somáticas e fatores ambientais. Cerca de 20% dos cânceres estão associados a inflamação crônica, 30% ao tabagismo e 35% a fatores ambientais (Grivennikov *et al.*, 2011).

Esses fatores estão diretamente ligados ao processo de formação das células neoplásicas, chamado de carcinogênese. Este processo é caracterizado por mutações genéticas que levam a ativação de oncogenes, responsáveis por transformar células normais em tumorais (Darwiche, 2020). A carcinogênese é composta por três estágios denominados de iniciação, promoção e progressão tumoral (INCA, 2024).

O estágio de iniciação é caracterizado por mutações em genes normais, causadas por agentes cancerígenos, que podem provocar alterações irreversíveis no funcionamento das células afetadas. No estágio de promoção, as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos oncopromotores e a célula iniciada é transformada em célula maligna de forma lenta e gradual. O terceiro e último estágio é chamado de progressão, na qual, as células malignas se multiplicam de forma descontrolada e podem adquirir a capacidade de subverter o sistema imunológico do hospedeiro (INCA, 2024). Deste modo, o câncer é uma doença com alta complexidade, pois além das células cancerosas, os tumores também são formados por células recrutadas e células inflamatórias que formam o estroma tumoral. Esses elementos e interações contribuem para aquisição de novas características e promovem a formação do microambiente tumoral (Feitosa *et al.*, 2021). Ademais, a remodelação da matriz extracelular colabora com o microambiente tumoral, participando da progressão, migração e disseminação neoplásica (Jiang *et al.*, 2020).

2.2. Inflamação e câncer

O desenvolvimento do câncer e sua resposta à terapia é regulado pela inflamação e esse mecanismo pode promover ou impedir a progressão tumoral (Zhao *et al.*, 2021). A resposta inflamatória representa um elemento essencial

no microambiente tumoral, mediando a rede de comunicação biológica e a sinalização molecular do tecido neoplásico (Atsumi *et al.*, 2014).

A primeira proposição documentada que sugeriu a associação entre inflamação e câncer foi atribuída ao patologista alemão Rudolf Virchow em 1863 (Grivennikov *et al.*, 2011). Essa hipótese baseou-se em achados de infiltrados inflamatórios em tumores sólidos que posteriormente, foi reconhecido como uma característica fundamental do câncer (Hanahan; Weinberg, 2011).

A inflamação consiste em uma resposta biológica complexa e coordenada do sistema imunológico a estímulos nocivos, como infecções, danos celulares ou irritações (Suarez-Carmona *et al.*, 2017). Caracteriza-se por uma série de eventos moleculares e celulares, incluindo a liberação de mediadores químicos, recrutamento de leucócitos ao local afetado, aumento da permeabilidade vascular, e indução de sinais clássicos como rubor, calor, edema, dor e perda de função (Greten; Grivennikov, 2019).

A resposta inflamatória visa eliminar o agente causal, remover células danificadas e iniciar processos de reparo tecidual. Em particular, a inflamação aguda é uma resposta inicial à agressão celular ou tecidual, na qual, o reconhecimento exercido pelas células da imunidade inata pode dar início a resposta imune efetiva contra as células neoplásicas. Esse processo pode levar à ativação da imunidade adaptativa, onde as células dendríticas da imunidade inata apresentam antígenos tumorais aos linfócitos T, iniciando uma resposta imune mais específica (Grivennikov *et al.*, 2010; Greten; Grivennikov, 2019).

Por outro lado, o tumor pode cooptar os mecanismos da inflamação, levando a inflamação crônica, criando um microambiente imunossupressor que favorece a tumorigênese, progressão, metástase e resistência ao tratamento (Shalapour; Karin, 2015). Nesse contexto, o tumor manipula a imunidade inata e adaptativa para promover um ambiente que suprime a resposta imune efetiva (Th1), permitindo seu crescimento e sobrevivência (Hanahan; Weinberg, 2011).

Além disso, a inflamação também pode afetar a vigilância imunológica e as respostas à terapia (Grivennikov *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2021). Sabe-se que a inflamação crônica desregulada tem sido associada ao aumento do risco de malignidades e progressão do câncer na maioria das neoplasias (Elinav *et al.*, 2013).

Atualmente, está bem estabelecido que um ambiente inflamatório, caracterizado pela presença de células imunológicas ativadas de forma subótima, fatores de crescimento, estroma ativado e agentes promotores de danos ao DNA, pode potencializar o risco neoplásico (Zhao *et al.*, 2021). Este microambiente inflamatório proporciona condições propícias para a sobrevivência, proliferação e invasão das células tumorais, além de facilitar a angiogênese e a evasão da resposta imune. Os fatores de crescimento, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e TGF- β (fator de crescimento transformador beta), estimulam a proliferação celular e a formação de novos vasos sanguíneos, enquanto o estroma ativado fornece suporte estrutural e sinais bioquímicos que promovem a progressão tumoral. Além disso, os agentes que causam danos ao DNA, como espécies reativas de oxigênio (ERO), contribuem para a instabilidade genômica, aumentando as mutações genéticas que podem levar ao desenvolvimento do câncer (Zhao *et al.*, 2021; Grivennikov *et al.*, 2011).

Nesse contexto, tem sido discutido o papel crucial da inflamação na tumorigênese. Propõe-se que o estado de ativação das células presentes no microambiente tumoral é determinante na direção que a inflamação tomará: induzir o crescimento tumoral ou ativar a imunidade antitumoral (Zhao *et al.*, 2021).

2.3. Papel da inflamação na carcinogênese

A inflamação contribui para o desenvolvimento da carcinogênese através da indução de instabilidade genética, alterações epigenéticas, proliferação celular exacerbada, indução da angiogênese e promoção da invasão (Mantovani *et al.*, 2008; Atsumi *et al.*, 2014). A relação entre inflamação e câncer é mediada por duas vias: via intrínseca e via extrínseca. A via intrínseca é impulsionada por alterações genéticas que ocorrem nas células tumorais, incluindo a ativação de oncogenes, amplificação ou rearranjos cromossômicos e a inativação de genes supressores tumorais. Essas alterações promovem uma desregulação no controle do ciclo celular, resistência à apoptose e aumento da proliferação celular, estabelecendo condições favoráveis para o desenvolvimento tumoral. Simultaneamente, essas células geneticamente alteradas estimulam a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, que recrutam células

do sistema imune inato e adaptativo para o microambiente tumoral, intensificando a inflamação local e contribuindo para o suporte do crescimento tumoral (Mantovani *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2021).

Por outro lado, a via extrínseca é desencadeada por condições inflamatórias preexistentes, como infecções crônicas, doenças autoimunes ou exposições prolongadas a agentes irritantes. Essas condições levam à produção sustentada de mediadores inflamatórios e radicais livres, que não apenas induzem danos ao DNA, mas também favorecem a remodelação da matriz extracelular, angiogênese e supressão da resposta imune antitumoral. A persistência desse estado inflamatório cria um ambiente permissivo para a transformação maligna e progressão tumoral, aumentando significativamente o risco de desenvolvimento do câncer (Mantovani *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2021).

As duas vias (Figura 2) unem-se para ativação de fatores de transcrição, em especial o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) e fator induzido por hipóxia-1 alfa (HIF-1 α). Estes fatores de transcrição são responsáveis por ativar mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, COX-2 (Ciclooxigenase-2) e ativação da enzima óxido nítrico-sintase (síntese de NO). Esses fatores são importantes para ativar as vias moleculares da inflamação relacionadas ao câncer (Coussens; Werb, 2002; Mantovani *et al.*, 2008; D'Ignazio *et al.*, 2017).

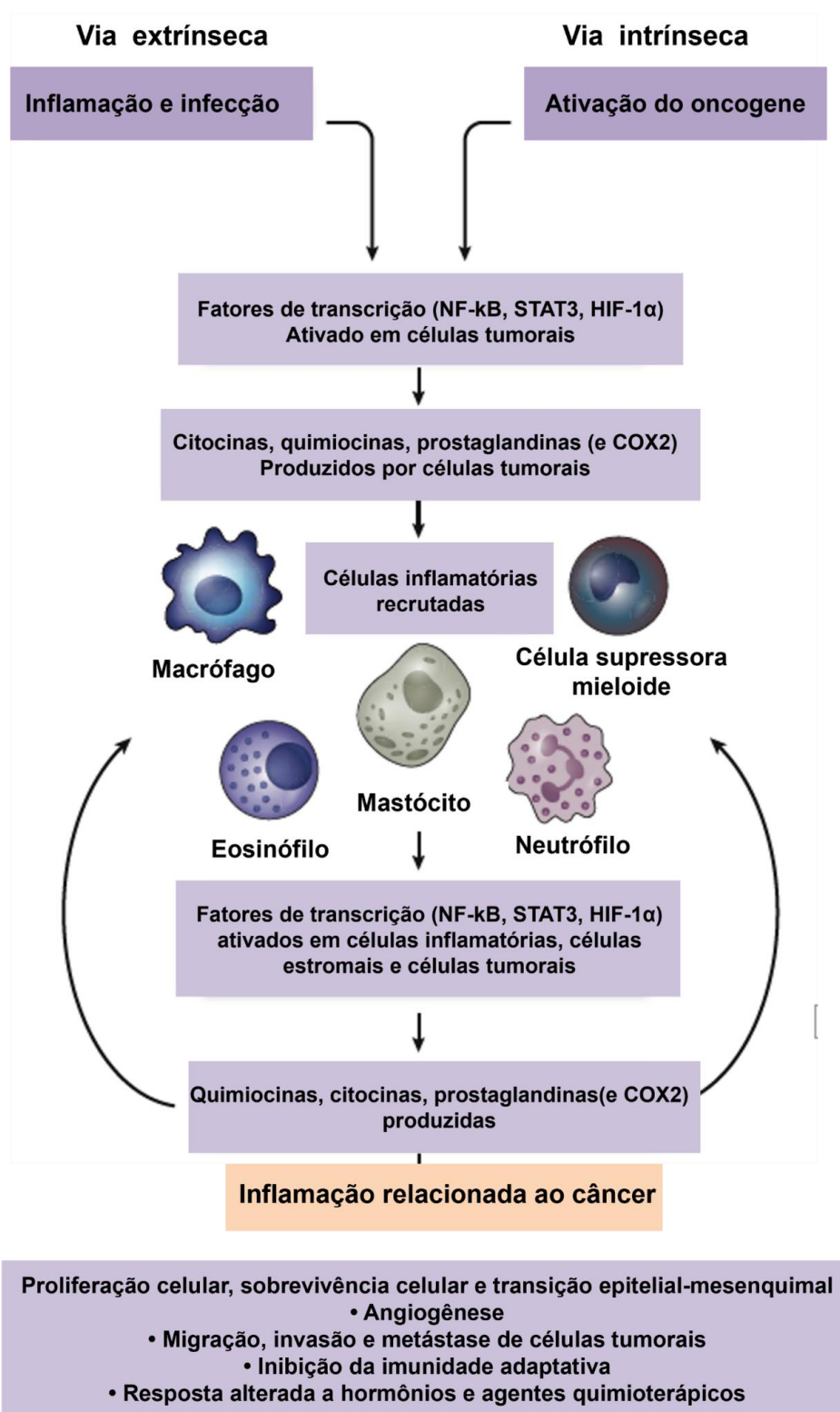


Figura 2. Vias que conectam a inflamação ao câncer. A representação esquemática destaca características que permitem o estabelecimento da doença. A via extrínseca é iniciada por inflamação e infecção, enquanto a via intrínseca é ativada pela oncogênese.

Ambas as vias levam à ativação de fatores de transcrição (NF- κ B, STAT3, HIF-1 α) em células tumorais, que produzem citocinas, quimiocinas e prostaglandinas (e.g., COX2).

Fonte: Adaptado de Mantovani *et al.*, 2008.

Assim, as citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, NF- κ B, HIF-1 α e STAT-3, foram identificados como os principais reguladores envolvidos no processo inflamatório e no câncer (Zhao *et al.*, 2021). Para compreender o papel da inflamação na evolução da carcinogênese, é importante entender como os mediadores inflamatórios contribuem para os processos fisiológicos e patológicos, sendo descritos abaixo os principais:

2.3.1. Citocinas

- **TNF- α**

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por macrófagos ativados em resposta a infecções e inflamações (Grivennikov *et al.*, 2011). Tem papel crucial na resposta imunológica, promovendo a ativação de células imunológicas, fagocitose, vasodilatação e apoptose (Van Horssen *et al.*, 2006). No câncer, TNF- α pode induzir a morte de células tumorais e destruir vasos sanguíneos tumorais, reduzindo o crescimento do tumor (Van Loo; Bertrand, 2023).

No entanto, a produção sustentada de TNF- α pode ser cooptada pelo tumor para promover a angiogênese, criando vasos sanguíneos que nutrem o tumor (Dudley; Griffioen 2023). A inflamação crônica resultante da presença contínua de TNF- α cria um ambiente favorável à sobrevivência e proliferação das células tumorais. Além disso, pode contribuir para a resistência aos tratamentos quimioterápicos (Liu *et al.*, 2022).

Mecanismos de morte induzidos pelo TNF- α incluem a apoptose, um processo de morte celular programada, e a necrose, onde as células tumorais são destruídas de forma não programada, resultando em inflamação. O TNF- α se liga aos receptores TNFR1 e TNFR2, ativando vias intracelulares como NF- κ B, que promovem a transcrição de genes pró-inflamatórios e de sobrevivência celular (Van Loo; Bertrand, 2023). A ativação de caspases leva à apoptose, enquanto a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode resultar em necrose (Anderton *et al.*, 2020).

No tumor de Ehrlich na forma ascítica, o TNF- α não apresenta um aumento significativo e não está associado à progressão tumoral (Gentile *et al.*, 2015). Todavia, na sua forma sólida, o aumento dessa citocina durante o desenvolvimento tumoral está relacionado à caquexia induzida nesse modelo (Frajacomo *et al.*, 2016).

- **IL-6**

A interleucina-6 (IL-6) é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes no contexto fisiológico/patológico, sendo produzida por diversas células como macrófagos, células T, células B, fibroblastos e células endoteliais. Esta citocina desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune e inflamatória, tanto em condições normais quanto patológicas (Eiró; Vizoso, 2012; Aliyu *et al.*, 2022).

A IL-6 é essencial para a ativação e diferenciação de linfócitos T e B, fortalecendo a resposta imunológica adaptativa. Durante infecções, estimula a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, como a proteína C reativa (PCR), limitando a propagação da infecção (Mohamed *et al.*, 2024). Além disso, IL-6 promove a diferenciação de células T reguladoras (Tregs), cruciais para a manutenção da autotolerância e prevenção de doenças autoimunes (Skartsis *et al.*, 2021).

No contexto do câncer, a IL-6 pode ser cooptada pelo tumor para promover a sobrevivência e proliferação das células cancerígenas. A via de sinalização JAK/STAT, ativada por IL-6, aumenta a expressão de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 e pró-proliferativos como c-Myc, facilitando o crescimento tumoral (Mohamed *et al.*, 2024). Além disso, IL-6 induz a angiogênese, criando vasos sanguíneos que fornecem nutrientes e oxigênio para o tumor, promovendo sua expansão (Middleton *et al.*, 2014).

A IL-6 contribui para a criação de um microambiente imunossupressor, facilitando a evasão das células tumorais da detecção pelo sistema imunológico. Pode induzir a produção de citocinas imunossupressoras como IL-10 e promover a expansão de células mieloides supressoras (MDSCs) e células T reguladoras (Tregs), que inibem a resposta antitumoral efetiva (Soler *et al.*, 2023).

A produção contínua de IL-6 pode levar a um estado de inflamação crônica, associado à progressão do câncer. A inflamação crônica promove

alterações no microambiente tumoral, como a remodelação da matriz extracelular e a indução de mutações genéticas adicionais nas células tumorais, aumentando a agressividade e a resistência ao tratamento (Huang *et al.*, 2022). Além disso, na forma ascítica do tumor de Ehrlich, o aumento de IL-6 está relacionado a alterações metabólicas compatíveis com a caquexia, sendo a sua expressão associada aos macrófagos M2 (Molotkov *et al.*, 1998; Radulski *et al.*, 2023).

- **IFN- γ**

O interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina que pode desempenhar funções anti- e pró-tumorigênicas, podendo ativar ou inibir a transcrição de mRNA de genes inflamatórios (Zaidi, 2019; Zhao *et al.*, 2021). É uma citocina produzida por células T auxiliares do tipo 1 (Th1), células NK e algumas células T CD8⁺ (Kak *et al.*, 2018).

IFN- γ é conhecido por sua capacidade de estimular a resposta imune contra células tumorais (Th1). Esta citocina ativa macrófagos e células natural killer (NK), que desempenham funções citotóxicas diretas contra células tumorais (de Groen *et al.*, 2015). Ademais, o IFN- γ aumenta a apresentação de antígenos tumorais e ativa células dendríticas, aprimorando a capacidade do sistema imunológico adaptativo de detectar e eliminar células transformadas (Zhou, 2009). A ativação das vias de sinalização JAK/STAT pelo IFN- γ leva à transcrição de genes que promovem a apoptose e inibem a proliferação celular (Su *et al.*, 2020).

Apesar de seus efeitos antitumorais, IFN- γ pode, em certas condições, promover a progressão do câncer. Em um ambiente tumoral crônico, IFN- γ pode induzir a expressão de genes inflamatórios que favorecem a sobrevivência e proliferação das células tumorais (Zaidi, 2019). A indução de enzimas pró-inflamatórias, como a COX-2, pela sinalização de IFN- γ pode levar à produção de prostaglandinas que suportam o crescimento do tumor (Kulesza *et al.*, 2023). Além disso, IFN- γ pode contribuir para a criação de um microambiente imunossupressor, facilitando a evasão das células tumorais da resposta imunológica (Rožman; Švajger, 2018).

No tumor ascítico de Ehrlich, a produção de IFN- γ é inicialmente baixa, crescendo gradativamente após 10 dias de inoculação. Sua produção não está

vinculada aos linfócitos presentes na cavidade peritoneal (Fernandes *et al.*, 2015). A produção de IFN- γ e de outros mediadores induz um processo inflamatório sistêmico, caracterizado por neutrofilia, aumento de macrófagos, trombocitopenia, esplenomegalia e hematopoiese esplênica nesse modelo (Radulski *et al.*, 2023).

Experimentos com macrófagos demonstraram que a ascite pode polarizar esses macrófagos para um perfil menos imunogênico e mais tolerogênico (M2). A produção de IFN- γ desde o início da indução parece ser uma forma de manter uma população de macrófagos (M1) capazes de conter o avanço do tumor por tempo limitado (Kalish *et al.*, 2015).

- **IL-10**

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória produzida por várias células, incluindo células T reguladoras (Tregs), células B, macrófagos e células dendríticas (Saraiva; O'garra, 2010). Esta citocina desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune e na manutenção da homeostase imunológica, atuando como um regulador central da inflamação (Ouyang *et al.*, 2011).

A IL-10 é conhecida por sua capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , promovendo um ambiente anti-inflamatório (Fujio *et al.*, 2010). Durante infecções, IL-10 ajuda a controlar a resposta inflamatória, prevenindo danos excessivos aos tecidos. Além disso, IL-10 promove a sobrevivência e proliferação de células T reguladoras (Tregs), que são essenciais para a manutenção da tolerância imunológica e prevenção de doenças autoimunes (Cope *et al.*, 2011).

No contexto do câncer, IL-10 pode ter funções ambíguas. Por um lado, ela pode suprimir a resposta imunológica contra o tumor (Th1), favorecendo a sobrevivência das células cancerígenas (Mannino *et al.*, 2015). Por outro lado, IL-10 pode ajudar a controlar a inflamação crônica associada ao câncer, reduzindo a progressão da doença. A via de sinalização Jak1/Tyk2 e STAT3 ativada por IL-10 é crucial para essas funções (Carlini *et al.*, 2023). Durante muitas infecções, células T CD4⁺ produzem tanto IFN- γ (a citocina característica de Th1) quanto IL-10. A IL-10 produzida por células Th1 efectoras ajuda a

controlar a inflamação excessiva, mas isso pode também limitar a eficácia da resposta imunológica (Kubo; Motomura, 2012).

No tumor ascítico de Ehrlich, existe um aumento progressivo de IL-10 na ascite, que parece tentar contrabalançar a ação de citocinas inflamatórias como MCP-1 (Fernandes *et al.*, 2015). A produção de IL-10 provavelmente representa uma tentativa do organismo de conter o processo inflamatório causado pelo desenvolvimento tumoral.

2.3.2. Quimiocinas

As quimiocinas fazem parte de uma família de citocinas que são responsáveis por controlar a migração leucocitária em condições de homeostase. As células neoplásicas produzem uma variedade de quimiocinas que são quimioatraentes para mastócitos, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais. As células do sistema imunológico recrutadas pelas quimiocinas potencializam o crescimento tumoral, estimulando a angiogênese e disseminação metastática (Coussens; Werb, 2002; Mantovani *et al.*, 2008).

No contexto do tumor ascítico de Ehrlich, as quimiocinas desempenham papéis cruciais na modulação do microambiente tumoral e no desfecho do desenvolvimento tumoral. CCL2 (MCP1) é uma quimiocina que recruta monócitos e macrófagos para o local do tumor, promovendo inflamação e angiogênese. Durante o desenvolvimento tumoral na forma ascítica do tumor de Ehrlich, essa citocina aumenta progressivamente, atingindo o pico no 14º dia de inoculação (Fernandes *et al.*, 2015). No microambiente tumoral ascítico, os macrófagos associados a tumores (TAMs) liberam fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, que promovem a sobrevivência, proliferação e invasividade das células tumorais. Esse ambiente inflamatório sustentado favorece a tumorigênese e a progressão do câncer (Wang *et al.*, 2022).

A interação dessas quimiocinas e das células recrutadas pode levar a diferentes desfechos no tumor. A promoção da tumorigênese ocorre quando o microambiente tumoral é dominado por sinais pró-inflamatórios e angiogênicos, que facilitam a sobrevivência e expansão das células cancerígenas (Marcuzzi *et al.*, 2018). Em contraste, a indução de respostas imunológicas eficazes pode resultar na destruição das células tumorais e no potencial regressão do tumor

(Ozga, Chow, Luster, 2021). Portanto, a manipulação terapêutica das vias de sinalização dessas quimiocinas e dos tipos celulares recrutados representa uma estratégia promissora para o tratamento do câncer.

2.3.3. Fatores de transcrição

- **NF- κ B**

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é um dos principais elos de comunicação entre a inflamação e a carcinogênese, permitindo o escape das células tumorais da apoptose (Naugler; Karin, 2008).

No contexto fisiológico, o NF- κ B desempenha um papel importante na regulação da resposta imune e inflamatória. Ele é ativado em resposta a vários estímulos, como citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), estresse oxidativo e infecções. Uma vez ativado, o NF- κ B transloca-se para o núcleo da célula, onde se liga ao DNA e regula a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na inflamação, sobrevivência celular, proliferação e angiogênese. Isso permite que o organismo responda rapidamente a infecções e lesões, promovendo a defesa contra patógenos e a cicatrização de feridas (Gilmore, 2006).

No câncer, a ativação de NF- κ B pode ter efeitos pró-tumorigênicos. NF- κ B regula a expressão de produtos de genes associados à proliferação tumoral, como Ciclina D1, c-myc e COX-2. A ativação de NF- κ B promove a transcrição de genes que aumentam a progressão do ciclo celular e a resistência à apoptose, facilitando o crescimento e a expansão dos tumores (Naugler; Karin, 2008). A desregulação da via de sinalização de NF- κ B está associada a uma variedade de cânceres, incluindo câncer de mama, pulmão, próstata e cólon (Zhang *et al.*, 2021).

O NF- κ B permite que as células tumorais escapem da apoptose. A ativação deste fator de transcrição resulta na expressão de genes antiapoptóticos, como BCL-2 e BCL-xL, que previnem a apoptose das células tumorais, permitindo sua sobrevivência e proliferação contínua mesmo em condições adversas (Hayden; Ghosh, 2012).

Nesse sentido, NF- κ B desempenha um papel na criação de um microambiente tumoral imunossupressor. Ele regula a expressão de citocinas e quimiocinas que recrutam células imunossupressoras, como as células

mieloides supressoras (MDSCs) e células T reguladoras (Tregs), que inibem a resposta imunológica antitumoral efetiva. Isso facilita a evasão das células tumorais da detecção pelo sistema imunológico (Taniguchi; Karin, 2018).

- **STAT3**

O transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT-3) um fator de transcrição envolvido na mediação da sinalização de citocinas e um importante regulador na resposta inflamatória de macrófagos. A ativação de STAT3 em células neoplásicas induz a invasão e inibe a maturação de células dendríticas (Yu *et al.*, 2009). Quando ativado por citocinas como IL-6 e IL-10, STAT3 se dimeriza e transloca-se para o núcleo, onde regula a expressão de genes responsáveis pela sobrevivência celular, proliferação e diferenciação (Hillmer *et al.*, 2016).

No contexto fisiológico, o STAT3 desempenha um papel essencial na resposta imune e inflamatória. Ele promove a diferenciação de macrófagos em células com propriedades anti-inflamatórias, auxiliando na resolução da inflamação e na reparação de tecidos danificados (Bode *et al.*, 2012). Além disso, STAT3 é fundamental para a homeostase de células T, influenciando a resposta imune adaptativa através da formação de células reguladoras (Schmetterer; Pickl, 2017).

Todavia, em células neoplásicas, a ativação persistente de STAT3 pode induzir a invasão das células tumorais e inibir a maturação de células dendríticas, comprometendo a apresentação de antígenos e a resposta imunológica contra o tumor (Yu *et al.*, 2009).

Além do mais, o STAT3 regula a expressão de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , e quimiocinas que recrutam células mieloides supressoras (MDSCs) e células T reguladoras (Rébé *et al.*, 2013). Adicionalmente, promove a angiogênese pela produção de novos vasos sanguíneos que fornecem nutrientes e oxigênio ao tumor, facilitando sua expansão (Jones *et al.*, 2016).

2.4. Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi descrito pela primeira vez pelo médico alemão Paul Ehrlich em 1906, como um adenocarcinoma mamário espontâneo de

camundongos fêmeas (Matsukaki, 2004). Esse tumor possui alto poder tumorigênico, crescimento rápido, isento de regressão espontânea e sua agressividade pode ser controlada através do controle quantitativo do inóculo tumoral (Feitosa *et al.*, 2021). Esse modelo pode ser empregado em suas formas sólida ou ascítica, dependendo da via de inoculação, permitindo investigar diferentes aspectos da biologia tumoral, como proliferação celular, angiogênese, resistência à apoptose e mecanismos metastáticos (Ozaslan *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2013).

Na forma sólida, o tumor de Ehrlich é utilizado para estudar a interação tumor-hospedeiro, incluindo remodelação da matriz extracelular e invasão tecidual, enquanto na forma ascítica, é amplamente explorado para avaliar a dinâmica de crescimento tumoral em microambientes ricos em fluido inflamatório e metabolismo alterado (Feitosa *et al.*, 2021). Além disso, o modelo ascítico é valioso para examinar o impacto do microambiente inflamatório sobre as respostas imunológicas, tanto no contexto da vigilância antitumoral quanto da imunossupressão induzida pelo tumor (Radulski *et al.*, 2023).

A versatilidade do tumor de Ehrlich o torna também relevante para investigações de terapias antitumorais, incluindo a avaliação de agentes quimioterápicos e imunomoduladores, bem como para o estudo de distúrbios imunológicos associados ao câncer, como imunossupressão tumoral e polarização de macrófagos (Gentile *et al.*, 2015; Kalish *et al.*, 2015).

Na oncologia experimental, o tumor de Ehrlich é largamente utilizado como modelo tumoral para testar a ação antineoplásica de drogas. Assim como permite avaliação de aspectos imunológicos e bioquímicos, essenciais para entender a eficácia e os mecanismos de ação de potenciais terapias anticâncer (Symchych *et al.*, 2017).

A resposta imune no tumor ascítico de Ehrlich apresenta uma dinâmica bifásica. Inicialmente, há ativação de mecanismos efetores que buscam conter a proliferação tumoral. Essa fase é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , que estimulam a atividade de macrófagos e células NK, além de promoverem a apresentação de antígenos por células dendríticas para linfócitos T, fortalecendo a resposta imune adaptativa (de Groen *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2015). Essa resposta inicial pode limitar o avanço tumoral em estágios precoces. À medida que o tumor progride, ocorre uma

mudança no microambiente tumoral, favorecendo a imunossupressão e a progressão neoplásica. A polarização de macrófagos para o perfil M2, o aumento de citocinas imunossupressoras, como IL-10, e o recrutamento de células T reguladoras e células mieloides supressoras (MDSCs) criam um ambiente tolerogênico, que protege as células tumorais da eliminação imunológica (Radulski *et al.*, 2023; Kalish *et al.*, 2015). Além disso, a inflamação crônica promove angiogênese, remodelação tecidual e instabilidade genômica, contribuindo para a progressão tumoral e resistência terapêutica (Zhao *et al.*, 2021).

A resistência à morte celular e agressividade do tumor de Ehrlich estão associadas à alta expressão de chaperonas Hsp70 que promovem a proliferação, invasão e metástase. Além disso, as células deste tumor não apresentam receptores de estrógeno (Matsukaki, 2004). Ressalta-se que, o tumor de Ehrlich é um modelo espécie-específico, desenvolvendo-se em diferentes linhagens de camundongos e, sugere-se que o principal motivo da capacidade de crescimento em diferentes cepas murinas é devido a perda de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) das células tumorais de Ehrlich (Feitosa *et al.*, 2021).

2.5. O gênero *Fridericia* (Bignoniaceae)

O gênero *Fridericia* pertence à família Bignoniaceae que inclui 80 gêneros e cerca de 840 espécies que estão distribuídas desde o México até a Argentina e Sul do Brasil (Kaehler *et al.*, 2019).

A planta com maior destaque sobre seu uso popular é a *Fridericia Chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann, popularmente conhecida como “Cipó-pau”, “Carapiranga”, “Cipó-crus” ou “Pariri”, comum na região amazônica é bastante utilizada como anti-inflamatório, antianêmico, cicatrização de feridas e adstringente (Brandão *et al.*, 2010). Esta espécie tem sido amplamente investigada, pois faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema único de Saúde (RENISUS) desde 2009 (Do Nascimento *et al.*, 2022).

A segunda espécie em termos de importância é a *F. platyphylla*. As suas raízes são utilizadas na medicina tradicional no nordeste e sudeste do Brasil para dores nas articulações e pedras nos rins (Do Nascimento *et al.*, 2022).

Muitas espécies do gênero *Fridericia* são utilizadas na medicina popular devido suas propriedades antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (Rocha *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2017). Das 60 espécies que fazem parte desse gênero, apenas 11 foram alvo de investigação em estudos químicos, 84 substâncias foram descritas e 44 destes produtos naturais pertencem à classe dos flavonoides (Carvalho *et al.*, 2022).

A literatura discorre sobre o potencial biológico das espécies do gênero *Fridericia* e menciona que seus compostos extraídos de extratos apresentaram atividade leishmanicidas, antimicrobianas e atividades antitumorais da fração hidroetanólica e braquidinas isoladas (Rocha *et al.*, 2018; Nunes *et al.*, 2020; Serpeloni *et al.*, 2020; De Sousa Andrade *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2022). Os vários constituintes presentes nas diferentes espécies demonstraram amplo potencial farmacológico para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Do Nascimento *et al.*, 2022).

2.6. Potencial biológico da *Fridericia platyphylla* (Cham.) LG Lohmann (sinonímia *Arrabidaea brachypoda*)

A *F. platyphylla* (Figura 3) é uma planta em forma de arbusto, de origem não endêmica, presente em todas as regiões brasileiras, com exceção dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Amapá e Rio Grande do Norte (Kaehler *et al.*, 2019). De acordo com Pereira *et al.* (2012), o extrato bruto das folhas desta espécie e suas frações demonstraram atividade leishmanicida sob as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonenses*, inibindo a ação de enzimas e proteases importantes para a sobrevivência do parasita, no entanto, não apresentaram efeitos antioxidantes.



Figura 3. *Fridericia platyphylla*. Imagem de *Fridericia platyphylla* exibindo flores roxas em diferentes estágios de floração. O gênero *Fridericia* pertence à família Bignoniaceae, que inclui 80 gêneros e cerca de 840 espécies. Esta planta é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antileishmanicidas e antitumorais.

Fonte: Rocha *et al.*, 2017.

Em outro estudo, o extrato etanólico das raízes de *F. platyphylla* demonstraram efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em camundongos, inibindo a formação de granulomas (Rocha *et al.*, 2011). Além disso, estudos recentes com o extrato hidroetanólico das raízes de *F. platyphylla* mostraram efeito gastroprotetor em ensaios com ratos portadores de úlcera gástrica, sendo observada uma diminuição significativa dos danos causados pela úlcera (Rocha *et al.*, 2017).

Em estudos realizados por Rocha *et al.* (2014), avaliou-se a atividade das braquidinas A, B e C contra tripomastigotas extracelulares de *Trypanosoma cruzi*. A braquidina A foi inativa enquanto as braquidinas B e C exibiram atividade citotóxica. Ademais, em ensaio *in vivo* com camundongos infectados com *T. cruzi*, a braquidina B reduziu a mortalidade dos animais quando comparados com o grupo controle.

Por sua vez, Rocha *et al.* (2019) avaliou a atividade antileishmanicida dos três novos flavonoides raros e observou que a braquidina B foi a mais ativa contra a forma promastigota de *Leishmania sp.* mas sem exibir toxicidade para células hospedeiras.

Em estudos sobre a atividade antitumoral do extrato da *F. platyphylla*, Serpeloni *et al.* (2020) avaliaram extratos hidroetanólicos brutos das raízes desta espécie que demonstrou citotoxicidade em células de câncer gástrico, mediado por necrose. Observou-se também a redução de genes envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose.

Nunes *et al.* (2020) examinaram o efeito das braquidinas A, B e C em uma linhagem de células de câncer de próstata (PC-3) e os ensaios de viabilidade/citotoxicidade realizados mostraram redução da proliferação celular. Embora o presente estudo tenha avaliado o efeito das braquidinas apenas em linhagens celulares de câncer de próstata, foi possível definir limites mínimos de toxicidade que poderão ser usados em trabalhos subsequentes para analisar sua eficácia sem consequência adversa.

O trabalho de Alcerito *et al.* (2002) descreveu atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* do extrato das folhas de *F. platyphylla* e a

análise fitoquímica revelou alto conteúdo de flavonoides, na qual, o cirsiol foi pela primeira descrito na família Bignoniaceae. Em outro trabalho, Rocha *et al.* (2015) avaliaram a atividade anti-inflamatória do triterpeno olenano da *F. platyphylla* e confirmaram seu efeito antiflogístico. Estas pesquisas reforçam a importância do potencial biológico das espécies do gênero *Fridericia* para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Uma revisão abrangente sobre o gênero *Fridericia* destacou os diversos efeitos biológicos dos extratos e compostos isolados de diferentes partes da planta, com ênfase em suas atividades anti-inflamatórias e antitumorais (Henrique *et al.*, 2024). Nesse contexto, o triterpenoide do tipo oleanano, extraído das raízes de *Fridericia platyphylla*, demonstrou atividade anti-inflamatória em doses de 5, 10 e 15 mg/kg, administradas por via oral. Esses efeitos foram evidenciados pela redução do edema da pata induzido por carragenina e pela diminuição do tempo de lambida em camundongos submetidos à injeção subplantar de formalina, indicando potente ação anti-inflamatória (Rocha *et al.*, 2015). A maioria dos estudos relacionados aos efeitos antitumorais desse gênero foi conduzida *in vitro*, sendo encontrado apenas um estudo *in vivo* avaliando o impacto do extrato aquoso e etanólico de *Arrabidaea chica* (folhas) sobre o tumor sólido de Ehrlich em camundongos. Ambos os extratos, administrados na dose de 30 mg/kg por via oral, reduziram significativamente o desenvolvimento tumoral após dez dias de tratamento. O extrato etanólico apresentou ação antitumoral direta, evidenciada pelo aumento de neutrófilos, alterações nos níveis de globulinas séricas e redução de células T CD4⁺ no sangue, sugerindo um efeito citotóxico direto sobre as células tumorais, sem alterar as células mononucleares inflamatórias no microambiente tumoral. Por outro lado, o extrato aquoso demonstrou atividade antitumoral associada a uma ação anti-inflamatória, com redução das células T CD3⁺ no tumor, especialmente nas subpopulações T CD8⁺ e NK, além de diminuir as células T CD4⁺ no sangue (Ribeiro *et al.*, 2012). Com base nesses achados, foram utilizadas doses de 10 e 25 mg/kg para investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios e antitumorais da formulação contendo as folhas de *Fridericia platyphylla* no modelo ascítico do tumor de Ehrlich neste trabalho.

2.7. Braquidinas

As braquidinas são flavonoides inéditos isolados do extrato hidroalcoólico da porção diclorometano das raízes da *F. platyphylla* (Rocha *et al.*, 2014). Para isolar esses compostos ativos, os autores deste trabalho dividiram o extrato em uma fração de CH₂CL₂ (diclorometano) e fizeram a análise por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo as três estruturas descobertas denominadas de braquidinas A, B e C (Figura 4). A braquidina A possui um grupo hidroxila (OH) no anel C, a braquidina B possui um grupo metóxi (OCH₃) e a braquidina C não possui radical, respectivamente.

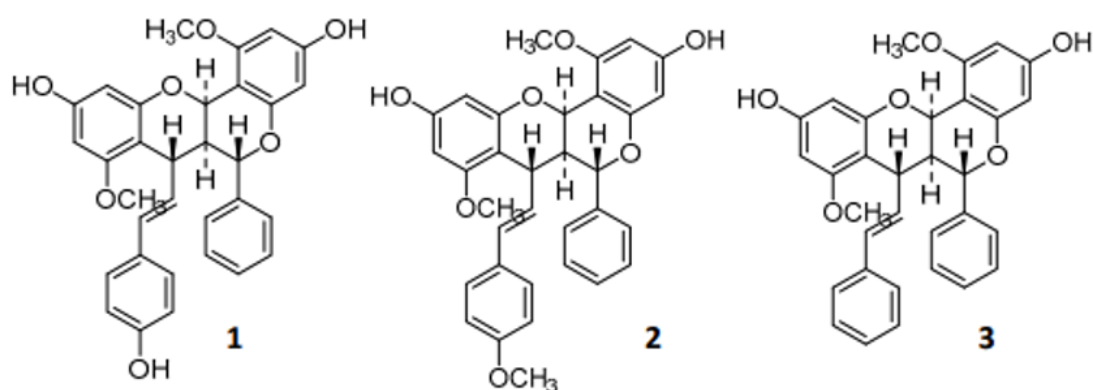


Figura 4: Estrutura química das braquidinas isoladas da *F. platyphylla*.

Fonte: Rodrigues *et al.*, 2017.

A atividade das braquidinas A, B e C foram avaliadas em ensaio *in vivo*, utilizando camundongos infectados com *T. cruzi*, na qual, a braquidina B (100 mg/Kg) reduziu a presença de parasitos no sangue e a mortalidade dos animais (Rocha *et al.*, 2014).

Em recente estudo, a associação das braquidinas A, B e C do extrato das raízes de *F. platyphylla* foi investigada quanto aos seus efeitos contra a dor aguda em camundongos Swiss machos e suas interações com os nociceptores. Os dados mostraram uma redução da resposta nociceptiva dos camundongos relacionados ao alívio da dor aguda (Rodrigues *et al.*, 2017).

Rocha *et al.* (2018) investigaram o potencial leishmanicida das braquidinas, sendo observado atividade farmacológica da braquidina B no ensaio *in vitro*. Por sua vez, Salgado *et al.* (2020) investigaram a atividade anti-inflamatória *in vitro* em sinoviócitos artríticos (semelhantes a fibroblastos) do extrato hidroetanólico de *F. platyphylla* e dos flavonoides diméricos purificados, sendo encontrado efeito contra a liberação da citocina pró-inflamatória IL-6.

Estes achados esclarecem o uso tradicional das raízes desta espécie no tratamento da osteoartrite. Trabalhos como este reforçam a importância de investigar plantas com potencial terapêutico.

2.8. Sistema de veiculação de fármacos- Copolímero Plurônico F127

A utilização de nanocarreadores como sistemas de entrega de fármacos para agentes terapêuticos podem aumentar as propriedades farmacológicas dos compostos comumente utilizados no tratamento do câncer (Bonifácio *et al.*, 2014). Isso é possível graças à sua pequena dimensão e à capacidade de serem funcionalizados com ligantes específicos que reconhecem e se ligam a receptores sobreexpressos em células tumorais (Digesu *et al.*, 2016).

Estes complexos nanoestruturados com formulações adequadas podem modificar a liberação de estímulos que atuam no sistema imunológico, permitindo a sua modulação para proteger o organismo da atividade pró-inflamatória intensa e induzir uma resposta mais eficiente contra doenças (Pessoa *et al.*, 2014).

Os nanotransportadores são sistemas em escala nanométrica capazes de transportar agentes anticancerígenos de baixa massa molecular ou macromoléculas, evitando seu contato com os tecidos saudáveis e permitindo o acúmulo em células tumorais (Crucho; Barros, 2017). Numerosos tipos de nanoestruturas são utilizados no transporte de fármacos incluindo lipossomos, nanocristais, micelas, quantum dots, nanotubos de carbono, dendrímeros e nanopartículas poliméricas (Figura 5).

Essas nanoplataformas variam em composição e funcionalidade, mas todas são projetadas para melhorar a entrega de medicamentos. Lipossomos encapsulam fármacos em bicamadas lipídicas, enquanto nanocristais aumentam a solubilidade de fármacos pouco solúveis. Micelas formam agregados que transportam fármacos hidrofóbicos, e quantum dots são usados para imagens biomédicas. Nanotubos de carbono possuem alta capacidade de carga e condução, dendrímeros oferecem entrega controlada, e nanopartículas poliméricas permitem a liberação direcionada de fármacos. Essas tecnologias visam melhorar a eficácia dos tratamentos e reduzir efeitos colaterais (Dhiman *et al.*, 2024).

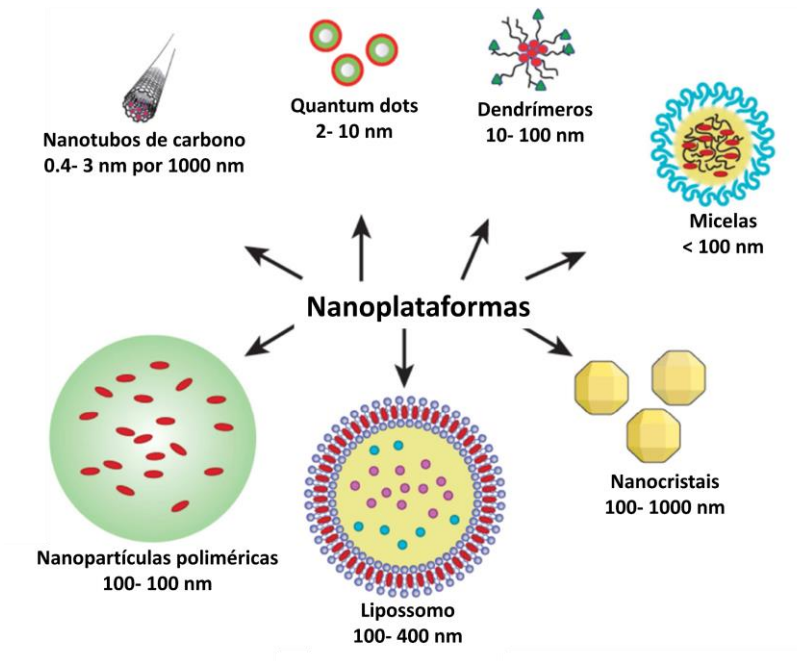


Figura 5. Nanopartículas utilizadas no transporte de fármacos.

Fonte: Adaptado de Digesu *et al.*, 2016.

Na atualidade, vários tipos de nanomateriais poliméricos têm sido alvo para produção de micelas, principalmente os copolímeros anfifílicos da classe triblocos (Costa *et al.*, 2024). Nesse contexto, os copolímeros do tipo Pluronic® são constituídos por arranjos de blocos hidrofílicos de poli (óxido de etileno) (PEO) e blocos hidrofóbicos de poli (óxido de propileno) (PPO) organizados em uma estrutura tribloco A-B-A: PEO-PPO-PEO (Figura 6).

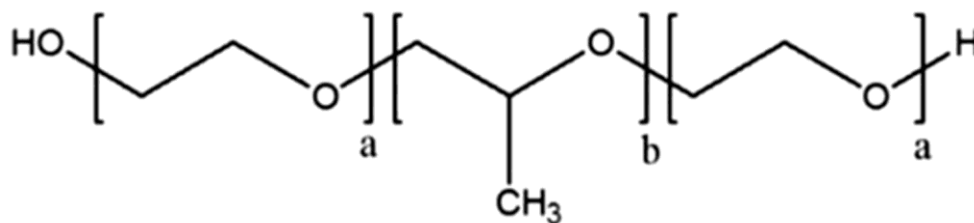


Figura 6. Estrutura geral dos copolímeros triblocos do tipo Pluronic®.

Fonte: Cagel *et al.*, 2016.

Os pluronics têm sido de grande interesse para a produção de sistemas carreadores por serem atóxico e biocompatíveis, interagindo com membranas biológicas e superfícies hidrofóbicas (Batrakova; Kabanov, 2008). Dentre os numerosos tipos de pluronics, F127 merece ênfase devido ao seu potencial como veículo para a administração de fármacos e sua propriedade para formar gel *in situ* dependendo da sua concentração e temperatura (Dumotier et al., 2006). Deste modo, soluções concentradas de F127 (20-30%) podem alternar de uma fase líquida a um gel sólido com alta viscosidade, sendo um processo termorreversível (You; Van Winkle, 2010). Este processo está representado na figura 7.

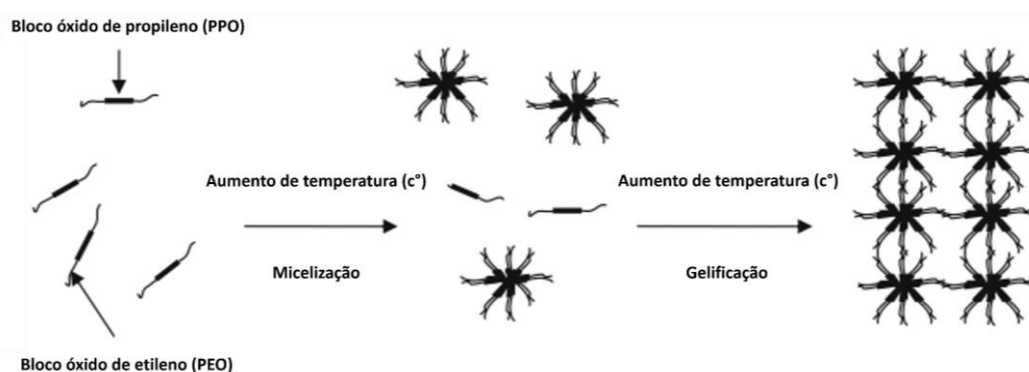


Figura 7. Representação esquemática dos mecanismos de associação do Pluronic F127 em água.

Fonte: Adaptado de Dumortier et al., 2006.

Assim, as micelas poliméricas à base de copolímeros podem aumentar a solubilidade dos componentes e aumentar a absorção de compostos ativos (Wu et al., 2011).

A busca por novos agentes terapêuticos que possam modular o microambiente tumoral é crucial para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Nesse cenário, a espécie vegetal *F. platyphylla* se destaca por possuir propriedades tanto anti-inflamatórias quanto imunomoduladoras. A formulação nanoestruturada contendo o extrato das folhas dessa espécie visa melhorar a solubilidade e biodisponibilidade do composto ativo. O copolímero F127 é poloxâmero conhecido por suas propriedades surfactantes, que facilitam a entrega de fármacos em células tumorais, minimizando o impacto nos tecidos saudáveis (Batrakova; Kabanov, 2008).

A modulação da inflamação e da resposta imune é um aspecto fundamental na terapia antitumoral. Citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- α estão frequentemente elevadas no microambiente do tumor, promovendo a sobrevivência e proliferação das células tumorais. Acredita-se que a formulação contendo o extrato das folhas da *F. platyphylla* possa reduzir a expressão dessas citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo que estimula a atividade de células imunológicas, promovendo a eliminação das células tumorais.

Estudos anteriores com outros extratos de plantas e formulações a base de Pluronic demonstraram efeitos promissores na inibição do crescimento tumoral e na modulação da resposta inflamatória. Diante do exposto, investigar o efeito da formulação F127 contendo o extrato das folhas da *F. platyphylla* no modelo ascítico do tumor de Ehrlich é uma abordagem inovadora com potencial terapêutico significativo.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- ✓ Avaliar a modulação da inflamação mediada pela formulação nanoestruturada contendo o extrato das folhas de *Fridericia platyphylla* em modelo de tumor ascítico de Ehrlich.

3.2. Específicos

- ✓ Avaliar o desenvolvimento do tumor ascítico (volume, angiogênese e viabilidade) durante o tratamento com a formulação das folhas de *F. platyphylla*;
- ✓ Avaliar a produção de citocinas inflamatórias no sangue e no líquido ascítico;
- ✓ Caracterizar o perfil imunofenotípico de células do líquido ascítico;
- ✓ Analisar a capacidade de produção de óxido nítrico no líquido ascítico após o tratamento com a formulação de *F. platyphylla*;
- ✓ Determinar o índice de apoptose e necrose em células obtidas do líquido ascítico;
- ✓ Analisar o ciclo celular das células do líquido ascítico;
- ✓ Analisar as alterações histopatológicas do fígado e rim dos camundongos dos grupos experimentais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e processamento da espécie vegetal

As folhas foram coletadas no município de São Luís, no intervalo das 17h às 18h. Após a coleta, o material vegetal foi seco a 40°C em estufa com circulação de ar e pulverizado em moinho elétrico para obtenção do pó, que foi embebido em álcool etílico a 70% na proporção de 1:4 (v/v) e colocado em maceração, com agitação manual diária. A extração alcoólica do macerado foi realizada mediante três trocas sucessivas a cada 72 horas, com a renovação do solvente. Ao final deste processo, os extratos foram reunidos e filtrados com gaze. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador (MARCON), à pressão reduzida e à temperatura de 40°C. Deste processo foi obtido o extrato hidroalcoólico.

O extrato hidroalcoólico obtido das folhas da *F. platyphylla* foi encapsulado em micelas poliméricas do copolímero Plurônico F127 (poli (óxido de etileno)-(poli(óxido de propileno)-(poli(óxido de etileno), conforme descrito no item 4.2.

4.2. Preparação da formulação nanoestruturada contendo o extrato das folhas da *Fridericia platyphylla*

As plataformas de administração líquidas (solução coloidal) foram preparadas pela combinação do copolímero Plurônico F127 (0,1% m/v) e extrato hidroalcoólico da *F. platyphylla* (1%). A solução foi solubilizada em etanol e mantida sob agitação constante por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o solvente foi evaporado à pressão reduzida para obtenção de uma matriz sólida na forma de filme fino, o qual foi mantido por 24 horas em dessecador para a eliminação de traços do solvente. A matriz sólida (filme fino) foi ressuspensa em água ultrapura sob agitação suave à 60 °C por cerca de 2 horas (Costa et al., 2024).

Este processo teve como objetivo obter micelas carregadas contendo o extrato hidroalcoólico da *F. platyphylla* na concentração de 1% (10 mg/mL).

4.3. Animais para ensaio experimental

Foram utilizados camundongos (n=44) da espécie *Mus musculus* var. Swiss albinos adultos ($\pm$ 60 dias de idade), machos, obtidos do Biotério Central

da UFMA. Os animais foram mantidos no biotério setorial localizado no Prédio da Pós-graduação do CCBS/UFMA durante todo o período experimental. Foram alimentados com ração padrão e tiveram acesso à água *ad libitum*, sendo mantidos sob condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMA nº 23115.006978/2024-79 (Anexo A).

Os camundongos foram distribuídos de forma randômica e os grupos experimentais foram formados, conforme a tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais conforme o tratamento e indução tumoral.

Grupos	n	Tratamento	Via de administração	Tumor
Saudável	3	Água destilada (100µl)	Oral	Sem tumor
Controle negativo (CN)	7	Água destilada (100µl)	Oral	Com tumor
Controle positivo (CP)	7	Ciclofosfamida (25 mg/kg)	Intraperitoneal	Com tumor
Veículo	7	Polímero F127 (25 mg/kg)	Oral	Com tumor
10 mg/kg	10	Formulação 10 mg/kg	Oral	Com tumor
25 mg/kg	10	Formulação 25 mg/kg	Oral	Com tumor

Para a administração da formulação e ciclofosfamida (quimioterápico), todos os animais foram pesados para o ajuste da dose a ser utilizada. A formulação nanoestruturada da *F. platyphylla* (F127= 0,1%; Extrato hidroalcoólico= 1%) foi diluída em água destilada para a obtenção das doses de 10 e 25 mg/Kg. O veículo (F127 0,1%) foi diluído em água destilada para obtenção da dose de 25 mg/Kg. A ciclofosfamida foi diluída em PBS 1x estéril para obtenção da dose de 25 mg/Kg. Os tratamentos com a formulação e veículo foram realizados via oral (gavagem) com volume de 100 µl e a ciclofosfamida via intraperitoneal com volume de 200µl, uma vez durante 8 dias consecutivos.

4.4. Manutenção do tumor ascítico de Ehrlich e tratamento dos animais

Para obtenção das células neoplásicas, camundongos com 7 dias de evolução do tumor ascítico de Ehrlich foram eutanasiados com uma superdosagem de solução anestésica (cloridrato de quetamina [Ceva] e cloridrato de xilazina [Agener união], 300/30 mg/kg). Após a assepsia com álcool 70%, foi realizado uma excisão da parede abdominal e o líquido ascítico foi

puncionado, sendo ressuspensionado em PBS pH 7,2. Em seguida, a suspensão foi centrifugada à 200g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensionadas em 5 mL de PBS. Para a determinação da concentração de células tumorais presentes na suspensão celular, foi diluída uma alíquota para a realização da contagem na câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão com azul de Tripán.

A indução do tumor nos animais foi realizada por meio do inóculo de 200 µL na cavidade peritoneal contendo 2×10^6 células tumorais de Ehrlich e após 24 horas da inoculação, iniciou-se o tratamento dos grupos experimentais (Dagli, 1992). Durante o tratamento, os animais foram pesados e seu bem-estar foi avaliado utilizando a escala de Grimace (Matsumiya et al., 2012). No 10º dia os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico e o líquido ascítico foi coletado para análise dos parâmetros inflamatórios (Figura 8).

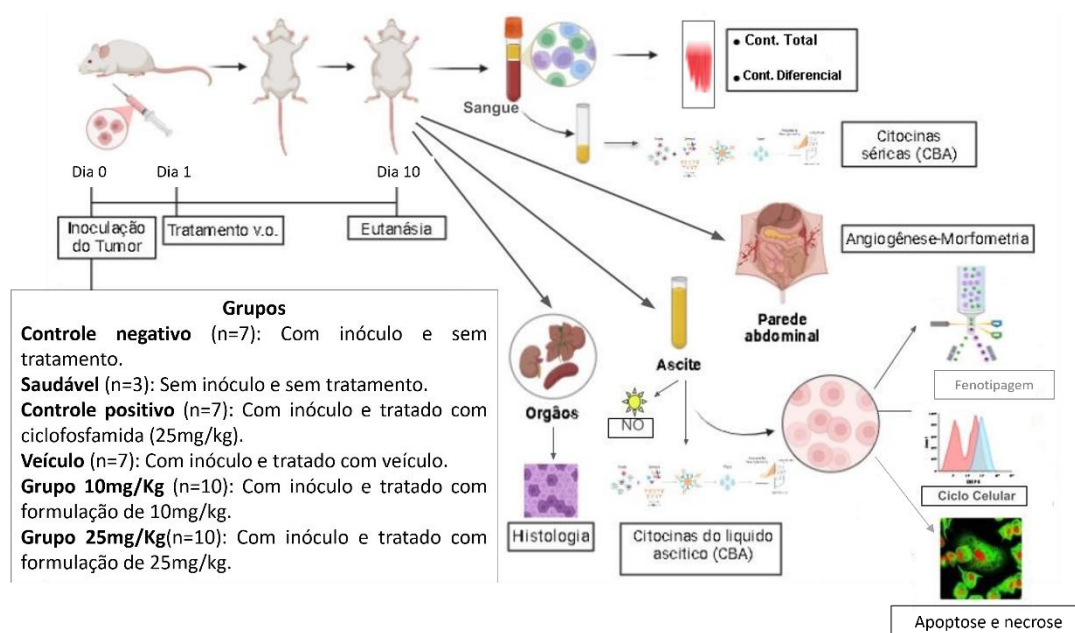


Figura 8. Desenho experimental e avaliação dos parâmetros inflamatórios. O sangue foi coletado por punção cardíaca para a obtenção do soro, destinado à dosagem de citocinas. Também foram confeccionadas lâminas para a contagem diferencial de células. A parede do peritônio foi removida para avaliação da angiogênese. O líquido ascítico foi coletado para a contagem celular, avaliação do tipo de morte celular, dosagem de óxido nítrico (NO), quantificação de citocinas e análise do ciclo celular. Além disso, os órgãos (fígado, baço e rim) foram retirados para posterior avaliação histológica.

Fonte: autoria própria com software BioRender.

4.5. Celularidade e viabilidade das células tumorais

Após 10 dias do inóculo do tumor, os animais foram anestesiados com uma dose letal de anestésico (cloridrato de quetamina [Ceva] e cloridrato de xilazina [Agener união], 300/30 mg/kg, via i.m). Após a entrada em plano anestésico profundo, o sangue foi coletado por punção cardíaca (HOFF, 2000). Nos grupos sem formação de líquido ascítico (saudável e CP), a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de PBS gelado para garantir a coleta de citocinas no local do inóculo. Esse procedimento foi realizado para uniformizar a análise das concentrações de mediadores inflamatórios e garantir comparabilidade entre os grupos experimentais.

Uma vez atingido o óbito, foi realizada a avaliação do número de células tumorais. Para isso, a cavidade peritoneal foi aberta e o líquido ascítico coletado. Os seguintes parâmetros foram observados: volume e aspecto da ascite (não hemorrágica – 1, semi-hemorrágica – 2 e hemorrágica – 3), número e viabilidade das células tumorais através do ensaio de exclusão com azul de tripan (0,04%) em câmara de Neubauer (SERRA, 2009; SAAD-HOSSNE; SAAD-HOSSNE; PRADO, 2004). A partir dessa contagem inicial a densidade celular foi ajustada para os experimentos posteriores.

4.6. Contagem diferencial por microscopia

Para a quantificação e identificação das células imunológicas no sangue, foi realizada a técnica de esfregaço. Para isso, 50 µL do sangue foram depositados em uma lâmina de histologia. Com uma lâmina extensora o sangue foi espalhado pela lâmina. O material foi deixado para secar a temperatura ambiente (VALENCIANO *et al.*, 2013). Após esse período, as células foram fixadas e coradas com o Kit Instant Prov (NewProv) conforme as instruções do fabricante.

A contagem diferencial foi feita pela análise e classificação de 100 células por lâmina, com a leitura realizada em microscópio óptico com aumento de 100X (SAAD-HOSSNE; SAAD-HOSSNE; PRADO, 2004).

4.7. Dosagem de citocinas

Após a obtenção do sangue terminal, o sangue foi deixado em repouso por 30 minutos para a formação do coágulo. As amostras foram então

centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, a 20°C, para a obtenção do soro. O líquido ascítico foi centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos, a 4°C, para a obtenção do sobrenadante (VERÇOSA JÚNIOR *et al.*, 2006). Tanto o soro quanto o sobrenadante das amostras foram usados para a dosagem de citocinas pelo Ensaio Citométrico de Esferas Ordenadas (CBA). Todos os reagentes utilizados foram provenientes do Kit Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, obtido da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA).

Em resumo, 25 µL de cada amostra a ser testada ou as curvas de controle fornecidas pelo fabricante foram adicionados em placas de 96 poços de fundo redondo. Em seguida, cada poço recebeu 25 µL do mix de beads (esferas recobertas com anticorpos específicos contra as citocinas a serem dosadas), distinguíveis pela coloração detectável no canal FL-2 (vermelho) do citômetro de fluxo, e 25 µL de anticorpo conjugado a ficoeritrina (PE). A placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas, protegida da luz. Após o período de incubação, as amostras foram ressuspensas com 150 µL do tampão de lavagem e a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e as amostras foram ressuspensas em 120 µL de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Aproximadamente 2100 eventos por amostra foram lidos no gate de interesse (beads) e os resultados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

4.8. Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

Para a marcação fenotípica, as células peritoneais foram suspensas em PBS contendo 5% de BSA (Albumina sérica bovina), na concentração de 5×10^5 células/100 µL, e incubadas por 30 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e ressuspensas em PBS contendo 1% de BSA. Os anticorpos foram adicionados à suspensão celular nas concentrações recomendadas pelo fabricante: CD3e FITC (Clone 145-2C11, BD Pharmingen, catálogo: 553062), CD4 PerCP (Clone RM4-5, BD Pharmingen, catálogo: 553052) e CD11c PE-Cy7 (Clone HL3, BD Pharmingen, catálogo: 558079). As células foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente.

Após a incubação, as células foram lavadas com 250 μ L de PBS contendo 1% de BSA, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado. Esse procedimento foi repetido duas vezes para remover o excesso de anticorpos não ligados. As células foram, então, fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em 200 μ L de PBS.

Para a aquisição dos dados, foram coletados 10.000 eventos utilizando o citômetro de fluxo Guava® easyCyte 8HT (Merck, Catálogo: 0500-4008). A análise dos dados foi realizada no software FlowJo v10 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA), permitindo a identificação das populações celulares marcadas com os anticorpos específicos.

Na estratégia de análise, foi feito o gating da população de células peritoneais com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade (SSC). As células CD11c positivas foram analisadas quanto à expressão desse marcador em relação à complexidade celular (SSC). Os linfócitos totais (CD3) e linfócitos T auxiliares (CD4) foram discriminados em um dot plot que avaliou a expressão dos respectivos marcadores. Controles negativos, sem a adição de anticorpos, foram incluídos para definir os limites de autofluorescência. A compensação de fluorescência foi realizada para corrigir a sobreposição espectral entre os diferentes fluoróforos, utilizando marcações individuais para cada um dos anticorpos empregados.

4.9. Avaliação da angiogênese

A angiogênese foi avaliada através da análise da microvasculatura do revestimento da cobertura interna da parede peritoneal em animais eutanasiados, seguindo o método descrito por Balaji *et al.* (2016). As amostras de tecido foram fotografadas e a morfometria dos vasos foi determinada utilizando o software ImageJ (Bethesda, MD). Resumidamente, as imagens foram inicialmente recortadas e convertidas para 8 bits. Em seguida, utilizando a ferramenta de threshold, os vasos sanguíneos foram destacados com base no contraste de cor. Após a segmentação, a área ocupada pelos vasos sanguíneos foi quantificada, e os dados foram expressos em pixels quadrados (pix²).

4.10. Avaliação histopatológica do fígado e rim

Após a eutanásia, os fígados e rins dos animais foram coletados e armazenados em formalina tamponada à 10% por 48 horas para preservar sua estrutura celular. Em seguida, as amostras foram desidratadas através de uma série de banhos em álcool com gradientes crescentes de concentração: 70%, 80%, 95% e 100%, permanecendo por 30 minutos em cada concentração para garantir a remoção completa da água do tecido.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a diafanização com xilol, passando por três banhos de 30 minutos cada, para substituir o álcool e preparar o tecido para a inclusão em parafina. A impregnação das amostras foi realizada em parafina líquida aquecida a cerca de 60°C, com três banhos de 30 minutos cada. Em seguida, as amostras foram transferidas para moldes em aço inox, onde a parafina foi deixada esfriar e solidificar, formando blocos de parafina.

Esses blocos foram então cortados em seções finas de 3 µm usando um micrótomo. As seções obtidas foram montadas em lâminas de vidro e submetidas a um processo de reidratação, passando por banhos de xilol e álcool em concentrações decrescentes: 100%, 95%, 80%, 70% e água destilada. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H/E), cobertas com lamínulas e seladas com meio de montagem, ficando prontas para a análise microscópica para permitir a visualização das estruturas celulares e teciduais.

Á análise das lâminas sem identificação dos grupos foram realizadas por um patologista em microscópio óptico (Leica®, modelo ICC50) com objetiva de 10 e 40x. Os cortes foram fotografados em microscópio óptico (Leica ICC50-) utilizando o programa ScopelImage 9.0 com objetiva de 10 e 40x.

Os parâmetros analisados para o fígado e rim foram: Infiltrado celular (Células inflamatórias no parênquima hepático e renal), alteração celular (Degeneração hidrópica e necrose) e alteração circulatória (Congestão e hemorragia). O sistema de escore utilizado para caracterizar os parâmetros analisados foram determinados da seguinte forma: (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso. Os dados foram apresentados como média e $\pm$ erro padrão da média.

4.11. Determinação de Óxido Nítrico no líquido ascítico

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida por meio dos níveis de nitrito nos sobrenadantes dos líquidos ascíticos coletados após a eutanásia dos animais. Foram transferidos 50 µL dos sobrenadantes para uma placa de 96 poços de fundo chato, aos quais foram adicionados 50 µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dihidroclorato de naftaleno, 2,5% de ácido ortofosfórico) à temperatura ambiente, por 10 minutos. A absorbância foi determinada por espectrofotômetro com filtro de 540 nm (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Os valores obtidos em densidade óptica foram convertidos em µM de NO usando uma equação de regressão linear baseada em uma curva padrão (5, 10, 30 e 60 µM) de nitrito de sódio (ARAÚJO *et al.*, 2010).

4.12. Determinação de apoptose e necrose por microscopia de fluorescência

Para avaliação do tipo de morte celular observada após o tratamento, 1×10^5 células do líquido ascítico foram plaqueadas em placas de 48 poços, em 300 µl por poço de meio DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB). O meio foi suplementado com laranja de acridina (50 µg/ml) e brometo de etídio (50 µg/ml). Após isso, a placa foi centrifugada por 5 min a 1000 rpm e, após 2 min de incubação ao abrigo da luz, levada ao microscópio de fluorescência (Eclipse Ti (Nikon)). As imagens foram obtidas no aumento de 20x, utilizando os cubos de fluorescência EGF (fluorescência verde) e CY3 (fluorescência vermelha). Após a aquisição das imagens, foi realizada a sobreposição das fluorescências e posteriormente as células foram analisadas através do software ImageJ (Bethesda, MD).

As células foram classificadas em três categorias: 1- Viáveis, quando apresentaram núcleo de coloração verde, não condensado e sem alterações visíveis; 2- Apoptóticas, quando apresentaram núcleo verde ou vermelho condensado, fragmentado ou com alguma outra alteração visível; 3- Necróticas, quando apresentaram núcleo vermelho, não condensado e sem alterações visíveis (Smith *et al.*, 2012). As porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas foram determinadas pela classificação de 100 células por amostra.

4.13. Análise do ciclo celular em células tumorais do líquido ascítico

Para a análise do ciclo celular, as células coletadas do líquido ascítico foram coradas com iodeto de propídeo (IP), um marcador fluorescente com afinidade pôr para DNA/RNA. Inicialmente, as células foram ajustadas para uma concentração de 1×10^6 células/mL em tampão PBS (ph 7,4). Posteriormente, as células foram fixadas em etanol etílico a 70%, previamente resfriado, e mantidas a -20°C por 24 horas para preservação estrutural. Após a etapa de fixação, as células foram centrifugadas e incubadas com uma solução de coloração contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo, 100 $\mu\text{g/mL}$ de RNase A e 0,1% de Triton X-100, sendo mantidas em ambiente escuro por no mínimo 12 horas (overnight), para garantir a penetração uniforme do IP e a eliminação de contaminantes de RNA.

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo Guava® utilizando um laser de 488 nm para excitação do iodeto de propídeo. Foram coletados 10.000 eventos por amostra, com aplicação de um gate específico para excluir detritos e agregados celulares. A análise das fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) foi realizada por meio do software FlowJo™, utilizando o modelo de ajuste de histograma adequado para identificação e quantificação das populações celulares em cada fase.

4.14. Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. De acordo com o resultado foram aplicadas as seguintes análises: para dados com distribuição normal foi utilizada a análise de variância (ANOVA) one-way seguida do Teste Tukey-Kramer para comparações entre múltiplos grupos. Para dados com distribuição não gaussiana foi empregado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Além disso, para análise de duas variáveis independentes, foi utilizado o Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer ou Bonferroni. Em todas as análises, considerou-se como significativo um valor de $p < 0,05$. Para a detecção de valores discrepantes que poderiam afetar a normalidade e a distribuição dos dados, foi utilizado o teste de Grubbs. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad InStat® (GraphPad Software, v8 San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização físico-química das micelas poliméricas F127

A caracterização das micelas poliméricas F127 foram realizadas através de três técnicas complementares para confirmar sua formação e propriedades estruturais. Primeiramente, foi utilizada a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando um espectrofotômetro Tracer-100 FTIR (Shimadzu) (De Souza *et al.*, 2024).

A seguir, foi realizada a caracterização das micelas utilizando Microscopia de Força Atômica (AFM), empregando um microscópio Multimode 8 (Bruker). A solução da formulação foi depositada em mica clivada para formar uma película fina, e a análise foi realizada no modo de Nanomecânica Quantitativa de Pico de Força (QNM), com resolução de 256×256 linhas por varredura e frequência de varredura de 0,5 Hz. A partir dessa análise, foram obtidas informações sobre as propriedades topográficas, como o tamanho da estrutura dos filmes, altura e rugosidade quadrática média (R_q), além da adesão das amostras e módulo de Young (De Souza *et al.*, 2024).

Por fim, a estabilidade à oxidação das micelas foi avaliada por meio de análises eletroquímicas utilizando um potenciostato (Autolab PGSTAT 302N). A célula de três eletrodos foi usada, com tampão fosfato 0,1 mol/mL a pH 5,5, e a faixa de potencial variou de 0 a 1,50 V vs. Ag/AgCl, para examinar a resistência das micelas à oxidação (De Souza *et al.*, 2024). Essas metodologias foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Química de Produtos Naturais (Lqpn/UFMA), com o objetivo de garantir a formação adequada das micelas poliméricas para o estudo subsequente.

5.2. Avaliação do tratamento no peso e na celularidade do sangue periférico

Os resultados mostraram que, durante o tratamento, o ganho de peso variou entre os grupos. No primeiro dia de tratamento, a média inicial dos grupos foi de $34,11 \pm 4,22$ (SD), sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). No 5º dia, observou-se um aumento de peso nos grupos CN, Veículo e nos dois grupos de tratamento, com manutenção do peso nos grupos CP e Saudável. No 8º dia, o grupo Saudável ($35,86 \pm 0,33$) e CP ($34,85 \pm 1,28$) apresentaram pouca variação, enquanto o grupo CN ($41,50 \pm 2,11$), Veículo ($40 \pm 2,13$) e o grupo

tratado com 10 mg/Kg ($41,80 \pm 1,14$) tiveram um aumento considerável de peso. O grupo tratado com 25 mg/Kg ($39,50 \pm 0,88$) ficou em uma posição intermediária entre os grupos CN e CP. As diferenças estatisticamente significativas encontradas foram entre o grupo CN e o grupo CP ($p = 0,0365$) e o grupo tratado com 10 mg/Kg e o CP no 8º dia ($p = 0,0099$) (Figura 9).

No que diz respeito à contagem total de células do sangue, o grupo Saudável (linha pontilhada no gráfico) demonstra a normalidade desse parâmetro ($1,80 \pm 0,25$). Observa-se um aumento da celularidade no grupo CN ($3,30 \pm 0,47$), Veículo ($5,65 \pm 0,87$) e diminuição no grupo CP ($1,17 \pm 0,23$). Em relação aos tratamentos, há um aumento notável da celularidade nos grupos de 10 mg/Kg ($7,95 \pm 1,002$) e 25 mg/Kg ($8,84 \pm 1,195$), sendo esses valores estatisticamente diferentes tanto do grupo CN quanto do grupo CP ($p < 0,05$), como pode ser observado na figura 9.

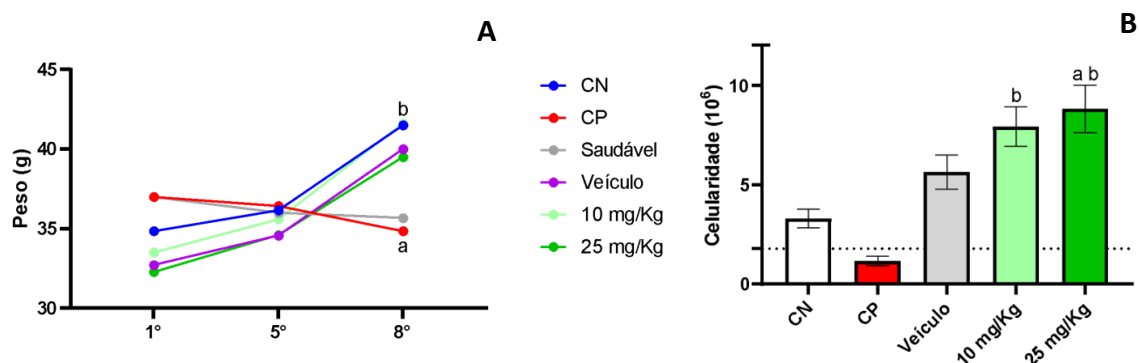


Figura 9. Efeito do tratamento com a formulação nanoestruturada no peso corporal e contagem total de células do sangue. (A) O peso dos animais foi mensurado em balança nos dias 1, 5 e 8 do tratamento. No 10º dia, os animais foram eutanasiados. (B) A contagem total de células do sangue foi realizada com líquido de Turk (1:20) na câmara de Neubauer. A comparação entre os grupos foi feita através da ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$. A letra "a" indica diferença estatística em relação ao grupo CN, e "b" em relação ao grupo CP. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.3. Efeito no desenvolvimento da ascite

Ao longo do tratamento, observou-se alterações na circunferência abdominal dos camundongos. No 1º dia, a média total foi de $9,625 \pm 0,43$ (SD), sem diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$). No 5º dia, observou-se um aumento no grupo Saudável, CN, CP e Veículo, e uma diminuição nos grupos tratados com 10 e 25 mg/Kg. No 8º dia, o grupo Saudável ($9,3 \pm 0,11$) e o grupo

CP ($9,31 \pm 0,13$) apresentaram uma diminuição acentuada da circunferência abdominal. O oposto ocorreu nos grupos CN ($10,28 \pm 0,11$), Veículo ($10,1 \pm 0,11$), 10 mg/Kg ($10,4 \pm 0,15$) e 25 mg/Kg ($9,82 \pm 0,09$), onde se observou um aumento da circunferência. Diferenças estatisticamente relevantes entre os grupos foram notadas apenas no 8º dia. Diferenças estatisticamente relevantes entre os grupos foram notadas apenas no 8º dia. Nesse dia, observou-se diferenças significativas entre os grupos CN e CP, CN e Saudável, CP e Veículo, CP e 10 mg/Kg, saudável e 10 mg/Kg e 10 mg/Kg e 25 mg/Kg ($p < 0,05$), como demonstrado na figura 10.

Em relação ao volume do líquido ascítico, o grupo CN apresentou $4,41 \pm 0,67$ mL, Veículo $3,64 \pm 0,28$ mL, enquanto o grupo CP não produziu ascite, apresentando uma diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,0060$). O grupo tratado com 10 mg/Kg ($4,72 \pm 0,82$ mL) apresentou um aumento do volume do líquido ascítico, sendo estatisticamente diferente do grupo CP ($p = 0,0029$). O grupo tratado com 25 mg/Kg ($3,28 \pm 0,37$ mL) mostrou valores semelhantes aos do grupo CN ($p > 0,05$), conforme observado na figura 10.

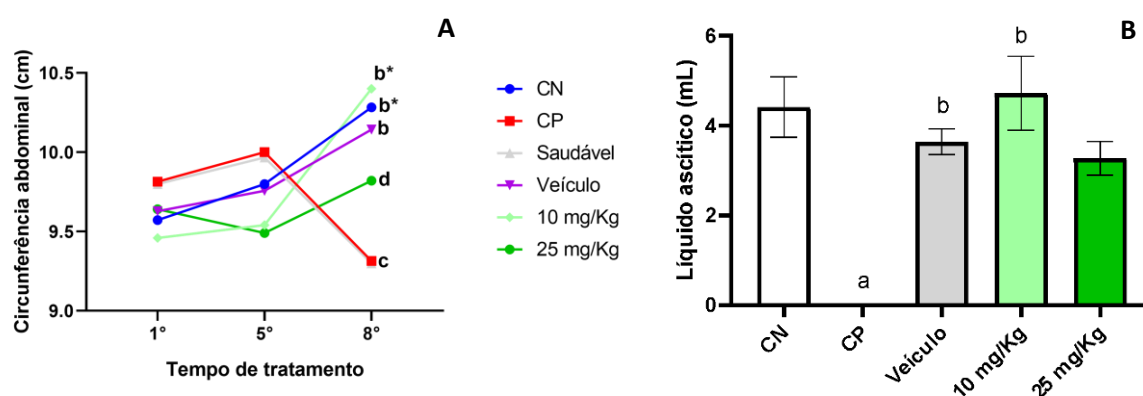


Figura 10. Medida da circunferência abdominal e volume do líquido ascítico. (A) Medida da cinética de crescimento da circunferência abdominal ao longo do tratamento. (B) Volume do líquido ascítico. A comparação entre os grupos foi feita através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn's, considerando significativo $p < 0,05$. O "*" indica diferença estatística em relação ao grupo Saudável, "a" indica diferença estatística em relação ao grupo CN, "b" em relação ao grupo CP, "c" em relação ao Veículo, "d" em relação a 10 mg/Kg e "e" em relação a 25 mg/Kg. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.4. Efeito do tratamento na celularidade do líquido ascítico

Os resultados da análise da celularidade do líquido ascítico mostraram uma grande quantidade de células no grupo CN ($33,14 \pm 5,736$) e uma baixíssima celularidade no grupo CP ($0,1429 \pm 0,07$), sendo os grupos estatisticamente diferentes entre si ($p = 0,0053$). Os grupos tratados com 10 mg/Kg ($29,45 \pm 6,92$), 25 mg/Kg ($23,90 \pm 4,58$) e Veículo ($30,79 \pm 1,96$) também diferiram estatisticamente do grupo CP ($p < 0,05$), conforme observado na figura 11.

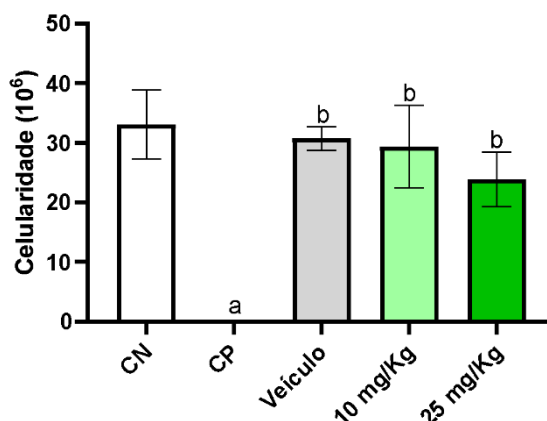


Figura 11. Celularidade do líquido ascítico. Número de células totais no líquido ascítico. A comparação entre os grupos foi feita através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn's, considerando significativo $p < 0,05$. A letra "a" indica diferença estatística em relação ao grupo CN, e "b" em relação ao grupo CP. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.5. Determinação da apoptose e necrose do líquido ascítico

A análise das porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas revelou variações entre os grupos avaliados. No grupo controle negativo (CN), a média de células viáveis foi de $74,50 \pm 8,21\%$, enquanto as células apoptóticas representaram $5,17 \pm 1,30\%$ e as células necróticas, $20,33 \pm 7,25\%$. As porcentagens de células apoptóticas e necróticas foram significativamente diferentes em relação às células viáveis, e a porcentagem de células necróticas também diferiu significativamente das apoptóticas ($P < 0,05$).

No grupo Veículo, a média de células viáveis foi de $85,43 \pm 3,12\%$, enquanto as células apoptóticas representaram $5,14 \pm 0,45$ e as células necróticas foi de $9,57 \pm 2,87$. As porcentagens de células apoptóticas e necróticas diferiram significativamente em relação as células viáveis ($P < 0,05$). Não houve diferenças estatísticas entre as porcentagens de células apoptóticas e necróticas.

No grupo tratado com 10 mg/Kg, a viabilidade celular aumentou para $83,20 \pm 1,84\%$, enquanto a apoptose foi de $4,70 \pm 0,65\%$ e as células necróticas representaram $12,10 \pm 1,53\%$. Tanto a porcentagem de células apoptóticas quanto a de células necróticas foram significativamente menores em relação às células viáveis ($P < 0,05$). O grupo tratado com 25 mg/Kg seguiu o mesmo padrão, com $85,80 \pm 1,36\%$ de células viáveis, $6,20 \pm 0,65\%$ de células apoptóticas e $8,00 \pm 1,15\%$ de células necróticas.

Em relação às comparações entre os diferentes grupos, observou-se que a porcentagem de células viáveis no grupo CN foi significativamente menor em comparação ao grupo tratado com 25 mg/Kg ($p = 0,0232$). Além disso, a porcentagem de células necróticas também foi significativamente maior no grupo CN em comparação ao grupo tratado com 25 mg/Kg ($p = 0,0119$) (Figura 12).

Apesar desses achados pontuais, as porcentagens de células viáveis, necróticas e apoptóticas permaneceram consistentes entre os diferentes tratamentos. Isso indica que as intervenções aplicadas não promoveram alterações significativas nesses eventos, conforme analisado pela ANOVA de duas vias ($p < 0,0001$).

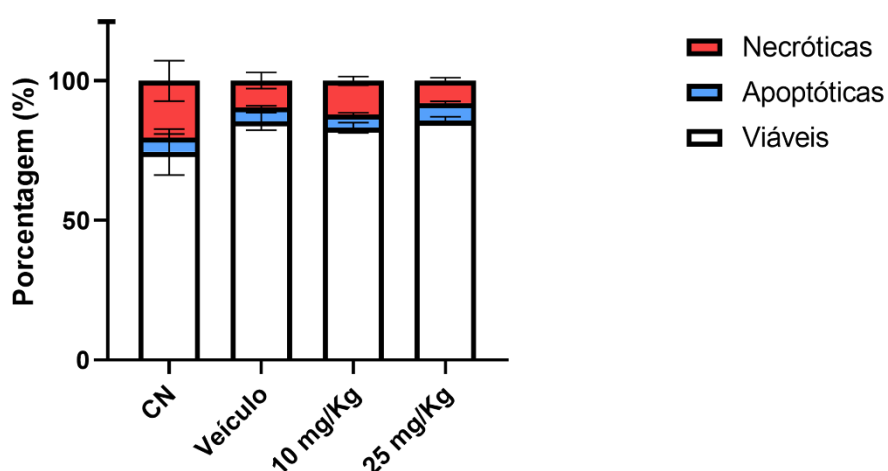


Figura 12. Análise do tipo de morte celular utilizando a técnica de coloração com laranja de acridina e brometo de etídio nas células do líquido ascítico. As células foram ajustadas para uma concentração de 1×10^5 células/300 μL de meio DMEM e incubadas com laranja de acridina e brometo de etídio (200 $\mu\text{g/mL}$). A leitura foi realizada em um microscópio invertido de fluorescência, utilizando os filtros EGF e Cy3. As imagens foram capturadas com uma objetiva de 20x, e 100 células foram analisadas por imagem para determinar as porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas. As diferenças estatísticas foram avaliadas por meio de ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey, considerando significativo $P < 0,05$. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.6. Análise do ciclo celular

A análise das porcentagens de células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular revelou variações entre os diferentes grupos tratados, controle negativo (CN) e Veículo. No grupo CN, a média de células na fase G1 foi de $40,52 \pm 3,82\%$, na fase S de $8,96 \pm 1,67\%$ e na fase G2/M foi de $41,32 \pm 3,11\%$. No grupo Veículo, a média de células na fase G1 foi de $29,68 \pm 7,05$, seguido da fase S que foi de $10,65 \pm 2,63$ e fase G2/M de $36,37 \pm 8,75$.

No grupo tratado com 10 mg/Kg, observou-se uma redução na porcentagem de células na fase G1 ($37,80 \pm 3,71\%$) e um aumento na fase S ($13,18 \pm 4,75\%$), enquanto a fase G2/M apresentou uma média de $35,51 \pm 7,30\%$. No grupo tratado com 25 mg/Kg, as porcentagens de células nas fases G1, S e G2/M foram de $39,45 \pm 3,96\%$, $8,74 \pm 2,29\%$ e $38,50 \pm 5,11\%$, respectivamente.

No grupo tratado com 10 mg/Kg, observou-se uma redução na porcentagem de células na fase G1 ($37,80 \pm 3,71\%$) e um aumento na fase S ($13,18 \pm 4,75\%$), enquanto a fase G2/M apresentou uma média de $35,51 \pm 7,30\%$. No grupo tratado com 25 mg/Kg, as porcentagens de células nas fases G1, S e G2/M foram de $39,45 \pm 3,96\%$, $8,74 \pm 2,29\%$ e $38,50 \pm 5,11\%$, respectivamente.

Em todos os grupos, as porcentagens de células nas fases S foram estatisticamente diferentes das da fase G1, assim como as porcentagens da fase G2/M foram diferentes das da fase S ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa nas fases do ciclo celular em relação aos diferentes tratamentos, conforme analisado pela ANOVA de duas vias ($p < 0,0001$) (Figura 13).

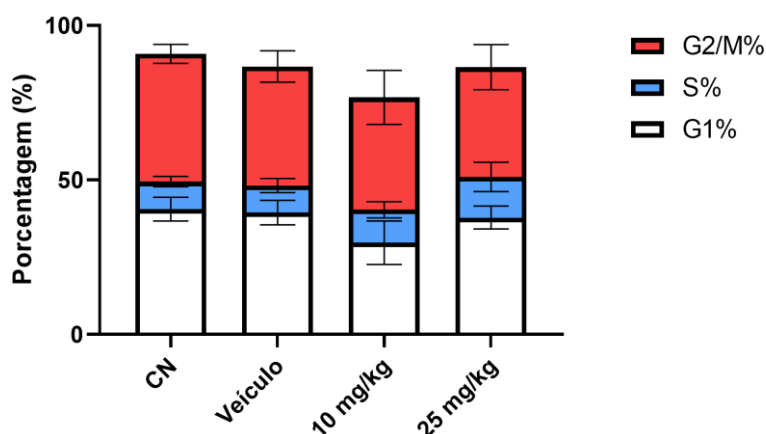


Figura 13. Análise do ciclo celular por meio da marcação com iodeto de propídio nas células do líquido ascítico. As células da ascite foram ajustadas para uma concentração de 1×10^6 células e fixadas em álcool etílico a 70% gelado. Após 24 horas de fixação, as células foram marcadas com uma solução contendo iodeto de propídio, RNase e Triton X-100, sendo incubadas overnight. Posteriormente, as células foram adquiridas em um citômetro de fluxo Guava® e 10.000 eventos foram coletados utilizando um gate de interesse. Os dados foram analisados no software FlowJo v10, com o uso do plugin específico para análise do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram avaliadas utilizando ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey, considerando significativo $P < 0,05$. A letra "a" indica diferença estatística em relação à fase G1, e a letra "b" em relação à fase G2/M.

5.7. Contagem diferencial por microscopia óptica

A análise diferencial das células sanguíneas nos diferentes grupos experimentais revelou mudanças significativas relacionadas à resposta inflamatória e imunológica no modelo tumoral (Tabela 2). O grupo Saudável apresentou níveis basais esperados, com predominância de linfócitos ($57,3 \pm 1,8$), neutrófilos segmentados ($32,6 \pm 31,1$) e valores reduzidos de neutrófilos bastonetes ($0,3 \pm 0,3$), eosinófilos ($0,7 \pm 0,7$) e monócitos ($6,3 \pm 2,8$), sem detecção de blastos, plaquetas ou hemácias nucleadas.

No grupo CN, a presença do tumor foi associada a um aumento significativo nos neutrófilos segmentados ($58,3 \pm 4,2$) e blastos ($3,8 \pm 1,6$). Simultaneamente, os linfócitos ($27,0 \pm 1,8$) foram reduzidos em relação ao grupo saudável. O grupo CP apresentou aumento nos monócitos ($19,8 \pm 3,8$) e neutrófilos bastonetes ($2,8 \pm 1,4$) em comparação ao grupo saudável. No entanto, os linfócitos permaneceram reduzidos ($47,7 \pm 6,09$).

Os grupos tratados com as doses de 10 mg/kg e 25 mg/kg de extrato apresentaram padrões distintos de resposta. O tratamento com 10 mg/kg resultou em um aumento significativo no número de blastos ($62,9 \pm 7,9$) e uma

redução expressiva nos linfócitos ($14,1 \pm 2,3$) e neutrófilos segmentados ($20,5 \pm 6,7$). Já o tratamento com 25 mg/kg mostrou um aumento menos acentuado nos blastos ($42,4 \pm 9,5$) e uma redução moderada nos neutrófilos segmentados ($31,4 \pm 6,4$), com recuperação parcial dos linfócitos ($19,0 \pm 5,5$) em relação ao grupo de 10 mg/kg.

Tabela 2. Contagem diferencial de leucócitos no sangue de animais dos grupos experimentais tratados e não com a formulação nanoestruturada.

Células (100)	Grupos					
	Saudável	CN	CP	Veículo	10 mg/Kg	25 mg/kg
Neut. bastonetes	0,3±0,3	5,7±2,2	2,8±1,4	4,1±1,7	0,1±0,1 ^{a,c}	0,4±0,2
Neut. segmentados	32,6±31,1	58,3±4,2	28,5±5,4	44,2±11,6	20,5±6,7 ^a	31,4±6,4
Eosinófilos	0,7±0,7	1,3±0,6	0	0,1±0,1	12:00 AM	12:00 AM
Basófilos	2,7±1,2	1,3±0,4	1,0±0,8	3,6± 2,9	0,2±0,1	0,7±0,4
Linfócitos	57,3±1,8	27,0±1,8*	47,7±6,09	22,3±6,9 ^{a,b}	14,1±2,3 ^{a,b}	19,0±5,5 ^{a,b}
Monócitos	6,3±2,8	2,5±0,8	19,8±3,8	10,1±4,3	2,2±1,0 ^b	2,1±0,6 ^b
Blastos	0	3,8±1,6	0	15,4±12,8	62,9±7,9 ^{a,b}	42,4±9,5 ^b
Plaquetas	0	0,6±0,2	0,4±0,2	0,4±0,2	0	0,2±0,1
Hemácia nucleada	0	0	0	0,1±0,1	0,3±0,1	0
Leucopenia	0	0,42±0,20	1,0±0,0*	0,14±0,14 ^b	0,1±0,31 ^b	0 ^b

A contagem diferencial foi realizada através da análise de 100 células por lâmina em microscópio óptico com aumento de 100X. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (SEM), e as diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, considerando significativo $p < 0,05$. O “*” indica diferença estatística em relação ao grupo Saudável, “a” indica diferença estatística em relação ao grupo CN, “b” em relação ao grupo CP, “c” em relação ao Veículo, “d” em relação a 10 mg/Kg e “e” em relação a 25 mg/Kg. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.8. Perfil imunofenotípico de células do líquido ascítico

A análise fenotípica das células encontradas no líquido ascítico dos animais revelou uma baixa porcentagem de células CD11c (imunidade inata) positivas (Figura 14). O grupo CN apresentou $3,44 \pm 0,41\%$, Veículo $5,41 \pm 0,49\%$, tratamento de 10 mg/Kg $4,94 \pm 0,53\%$ e um aumento progressivo dessa população no tratamento de 25 mg/Kg ($8,58 \pm 1,50\%$) em relação ao CN. O grupo CN foi estatisticamente diferente do grupo tratado com 25 mg/Kg ($p < 0,05$). O percentual de células imunes do grupo CP foi insignificante, uma vez que não houve produção de ascite.

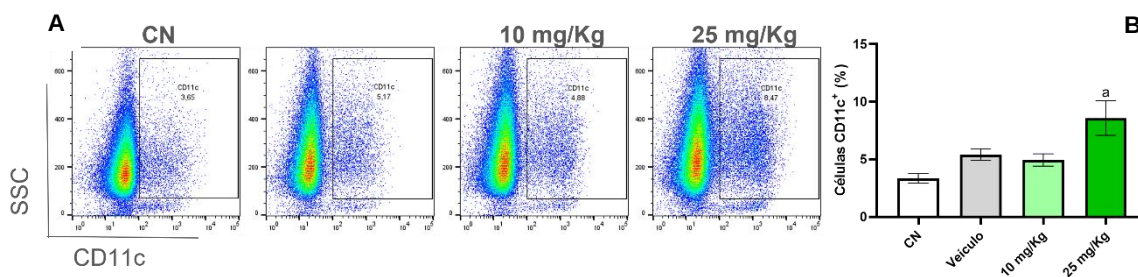


Figura 14. Fenótipo de células imunes no líquido ascítico. As células do líquido ascítico (5×10^5) foram marcadas com CD11c (imunidade inata) e avaliadas quanto à sua porcentagem relativa em relação ao parâmetro de granulosidade (SSC). (A) Dotplot das células que expressam CD11c, caracterizando células apresentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas. (B) Frequência média das células CD11c⁺ nos diferentes grupos. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. A comparação entre os grupos foi feita através do teste ANOVA one-way com pós-teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$. A letra "a" indica diferença estatística em relação ao grupo CN, a letra "b" em relação ao grupo Veículo, "c" em relação a 10 mg/Kg e "d" em relação a 25 mg/kg. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

Em relação à porcentagem de células CD3, o grupo CN apresentou $2,60 \pm 0,52$, Veículo $2,85 \pm 0,30$ e houve um aumento progressivo no tratamento de 10 mg/Kg ($5,17 \pm 0,89$) e 25 mg/Kg ($5,42 \pm 0,63$). O grupo 25 mg/Kg foi estatisticamente diferente do grupo CN e Veículo ($p < 0,05$), conforme mostrado na figura 15.

Em relação à porcentagem de células positivas para os marcadores CD3 e CD4 (linfócitos auxiliares), observou-se uma baixa população no grupo CN ($0,64 \pm 0,08\%$). Houve um aumento dessa população no grupo Veículo ($0,70 \pm 0,04$) e nos tratamentos com 10 mg/Kg ($0,79 \pm 0,08$) e 25 mg/Kg ($0,94 \pm 0,11$). Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos, conforme mostrado na figura 15.

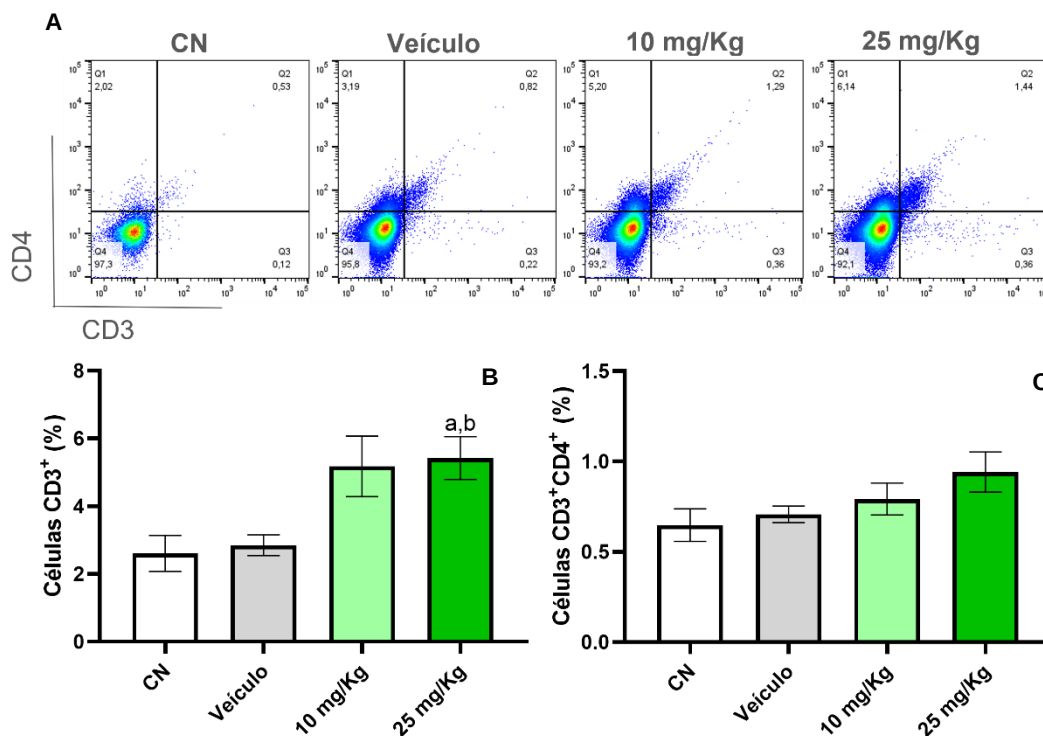


Figura 15. Fenótipo de células imunes no líquido ascítico. (A) Dotplot caracterizando os linfócitos T (CD3⁺) e suas subpopulações (CD4⁺). (B) Média da frequência de células que expressam CD3⁺ e (C) de células CD3⁺CD4⁺, caracterizando a população de linfócitos T. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. A comparação entre os grupos foi feita através do teste ANOVA one-way com pós-teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$. A letra "a" indica diferença estatística em relação ao grupo CN, a letra "b" em relação ao grupo Veículo, "c" em relação a 10 mg/Kg e "d" em relação a 25 mg/kg. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.9. Efeito do tratamento na produção de óxido nítrico

A presença de óxido nítrico na cavidade peritoneal dos camundongos do grupo Saudável não foi detectada. No grupo CN, a produção foi de $4,50 \pm 1,48$, o grupo Veículo foi de $3,52 \pm 1,00$ e o grupo CP foi de $1,70 \pm 0,37$. Nos grupos tratados com 10 mg/Kg e 25 mg/Kg, os valores encontrados foram $4,52 \pm 1,05$ e $7,88 \pm 3,41$, respectivamente. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos analisados (Figura 16).

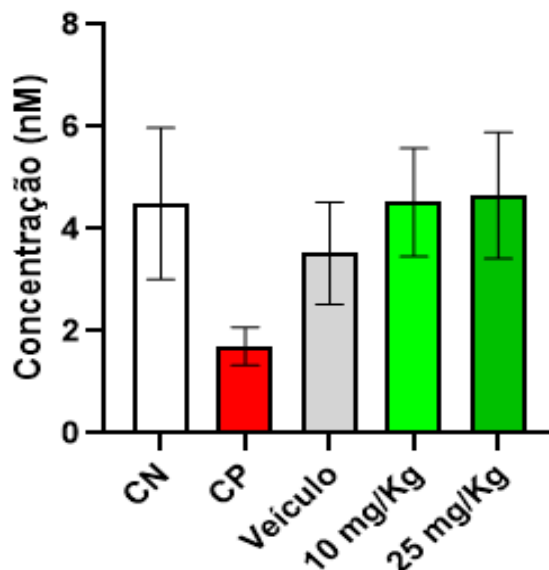


Figura 16. Concentração do óxido nítrico no líquido ascítico. A concentração de óxido nítrico foi medida por meio dos níveis de nitrito nos sobrenadantes dos líquidos ascíticos. A absorbância foi determinada por espectrofotômetro com filtro de 540 nm. Os valores obtidos em densidade óptica foram convertidos em μM de NO usando uma equação de regressão linear baseada em uma curva padrão (5, 10, 30 e 60 μM) de nitrito de sódio. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. A comparação entre os grupos foi feita através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn's. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.10. Avaliação da angiogênese

A análise da microvasculatura do revestimento da cobertura interna da parede peritoneal mostrou o aumento do crescimento dos vasos sanguíneos no grupo CN (475 ± 213) e redução dos vasos no CP (242 ± 658) e Veículo (502 ± 730), quando comparados com o grupo Saudável (355 ± 127). Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com 10 mg/Kg (770 ± 103) e 25 mg/Kg (734 ± 834) apenas quando comparados ao CP ($p < 0,05$), conforme mostrado na figura 17.

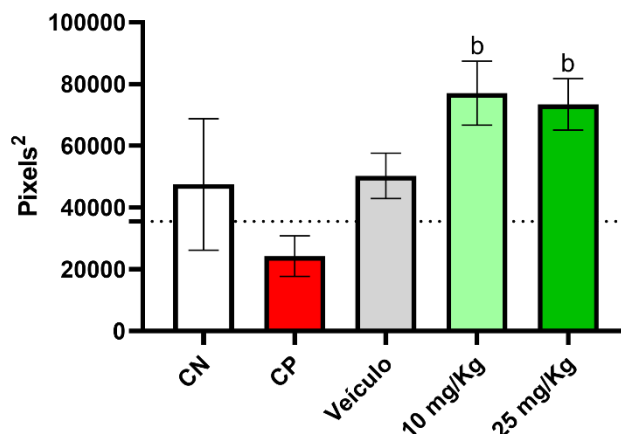


Figura 17. Avaliação da angiogênese nos grupos experimentais. A vascularização foi analisada utilizando imagens obtidas da parede interna da cavidade peritoneal. Após a segmentação, a área ocupada pelos vasos sanguíneos foi quantificada em pixels quadrados (pix²). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. A letra "a" indica diferença estatística significativa em relação ao grupo Controle Negativo (CN), e "b" indica diferença estatística significativa em relação ao grupo Controle Positivo (CP). CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo. A linha tracejada representa o grupo Saudável.

5.11. Efeito do tratamento nos órgãos linfoides

A celularidade dos órgãos linfoides variou conforme o tratamento, como pode ser visto na figura 18. Na medula óssea, um órgão linfóide primário, o grupo saudável (linha pontilhada) apresentou uma celularidade de $5,90 \pm 1,50$ e o Veículo de $6,49 \pm 1,18$. O grupo CN ($8,07 \pm 1,23$) mostrou um aumento da celularidade, enquanto o grupo CP ($2,81 \pm 0,36$) apresentou uma diminuição, sendo esses grupos estatisticamente diferentes entre si ($p = 0,0053$). O grupo tratado com 10 mg/Kg ($5,84 \pm 0,48$) foi estatisticamente diferente quando comparado ao CP e o grupo de 25 mg/kg ($3,88 \pm 0,58$) quando comparado ao CN ($p < 0,05$).

No baço (Figura 18), o peso do grupo Saudável foi de $0,15 \pm 0,03$ e do Veículo foi de $0,10 \pm 0,004$, sendo os grupos CN, CP, Veículo e 25 mg/Kg diferiam estatisticamente do grupo Saudável ($p < 0,05$). O grupo CN ($0,10 \pm 0,01$) apresentou uma diferença estatística em relação ao grupo CP ($0,06 \pm 0,01$), com $p = 0,0140$. Os grupos tratados com 10 mg/Kg ($0,11 \pm 0,01$) 25 mg/Kg ($0,10 \pm 0,05$) e Veículo foram estatisticamente diferentes do grupo CP ($p < 0,05$).

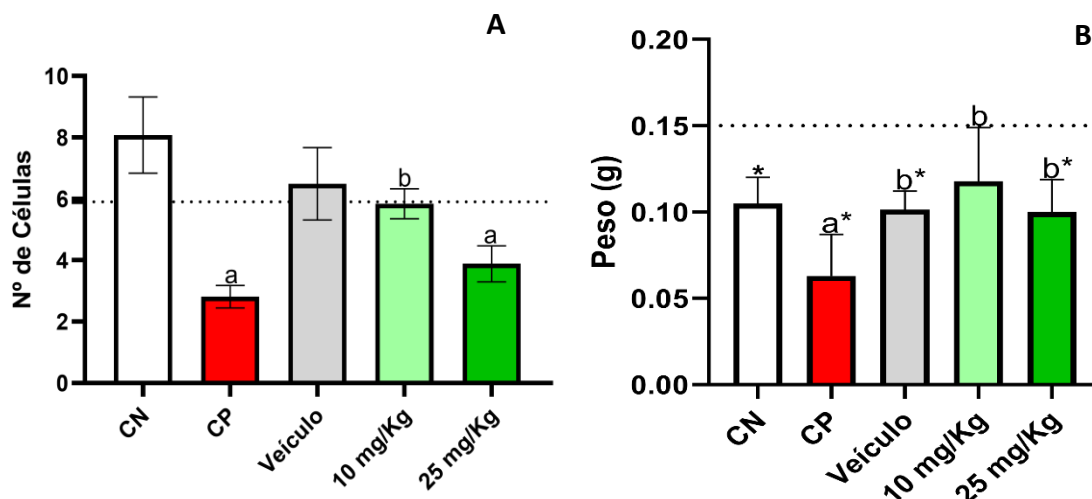


Figura 18. Análise dos órgãos linfoides. (A) Número de células da medula óssea. (B) Peso médio do baço. A comparação entre os grupos foi feita através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn's para a celularidade da medula óssea e o teste ANOVA one-way com pós-teste de Tukey para o peso do baço. A letra "a" indica diferença estatística em relação ao grupo CN, e "b" em relação ao grupo CP. O "*" indica diferença estatística em relação ao grupo Saudável (Linha pontilhada). Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.12. Efeito do tratamento no peso do fígado

O peso do fígado dos animais saudáveis foi de $1,82\text{g} \pm 0,038$ (linha pontilhada no gráfico). Os grupo CN ($1,99\text{g} \pm 0,077$) e o grupo 25mg/Kg ($2,05\text{g} \pm 0,073$) diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). O grupo CP ($2,05\text{g} \pm 0,073$) apresentou diferença estatística em relação aos grupos Veículo ($1,72\text{g} \pm 0,12$) e 25mg/Kg ($2,05\text{g} \pm 0,073$). Já o grupo 10 mg/Kg ($1,94\text{g} \pm 0,05$) diferiu significativamente do grupo 25 mg/Kg ($p < 0,05$), como pode ser observado na figura 19.

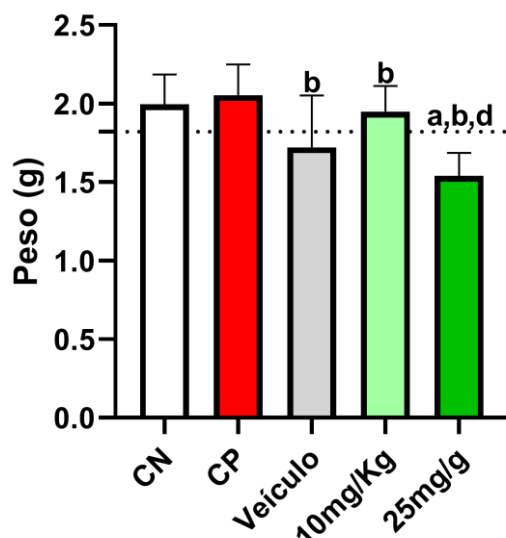


Figura 19. Efeito do tratamento com a formulação nanoestruturada no peso do fígado. O fígado foi excisado da cavidade abdominal e pesado em uma balança analítica de precisão para determinação de sua massa. A comparação entre os grupos foi feita através da ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$. A letra "a" indica diferença estatística em relação ao grupo CN, "b" em relação ao grupo CP, "c" em relação ao Veículo, "d" em relação a 10 mg/Kg e "e" em relação a 25 mg/Kg. A linha pontilhada representa o grupo Saudável. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.13. Efeito do tratamento da formulação nanoestruturada de *Fridericia platyphylla* na produção de citocinas

A dosagem de citocinas no soro (efeito sistêmico) e no líquido ascítico (microambiente tumoral) são mostrados na figura 20.

No soro, os níveis de IL-10 foram maiores no grupo tratado com 10 mg/Kg ($4,30 \pm 2,05$) em comparação com os grupos CN ($0,78 \pm 0,51$), CP ($0,95 \pm 0,63$), Veículo ($0,97 \pm 0,63$) e 25 mg/Kg ($0,49 \pm 0,49$). No líquido ascítico, o grupo CN apresentou os níveis mais elevados de IL-10 ($19,45 \pm 1,49$), seguido do grupo Veículo ($13,71 \pm 2,77$), enquanto no grupo CP não houve detecção (0 ± 0). Os grupos tratados com 10 mg/Kg ($15,29 \pm 2,81$) e 25 mg/Kg ($5,75 \pm 1,85$) mostraram redução nos níveis de IL-10 em comparação com o CN. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

No soro, o grupo CN apresentou os níveis mais elevados de TNF- α ($61,84 \pm 6,86$), seguido do Veículo ($41,18 \pm 3,15$), com uma redução substancial no grupo CP ($5,67 \pm 1,80$). Os tratamentos com 10 mg/Kg ($47,52 \pm 5,973$) e 25 mg/Kg ($36,29 \pm 4,02$) reduziram os níveis, sendo a dose de 25 mg/Kg mais eficaz. O grupo Saudável (linha pontilhada) apresentou níveis basais de TNF- α ($4,44 \pm$

0,83), consideravelmente mais baixos que os grupos tumorais. O grupo Saudável diferiu estatisticamente em relação ao grupo CN, Veículo, 10 e 20 mg/kg ($p < 0,05$). O grupo CP diferiu estatisticamente dos grupos CN, Veículo, 10 e 25 mg/kg. O grupo CN apresentou diferença estatística em relação ao grupo 25 mg/Kg ($p < 0,05$).

No líquido ascítico, o grupo CN também mostrou os níveis mais altos de TNF- α ($100,60 \pm 19,63$), seguido do grupo Veículo ($42,46 \pm 6,73$), enquanto CP teve níveis quase indetectáveis ($0,33 \pm 0,28$). Os tratamentos com 10 mg/Kg ($70,40 \pm 12,91$) e 25 mg/Kg ($54,11 \pm 9,60$) reduziram os níveis de TNF- α em comparação ao CN, e no grupo Saudável, não houve detecção de TNF- α . Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

No soro, o grupo tratado com 10 mg/Kg apresentou um aumento de IFN- γ ($13,09 \pm 2,514$) em comparação com CN ($6,057 \pm 1,666$), CP ($0,3543 \pm 0,1495$), Veículo ($7,55 \pm 3,07$) e 25 mg/Kg ($5,635 \pm 1,205$). O grupo Saudável (linha tracejada) apresentou níveis basais de IFN- γ ($2,73 \pm 2,73$), sendo menores do que os grupos tumorais. A única diferença estatística encontrada foi em relação ao grupo de 10 mg/Kg e grupo CP. No líquido ascítico, os níveis de IFN- γ foram substancialmente mais altos no CN ($71,43 \pm 29,89$), seguido do Veículo ($36,25 \pm 12,34$) e não foram detectados no CP (0 ± 0). O tratamento com 10 mg/Kg ($37,22 \pm 8,153$) e 25 mg/Kg ($23,46 \pm 4,58$) reduziram os níveis de IFN- γ , com a dose de 25 mg/Kg mostrando menores valores e no grupo Saudável não houve detecção de IFN- γ . Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

No soro, o grupo tratado com 10 mg/Kg mostrou os maiores níveis de IL-6 ($105,30 \pm 54,26$), seguido de 25 mg/Kg ($92,23 \pm 27,94$), enquanto CN ($45,05 \pm 14,36$), Veículo ($33,67 \pm 5,74$) e CP ($3,98 \pm 1,09$) apresentaram níveis menores. No grupo Saudável, não foi detectada IL-6. Sendo a diferença estatisticamente relevante achada entre os grupos tratados (10 e 25 mg/Kg) e o grupo CP. No líquido ascítico, IL-6 foi elevada no grupo CN ($434,9 \pm 233,9$) e Veículo ($255,1 \pm 90,02$) com uma redução substancial no grupo CP ($8,93 \pm 4,023$). Os grupos tratados com 10 mg/Kg ($260,00 \pm 65,52$) e 25 mg/Kg ($961,60 \pm 361,70$) apresentaram variações, sendo o grupo de 25 mg/Kg o que exibiu o maior aumento de IL-6, e no grupo Saudável não houve detecção de IL-6. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

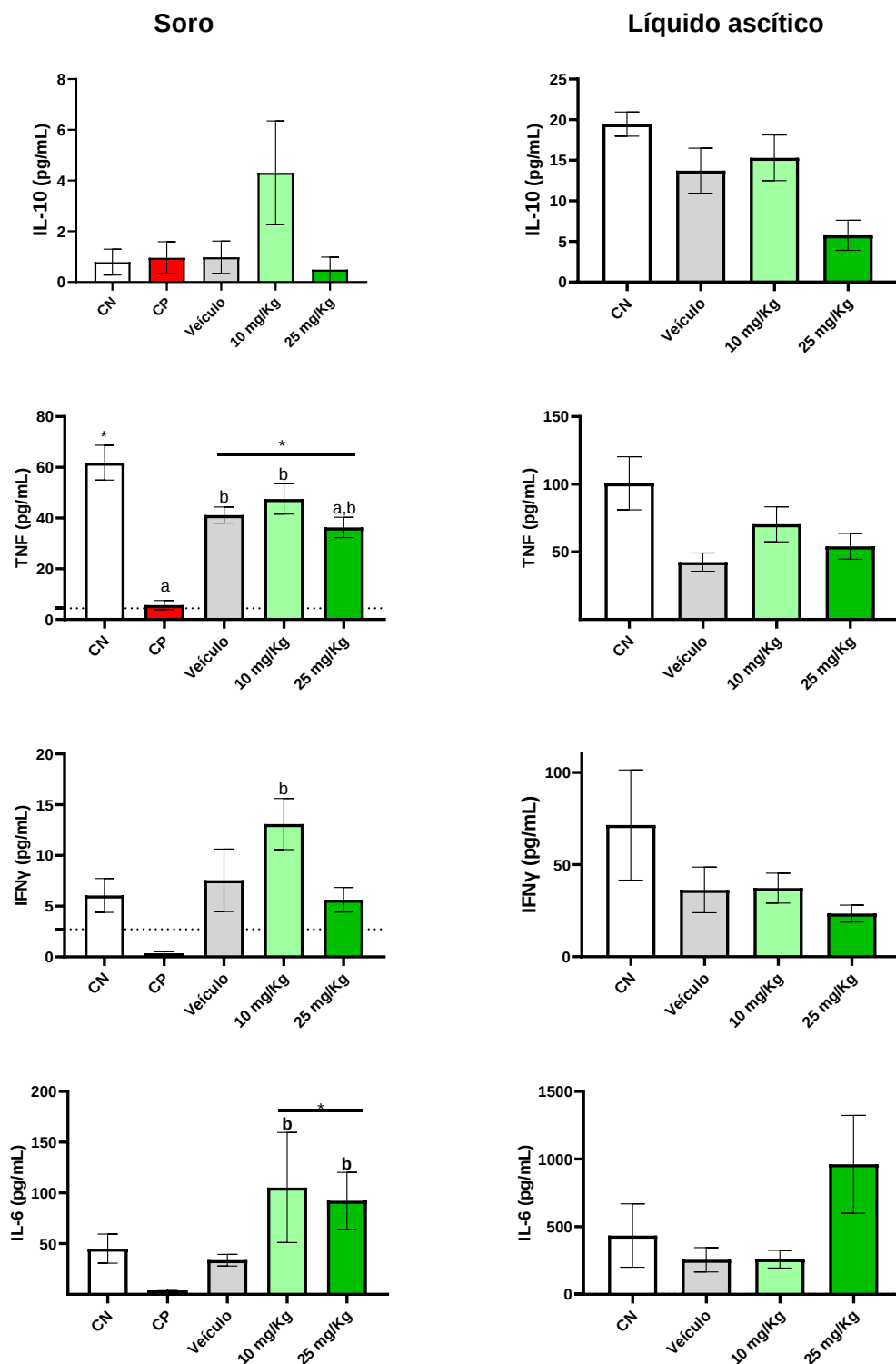


Figura 20. Concentração das citocinas inflamatórias no soro e no líquido ascítico. (A) Média da concentração das citocinas séricas e (B) das citocinas no líquido ascítico. A comparação entre os grupos foi feita através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn's, considerando significativo $p < 0,05$. O "*" representa o grupo Saudável, a letra "a" indica diferença estatística em relação ao grupo CN, "b" em relação ao grupo CP, "c" em relação ao Veículo, "d" em relação a 10 mg/Kg e "e" em relação a 25 mg/Kg. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

5.14. Avaliação histopatológica do fígado e rim dos grupos experimentais

5.14.1. Avaliação histopatológica do fígado (Figura 21)

1. Infiltrado inflamatório

Os resultados para o infiltrado inflamatório no fígado mostraram que o grupo Saudável apresentou média de $0,67 \pm 0,33$ (leve infiltração), enquanto o grupo CN e o CP não apresentaram sinais de inflamação (0 ± 0). O grupo Veículo apresentou infiltração moderada ($1,33 \pm 0,21$), enquanto os grupos tratados com 10 mg/kg e 25 mg/kg mostraram infiltração leve ($1,2 \pm 0,2$ e $0,4 \pm 0,27$, respectivamente). O grupo CN diferiu estatisticamente dos grupos Veículo e 10 mg/Kg. O grupo CP foi estatisticamente diferente do grupo Veículo e 10 mg/Kg ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença estatística no grupo de maior dose (Tabela 3).

2. Alterações celulares

No que diz respeito às alterações celulares, o fígado do grupo Saudável não apresentou alterações (0 ± 0), enquanto o CN exibiu leve alteração ($0,67 \pm 0,49$) e o CP apresentou alterações muito leves ($0,14 \pm 0,14$). O grupo Veículo mostrou alterações celulares intensas (3 ± 0). O tratamento com 10 mg/kg resultou em leve alteração celular ($0,5 \pm 0,22$), enquanto a dose de 25 mg/kg mostrou alterações moderadas ($1,6 \pm 0,22$). O grupo 10 mg/kg foi estatisticamente diferente do grupo Veículo ($p < 0,05$). Por sua vez, o grupo Veículo diferiu estatisticamente do grupo CN, CP e Saudável ($p < 0,05$) (Tabela 3).

3. Alterações circulatórias

As alterações circulatórias foram mais evidentes no grupo Veículo ($2,67 \pm 0,21$). Os grupos CN e CP mostraram alterações leves ($1,5 \pm 0,22$ e $1,29 \pm 0,36$, respectivamente), enquanto o grupo Saudável apresentou alterações mínimas (1 ± 0). Os tratamentos com 10 mg/kg e 25 mg/kg resultaram em alterações leves a moderadas ($1,6 \pm 0,16$ e $1,8 \pm 0,2$, respectivamente). O grupo Veículo diferiu estatisticamente do grupo CP ($p < 0,05$). O grupo Saudável foi estatisticamente diferente do grupo Veículo ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre as doses quando comparadas ao grupo CN, CP, Veículo e Saudável (Tabela 3).

Tabela 3. Análise histopatológica do fígado de animais dos grupos experimentais tratados e não tratados com a formulação nanoestruturada.

Escore	Saudável	CN	CP	Veículo	10mg/kg	25mg/kg
Fígado						
Infiltrado inflamatório	0,7±0,3	0	0	1,3±0,2 ^{a,b}	1,2±0,2 ^{a,b}	0,4±0,3
Alterações celulares	0	0,7±0,5	0,1±0,1 ^c	3,0±0 ^{*a,b}	0,5±0,2 ^c	1,6±0,2
Alterações circulatória	1,0±0	1,5±0,2	1,3±0,4	2,5±0,2 ^{*b}	1,6±0,2	1,8±0,2

Amostras de tecido hepático foram coletadas, processadas e emblocadas em parafina. Análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40X. Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (SEM), e as diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, considerando significativo $p < 0,05$. O “*” representa o grupo Saudável, a letra “a” indica diferença estatística em relação ao grupo CN, “b” em relação ao grupo CP, “c” em relação ao Veículo, “d” em relação a 10 mg/Kg e “e” em relação a 25 mg/Kg. Os dados foram expressos em média ± SEM. CN: Controle Negativo e CP: controle positivo.

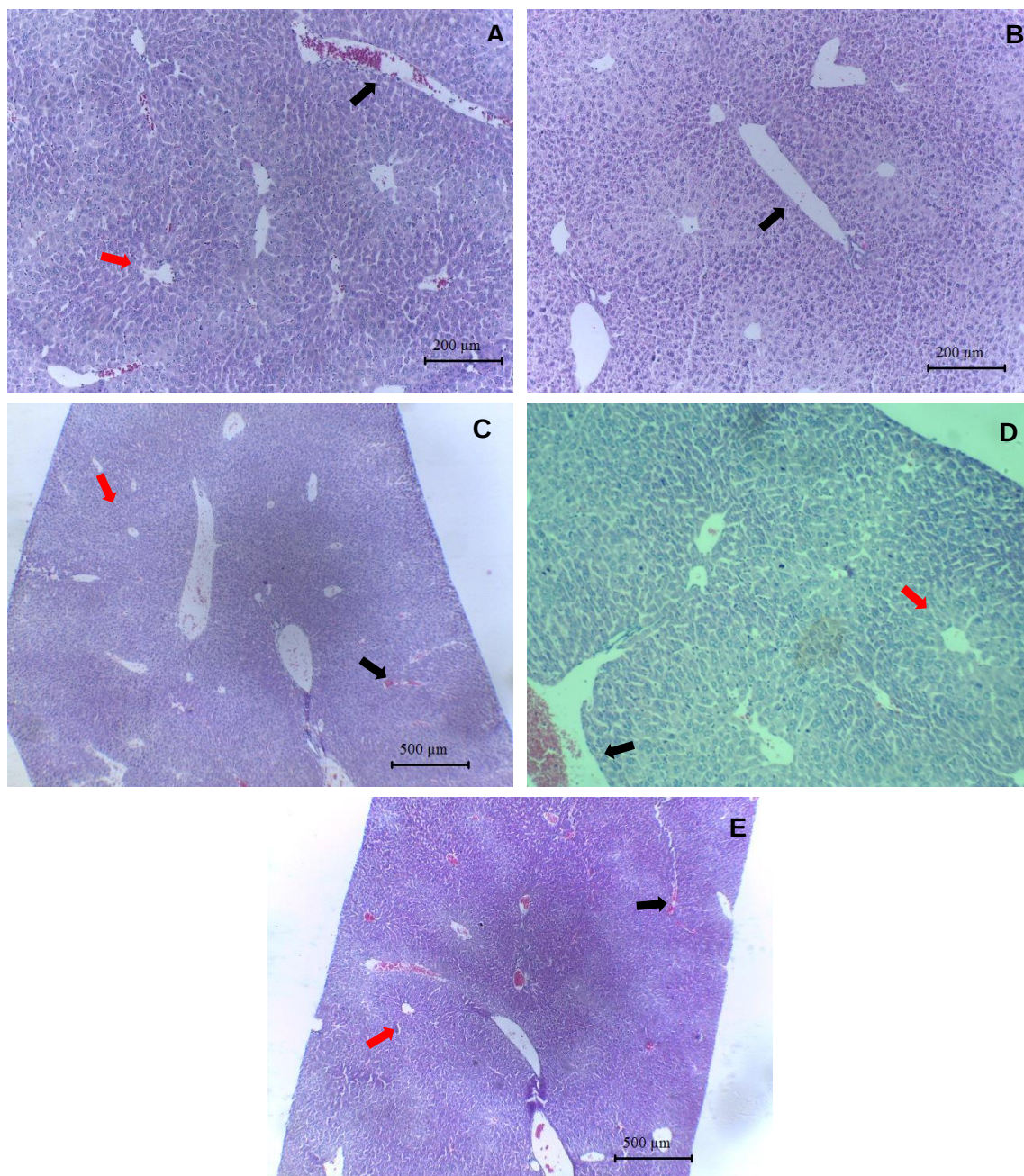


Figura 21. Fotomicrografia do fígado de animais com tumor de Ehrlich tratados e não tratados com a formulação nanoestruturada. Avaliação histológica do fígado de camundongos após 8 dias de tratamento no modelo ascítico do tumor de Ehrlich, analisados em aumento de 100 e 400x. Os parâmetros analisados incluem infiltrado inflamatório, alterações celulares e alterações circulatorias, avaliados com base em um sistema de escores histológicos: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (intenso). A seta preta e vermelha representa as alterações circulatorias e celulares, respectivamente. **A:** Grupo CN; **B:** Grupo CP; **C:** Grupo Veículo; **D:** Grupo 10 mg/kg e **E:** Grupo 25 mg/kg.

Avaliação histopatológica do rim quanto aos parâmetros (Figura 22)

1. Infiltrado inflamatório

Os resultados mostram que o grupo saudável e os controles (CN e CP) não apresentaram sinais de infiltração inflamatória (0 ± 0). No grupo Veículo, houve leve infiltração inflamatória ($0,17 \pm 0,17$), enquanto os grupos tratados com 10 mg/kg e 25 mg/kg apresentaram infiltração inflamatória leve a moderada ($0,67 \pm 0,17$ e $0,22 \pm 0,15$, respectivamente). O grupo 10 mg/kg diferiu estatisticamente dos grupos CN e CP ($p < 0,05$). Não houve diferenças estatísticas entre os demais grupos (Tabela 4).

2. Alterações celulares

Nenhuma alteração celular foi observada em nenhum dos grupos experimentais (0 ± 0), incluindo os tratados com *F. platyphylla*, controles (CN e CP) e grupo Veículo (Tabela 4).

3. Alterações circulatórias

As alterações circulatórias foram observadas em todos os grupos experimentais, incluindo o grupo saudável ($2,33 \pm 0,33$). No grupo Veículo, as alterações foram mais pronunciadas ($2,71 \pm 0,18$), enquanto nos grupos tratados com 10 mg/kg e 25 mg/kg, as alterações permaneceram moderadas ($2,89 \pm 0,11$ e $2,33 \pm 0,17$, respectivamente). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Análise histopatológica do rim de animais dos grupos experimentais tratados e não tratados com a formulação nanoestruturada.

Escore	Saudável	CN	CP	Veículo	10mg/kg	25mg/kg
Rim						
Infiltrado inflamatório	0	$1,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0$	$1,6 \pm 0,5^{a,b}$	$1,8 \pm 0,2$
Alterações celulares	0	0	0	0	0	0
Alterações circulatória	$2,33 \pm 0,33$	$2,5 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,5$

Amostras de tecido renal foram coletadas, processadas e emblocadas em parafina. Análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40X. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (SEM), e as diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, considerando significativo $p < 0,05$. A letra "a" indica diferença estatística em relação ao grupo CN, "b" em relação ao grupo CP.

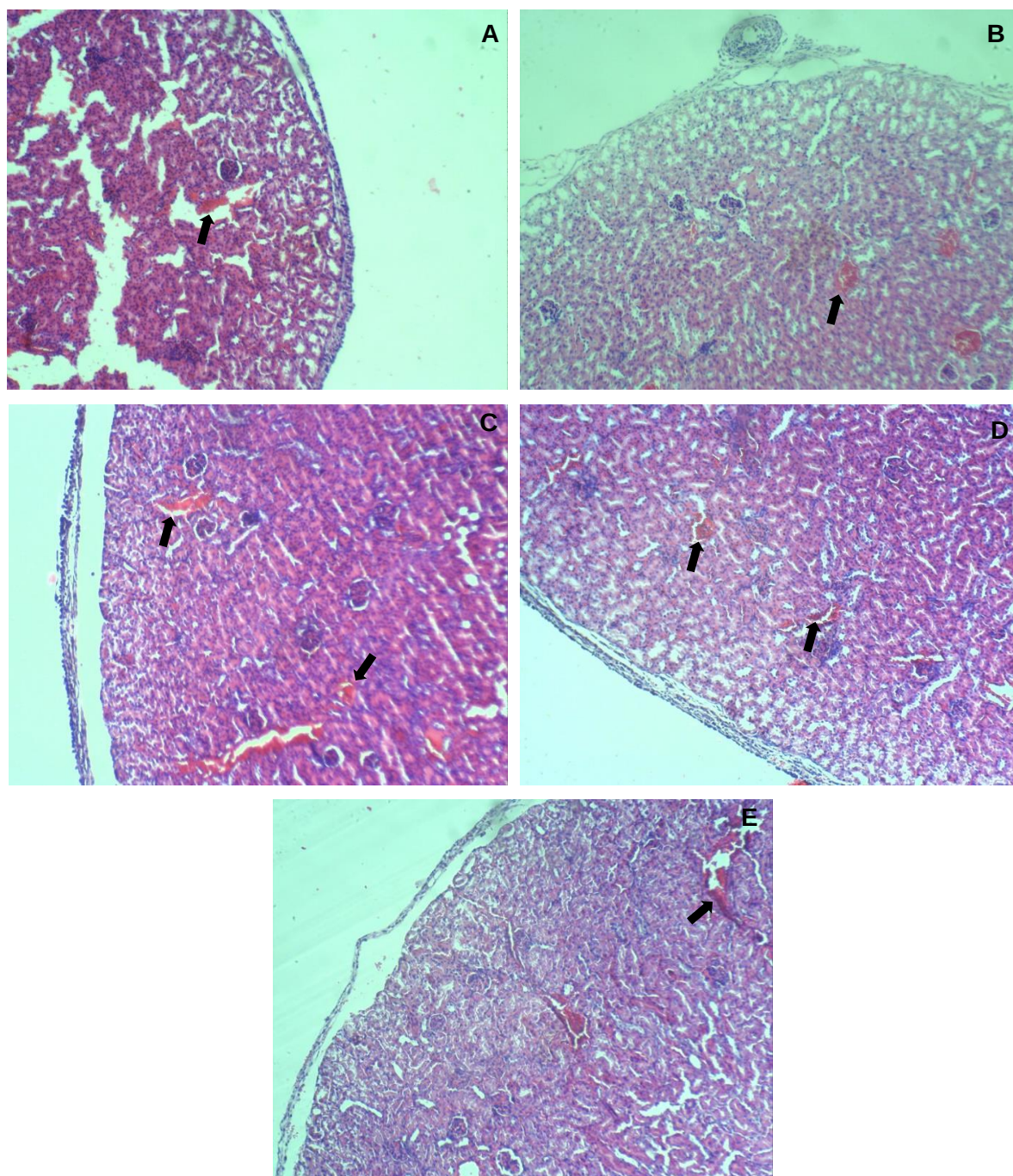


Figura 22. Fotomicrografia do rim de animais com tumor de Ehrlich tratados e não tratados com a formulação nanoestruturada. Avaliação histológica do rim de camundongos após 10 dias de tratamento no modelo ascítico do tumor de Ehrlich, analisados em aumento de 400x. Os parâmetros analisados incluem infiltrado inflamatório, alterações celulares e alterações circulatórias, utilizando um sistema de escores histológicos: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (intenso). A seta preta representa as alterações circulatórias. **A:** Grupo CN; **B:** Grupo CP; **C:** Grupo Veículo; **D:** Grupo 10 mg/kg e **E:** Grupo 25 mg/kg.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliada o potencial antitumoral e modulador da formulação nanoestruturada contendo o extrato das folhas de *F. platyphylla* no tumor ascítico de Ehrlich.

Para isso foi utilizado o modelo ascítico do tumor de Ehrlich, um adenocarcinoma mamário espontâneo de camundongos fêmeas (Matsukaki, 2004). A resposta imune a esse tumor é bifásica, inicialmente as células da imunidade inata são ativadas e produzem citocinas como TNF- α , IFN- γ e quimosinas MCP-1 (Gentile *et al.*, 2015; Frajacomo *et al.*, 2016). Isso leva a ativação de macrófagos M1, neutrófilos, células NK, além de ativarem células dendríticas para apresentação de antígenos tumorais para a imunidade adaptativa de padrão Th1 (Farooque *et al.*, 2014). Caso essa ativação aconteça de forma ótima, o crescimento tumoral é impedido ou retardado (Farooque *et al.*, 2014; Feitosa *et al.*, 2021).

A progressão do tumor, porém, está associada a uma subversão da resposta imune, que ocorre principalmente pela reprogramação de macrófagos para o perfil M2, produção e ativação de células Treg e recrutamento de células mieloides supressoras (MDSCs) (Kalish *et al.*, 2015; Palos *et al.*, 2012; Bhattacharyya *et al.*, 2010; Aboalsoud, *et al.*, 2020). Esse processo de cooptação do sistema imune, está associado a liberação de citocinas como IL-10, IL-6 e VEGF, promovendo uma cronificação da inflamação, impedindo a manutenção de uma resposta antitumoral efetiva (Palos *et al.*, 2012; Kalish *et al.*, 2015).

Quanto maior for o desequilíbrio da resposta inflamatória, maior será o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, aumentando a quantidade de líquido na cavidade peritoneal, dando suporte nutricional as células tumorais e a depleção de células imunológicas tanto no microambiente tumoral quanto em sítios distantes, como sangue e baço (Fernandes *et al.*, 2015; Feitosa *et al.*, 2021). Além de danos a órgãos como fígado devido ao stress metabólico induzido (Violato *et al.*, 2014). Devido as características do modelo, existe 3 formas conter o crescimento tumoral, destruição direta das células tumorais, modulação da resposta imunológica e regulação da resposta inflamatória (Feitosa *et al.*, 2021; Radulski *et al.*, 2023).

A *Fridericia platyphylla*, assim como outras espécies do gênero, já teve sua citotoxicidade direta em células tumorais largamente estudadas em modelos *in vitro*, tanto dos seus extratos quanto de compostos isolados (Nunes *et al.*, 2020; Serpeloni *et al.*, 2020). Sendo os mecanismos relacionados a isso são ativação do apoptose, expressão de genes pro-apoptóticos e regulação negativa do ciclo celular (Serpeloni *et al.*, 2020). Apesar dessas propriedades, a utilização da nanoformulação nas concentrações de 10 e 25 mg/Kg contendo o extrato hidroalcóolico das folhas dessa espécie não foi capaz de alterar de forma significativa os parâmetros associados ao desenvolvimento das células tumorais no modelo escolhido.

A falta de efeito citotóxico direto sobre as células do tumor de Ehrlich podem ser explicadas por 3 motivos, inefetividade nesse modelo, processos de biotransformação e a liberação lenta causada pelo copolímero Pluronic F127. Esse é o primeiro trabalho a estudar o extrato da *F. platyphylla* no modelo do tumor de Ehrlich, logo não podemos comparar nossos achados com outros trabalhos. Além disso, as células tumorais desse modelo não são adaptadas ao cultivo *in vitro* e o ensaio de citotoxicidade direta também não é viável (Radulski *et al.*, 2023; Shiomi *et al.*, 2024).

Sabe-se que a translocação de dados *in vitro* para modelos biológicos são complexos e com os *in vivo* são desafiadores, devido à complexidade dos sistemas biológicos (Liu *et al.*, 2017; Antunes *et al.*, 2022). Além da toxicidade, uma das principais causas da não utilização de drogas descobertas *in vitro* (Brown, Jacobs, Fitzpatrick, 2012), temos a questão da biotransformação. No contexto *in vivo*, sabe-se que os processos metabólicos podem gerar biotransformações significativas, podendo diminuir ou aumentar os efeitos biológicos previamente observados (Lichota; Gwozdzinski, 2018). Pode-se especular que devido a administração oral, os compostos com propriedades biológicas antitumorais não tenham sido absorvidos ou então foram degradados, se tornando compostos inativos.

Outra possibilidade para a falta de achados citotóxicos é que a formulação com o copolímero Pluronic F127 tenham diminuído a quantidade de compostos liberados, alterando a capacidade antineoplásica. As micelas do copolímero Pluronic F127 são utilizadas primariamente como uma forma de melhorar a estabilidade e biodisponibilidade de compostos devido a suas propriedades

hidrofílicas e hidrofóbicas, aumentando a biocompatibilidade da formulação (Silva *et al.*, 2022). Além disso, quando associado a drogas antitumorais diminuem o seu IC50 e reduzem seus efeitos tóxicos devido a liberação controlada do fármaco (Akash; Rehman, 2015). Compostos como flavonoides com propriedades antitumorais também se beneficiam dessa formulação, aumentando sua efetividade no cenário tumoral (Ronka *et al.*, 2023). Em vista disso, especula-se que a liberação mais controlada dos compostos talvez não tenha atingido a concentração necessária para produzir ou manter um efeito antineoplásico.

Outra forma de se controlar o desenvolvimento de tumores em geral e no modelo aqui estudado é através da modulação imunológica. Uma das principais espécies estudadas da família Bignoniaceae é a *Arrabidaea chica* (Brandão *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2022). Os extratos dessa planta demonstraram atividade antineoplásica no modelo de tumor de Ehrlich na dose de 30 mg/Kg, tanto de forma direta quanto indireta através da diminuição de células inflamatórias na ascite e no sangue (Ribeiro *et al.*, 2012).

A partir disso, nos debruçamos sobre os possíveis efeitos da nanoformulação sobre parâmetros imunológicos em nosso modelo. Durante a avaliação das células imunológicas presentes na ascite, foi observado um aumento de células dendríticas e linfócitos (auxiliares e possivelmente citotóxicos) no grupo tratado apenas com o copolímero F127. Sabe-se que micelas de Pluronic F127 carregadas com antígenos (albumina) aumentam a atividade de células dendríticas, melhorando a ativação de células CD8⁺ e linfócitos B em camundongos. Esse mesmo estudo, utilizando essas micelas em modelo tumoral, observaram uma diminuição do tumor devido a ativação da imunidade antitumoral (Li *et al.*, 2018).

Essa propriedade do copolímero F127 o faz ser considerado um imunomodulador, sendo usado para aumentar a resposta imune desencadeada por microesferas de quitosana (CMs) carregadas com antígenos de *Bordetella bronchiseptica*. Essas partículas foram capazes de ativar macrófagos murinos (aumento de citocinas como TNF- α) tanto *in vitro* quanto *em vivo* (Kang *et al.*, 2007). Parte desse efeito imunoestimulante parece estar sendo observado no cenário tumoral, embora sem efeito nas células do tumor de Ehrlich. A associação do copolímero F127 com o extrato vegetal, tende a diminuir essa ativação, corroborando com os achados anti-inflamatórios associados a essa

espécie (Rocha *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2015; Henrique *et al.*, 2024). Esses mecanismos parecem estar associados a uma pequena modulação das citocinas encontradas no soro, onde a maior dose do extrato reduziu a concentração de TNF- α e IFN- γ . Apesar de aumentar a concentração de IL-6 tanto de forma sistêmica quanto, no microambiente tumoral.

Curiosamente, IL-6 é uma das citocinas liberadas por macrófagos em resposta à ativação por antígenos (Aliyu *et al.*, 2022), e em células dendríticas essa citocina é capaz de diminuir a apresentação de antígenos devido à ativação de STAT3 (Kitamura *et al.*, 2017).

De forma sistêmica, os tratamentos foram associados ao aumento do número de células sanguíneas, particularmente de blastos, e uma diminuição de células da medula, o que pode sugerir um recrutamento de células mieloides supressoras. Assim como uma diminuição do infiltrado inflamatório no fígado e diminuição de alterações celulares nesses órgãos, podendo demonstrar um efeito sobre a inflamação de forma sistêmica. Dessa forma, substâncias capazes de controlar a inflamação no ambiente tumoral ainda são escassas, devido à complexidade dos mecanismos imunológicos desencadeados e manipulados pelos tumores (Hou *et al.*, 2021). Diante do exposto, substâncias naturais com propriedades moduladoras da resposta imune e da inflamação associada ao câncer são de grande importância e necessitam de mais investigações a respeito de seu mecanismo de ação.

7. CONCLUSÃO

- ✓ A formulação nanoestruturada não promoveu efeitos citotóxicos diretos *in vivo*, mas se mostrou um importante regulador da inflamação associada ao câncer;
- ✓ O tratamento com a formulação reduziu as citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α);
- ✓ A formulação teve apenas um discreto efeito na redução de células dendríticas e linfócitos encontrados no líquido ascítico;
- ✓ A formulação aumentou o número de células presentes no sangue, particularmente blastos.
- ✓ A formulação nanoestruturada das folhas da *Fridericia platyphylla* se revelou um potencial alvo terapêutico no contexto do câncer, embora sejam necessárias mais investigações a fim de compreender melhor seu mecanismo de ação sob o crescimento tumoral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, N., AMMAR, A., STORR, S. J., GREEN, A. R., RAKHA, E. A., ELLIS, I. O. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a meta-analysis of immunohistochemically stained tissue. *Scientific Reports*, 8(1), 15081, 2018.

ALIYU, M., ZOHORA, F. T., ANKA, A. U., ALI, K., MALEKNIA, S., SAFFARIOUN, M., AZIZI, G. Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. *International immunopharmacology*, 111, 109130, 2022.

ANDERTON, H., WICKS, I. P., & SILKE, J. Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(9), 496-513, 2020.

ARAÚJO, M. J. A. M. *et al.* Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 580-587, 2010.

ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature reviews drug discovery*, v. 20, p. 200-216, 2021.

ATSUMI *et al.* Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Res.* 74(1):8-14, 2014.

BERTI, A., ZANETTI, M., FRIGO, A. C., COSTA, A., MANONI, M., PELLATI, A., & PIACENTINI, G. The impact of tumor-infiltrating lymphocytes in predicting the response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast*, 40, 51-57, 2018.

Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z. M., Messi, M. L., Mintz, A., & Delbono, O. Type-1 pericytes participate in the regulation of tissue homeostasis in skeletal muscle. *Nature Communications*, 7, 10220, 2016.

Bode, J. G., Ehrling, C., & Häussinger, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis. *Cellular signalling*, 24(6), 1185-1194, 2012

CAMPOS, C.C. *et al.* The Ehrlich Tumor Induces Pain-Like Behavior in Mice: A Novel Model of Cancer Pain for Pathophysiological Studies and Pharmacological Screening. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-12, 2013.

CARLINI, V., NOONAN, D. M., ABDALALEM, E., GOLETTI, D., SANSONE, C., CALABRONE, L., & ALBINI, A. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Frontiers in immunology*, 14, 1161067, 2023.

CHEN et al. Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories From 2020 to 2050. *JAMA Oncology*. ;9(4):465-472, 2023.

COPE, A., LE FRIEC, G., CARDONE, J., & KEMPER, C. (2011). THE TH1 LIFE CYCLE: MOLE

COUSSENS, L. M; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 420, pages860–867, 2002.

CRAGG, G. M., PEZZUTO, J. M., & NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1857(3), 224-243, 2016.

Cruceriu, D., Baldasici, O., Balacescu, O., & Berindan-Neagoe, I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cellular Oncology*, 43, 1-18, 2020.

D'IGNAZIO, L., BATIE, M., & ROCHA, S. Hypoxia and inflammation in cancer, focus on HIF and NF- κ B. *Biomedicines*, 5(2), 2017.

DA ROCHA, C. Q. et al. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. *Phytochemistry*, v. 135, p. 93-105, 2017.

DARWICHE, N. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. *Am J Cancer Res*. 10(7):1954-1978. 2020.

DE LIMA, CAROLINA A. et al. Antiproliferative Activity of Two Unusual Dimeric Flavonoids, Brachyidin E and Brachyidin F, Isolated from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann: In Vitro and Molecular Docking Evaluation. *BioMed Research International*, v. 2022, p. 1–12, 2022.

DE SOUSA ANDRADE, LEILA M. et al. Antimicrobial activity and inhibition of the NorA-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

DHIMAN, R., BAZAD, N., MUKHERJEE, R., HIMANSHU, GUNJAN, LEAL, E., AHMAD, S., KAUR, K., RAJ, V. S., CHANG, C.-M., & PATI, R. P. Enhanced drug delivery with nanocarriers: a comprehensive review of recent advances in breast cancer detection and treatment. *Journal of Nanobiotechnology*, 19:143, 2024.

DUDLEY, A. C., & GRIFFIOEN, A. W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*, 26(3), 313-347, 2023

FEITOSA, I. B., MORI, B., TELES, C. B. G., COSTA, A. G. What are the immune responses during the growth of Ehrlich's tumor in ascitic and solid form? *Life Sciences*. 264, 2021.

FERNANDES, L. G. V., BARBOSA, S. M., OLIVEIRA, F. S., SILVA, L. P., BAVIA, L., DE LIMA, C. V., & VEMULA, S. Vaccination with recombinant *Brucella* spp.

proteins coadministered with adjuvants enhances T-helper-1 response in mice. *Frontiers in Microbiology*, 6, 240, 2015.

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*, 71, 83-89, 2015

FRAJACOMO, F. T. T., DE SOUZA PADILHA, C., MARINELLO, P. C., GUARNIER, F. A., CECCHINI, R., DUARTE, J. A. R., & DEMINICE, R. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. *Life Sciences*, 162, 47-53, 2016.

FUJIO, K., OKAMURA, T., & YAMAMOTO, K. The Family of IL-10-secreting CD4⁺ T cells. *Advances in immunology*, 105, 99-130, 2020.

G.B.; FURRER, P.; ALLÉMAN, E.; WOLFENDER, J.; SOARES, M.B.P. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from Arrabidaea brachypoda. *Molecules*. V. 24, p. 1, 2019.

GENTILE, L. B., QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N., MASSOCO, C. D. O., & FECCHIO, D. Modulation of cytokines production by indomethacin acute dose during the evolution of Ehrlich ascites tumor in Mice. *Mediators of Inflammation*, 2015(1), 924028, 2015.

GILMORE, T. D. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680-6684, 2006.

GRIVENNIKOV at al. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 140(6):883–899. 2011.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144: 5, p 646-674. 2011.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, v. 4, n. 4, p. 127-129, 2017.

HAYDEN, M. S., & GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & Development*, 26(3), 203-234, 2012

HILLMER, E. J., ZHANG, H., LI, H. S., & WATOWICH, S. S. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine & growth factor reviews*, 31, 1-15, 2016.

HOFF, J. Methods of Blood Collection in the Mouse. *Technique*, v. 29, p. 47-53, 2000.

HOU, J., KARIN, M., & SUN, B. Targeting cancer-promoting inflammation—have anti-inflammatory therapies come of age?. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(5), 261-279, 2021.

HUANG, B., LANG, X., & LI, X. The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers. *Front Oncol.* 2022; 12: 1023177, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>> Acesso em: 1 de novembro de 2024.

JAFARI, A. *et al.* Clinical Applications and Anticancer Effects of Antimicrobial Peptides: From Bench to Bedside. *Frontiers oncology*, v. 12, p. 1-19, 2022.

JIANG, X.; WANG, J.; DENG, X.; XIONG, F.; ZHANG, S.; GONG, Z.; ... & XIONG, W. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 39, n. 1, p. 1-19, 2020.

JONES, L. M., BROZ, M. L., RANGER, J. J., OZCELIK, J., AHN, R., ZUO, D., ... & MULLER, W. J. STAT3 establishes an immunosuppressive microenvironment during the early stages of breast carcinogenesis to promote tumor growth and metastasis. *Cancer research*, 76(6), 1416-1428, 2016.

KAEHLER, M.; MICHELANGELI, F. A.; LOHMANN, L. G. Fine tuning the circumscription of *Fridericia* (Bignoniaceae). *Taxon*, v. 68, p. 751, 2019.

KAK, G., RAZA, M., & TIWARI, B. K. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular concepts*, 9(1), 64-79, 2018.

KALISH, S. V., LYAMINA, S. V., USANOVA, E. A., MANUKHINA, E. B., LARIONOV, N. P., & MALYSHEV, I. Y. Macrophages reprogrammed in vitro towards the M1 phenotype and activated with LPS extend lifespan of mice with ehrlich ascites carcinoma. *Medical Science Monitor Basic Research*, 21, 226, 2015.

KHANDIA, R.; MUNJAL, A. Interplay between inflammation and cancer. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, v. 119, p. 199-245, 2020.

KITAMURA, T., QIAN, B. Z., & POLLARD, J. W. Immune cell promotion of metastasis. *Nature Reviews Immunology*, 17(11), 662-674, 2017.

KUBO, M., & MOTOMURA, Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Frontiers in immunology*, 3, 275, 2012.

Lichota, A., & Gwozdziński, K. Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3533, 2018.

Liu, Z. W., Zhang, Y. M., Zhang, L. Y., Zhou, T., Li, Y. Y., Zhou, G. C., ... & Liu, Y. Q. Duality of interactions between TGF- β and TNF- α during tumor formation. *Frontiers in Immunology*, 12, 810286, 2022.

MANNINO, M. H., ZHU, Z., XIAO, H., BAI, Q., WAKEFIELD, M. R., & FANG, Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer letters*, 367(2), 103-107, 2015.

MANTOVANI et al. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454, pages436–444, 2008.

MATSUMIYA, L. C. *et al.* Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *Journal of the American association for Laboratory Animal Science*, v. 51, n. 1, p. 42-49, 2012.

MIDDLETON, K., JONES, J., LWIN, Z., & COWARD, J. I. Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours. *Critical reviews in oncology/hematology*, 89(1), 129-139, 2014.

MIRANDA, K. M. *et al.* A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2001.

MIRANDA, N et al. Pheophorbide a compound isoled from the leaves of *Arrabidaeeae Chica*, induces photodynamic inactivation of *Trypanosoma cruzi*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 19, p. 256-265, 2017.

MOHAMED, A. A. H., AHMED, A. T., AL ABDULMONEM, W., BOKOV, D. O., Shafie, A., Al-Hetty, H. R. A. K., ... & Mudhafar, M. Interleukin-6 serves as a critical factor in various cancer progression and therapy. *Medical Oncology*, 41(7), 182, 2024.

MOJIC, M., TAKEDA, K., & HAYAKAWA, Y. The dark side of IFN- γ : its role in promoting cancer immunoevasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1025, 2017.

Molotkov, A., Satoh, M., & Tohyama, C. (1998). Tumor growth and food intake in interleukin-6 gene knock-out mice. *Cancer letters*, 132(1-2), 187-192, 1998.

NASCIMENTO, J. R. *et al.* A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus *Arrabidaea*. *Pharmaceuticals*, v. 15, p. 1-29, 2022.

NAUGLER, W. E., & Karin, M. (2008). NF- κ B and cancer—identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18(1), 19-26.

NUNES, H. L. *et al.* Characterization of the in vitro cytotoxic effects of bradydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 83, p. 547–558, 2020.

NUNES, HIGOR LOPES et al. Characterization of the in vitro cytotoxic effects of bradydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 83, n. 15–16, p. 547–558, 17 ago. 2020.

OUYANG, W., RUTZ, S., CRELLIN, N. K., VALDEZ, P. A., & Hymowitz, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology*, 29(1), 71-109, 2011.

OZASLAN, M. *et al.* Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 2375-2378, 2011.

PESSINI, A. C., SILVA, L. M. R., PANIS, C., SASSO, G. R., & CRECZYNSKI-PASA, T. B. Potential anti-inflammatory effects of functionalized nanostructured lipid carriers with phytol and the involvement of toll-like receptor 4 in macrophage polarization. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 7977-7989, 2020.

QUEIROZ, M. L. S. *et al.* Ehrlich Ascites Tumor as a Tool in the Development of Compounds with Immunomodulatory Properties. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 26, n. 4, p. 511-525, 2004.

RADULSKI, D. R., STIPP, M. C., GALINDO, C. M., & ACCO, A. Features and applications of Ehrlich tumor model in cancer studies: a literature review. *Translational Breast Cancer Research*, 4, 2023.

RÉBÉ, C., VÉGRAN, F., BERGER, H., & GHIRINGHELLI, F. (2013). STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. *Jak-stat*, 2(1), e23010, 2013.

RESENDE, FLÁVIA APARECIDA *et al.* In vitro toxicological assessment of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau: Mutagenicity and estrogenicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 90, p. 29-35, 2017.

ROCHA, C. Q. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 396-401, 2011.

RODRIGUES, V. P. *et al.* Involvement of opioid System, TRPM8, and ASIC Receptors in Antinociceptive Effect of *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 11, 2017.

ROSA, C. *et al.* The Program for Biodiversity Research in Brazil: The role of regional networks for biodiversity knowledge, dissemination, and conservation. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 93, p. 1-19, 2021.

ROŽMAN, P., & ŠVAJGER, U. (2018). The tolerogenic role of IFN- γ . *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 41, 40-53, 2018.

SAAD-HOSSNE, R. *et al.* Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. Estudo experimental in vitro. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 19, p. 54-58, 2004.

SÁNDOR, N., SCHILLING-TÓTH, B., & HUSZ, S. Role of integrins in dendritic cell functions. *Frontiers in Immunology*, 7, 275, 2016.

Saraiva, M., & O'garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews immunology*, 10(3), 170-181, 2010.

SCHITTENHELM, L., HILKENS, C. M., & MORRISON, V. L. Beta2 integrins as regulators of dendritic cell, monocyte, and macrophage function. *Frontiers in Immunology*, 8, 1866, 2017.

SCHMETTERER, K. G., & PICKL, W. F. The IL-10/STAT3 axis: Contributions to immune tolerance by thymus and peripherally derived regulatory T-cells. *European journal of immunology*, 47(8), 1256-1265, 2017.

SERPELONI, JM et al. *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann root extract exerts cytotoxic and antiproliferative effects on gastric tumor cells and downregulates BCL-XL, BIRC5, and MET genes. *Human & Experimental Toxicology*, v. 39, n. 3, p. 338–354, 2020.

SERRA, I.C.P.B. *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter*: estudos antitumorais e toxicológicos, 2009, 86p. 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.

SGAMBATO, A.; CITTADINI, A. Inflammation and cancer: a multifaceted link. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 14, p. 263-268, 2010.

SHALAPOUR, S; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. 125(9):3347-55, 2015.

SILVA, V. L. M. et al. Unusual dimeric flavonoids (brachydins) induce ultrastructural membrane alterations associated with antitumor activity in cancer cell lines. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 4, p. 665-676, 2022.

SKARTSIS, N., PENG, Y., FERREIRA, L. M., NGUYEN, V., RONIN, E., MULLER, Y. D., ... & TANG, Q. IL-6 and TNF α drive extensive proliferation of human tregs without compromising their lineage stability or function. *Frontiers in Immunology*, 12, 783282, 2021.

SMITH, S. M. *et al.* A Simple Technique for Quantifying Apoptosis in 96-Well Plates. *Methods in Cell Biology*, v. 112, p. 361-368, 2012.

SMYTH et al. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 90:1-50, 2006.

SOLER, M. F., ABAURREA, A., AZCOAGA, P., ARAUJO, A. M., & CAFFAREL, M. M. New perspectives in cancer immunotherapy: targeting IL-6 cytokine family. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 11(11), 2023.

SU, Q., WANG, F., DONG, Z., CHEN, M., & CAO, R. IFN- γ induces apoptosis in human melanocytes by activating the JAK1/STAT1 signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 22(4), 3111-3116, 2020.

SUAREZ-CARMONA et al. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol.* 11(7):805–823, 2017.

TAHER, M. Y., DAVIES, D. M., MAHER, J., & BOSHOF, C. Tumor microenvironment therapy: hypoxia-activated prodrugs and bispecific T cell engagers. *Journal of Experimental Medicine*, 215(4), 1674-1681, 2018.

TALMADGE, J. E., & GABRILOVICH, D. I. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature Reviews Cancer*, 13, 739-752, 2013.

TANIGUCHI, K., & KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology*, 18(5), 309-324, 2018.

ULLAH, ASAD et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, v. 25, n. 22, p. 5243, 2020.

VALENCIANO, A. C. *et al.* (Ed.). Atlas of canine and feline peripheral blood smears. Elsevier Health Sciences, 2013. pp 281.

VAN HORSSSEN, R., TEN HAGEN, T. L., & EGGERMONT, A. M. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist*, 11(4), 397-408, 2006.

VAN LOO, G., & BERTRAND, M. J. Death by TNF: a road to inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 23(5), 289-303, 2023.

VASCONCELOS, L. N.; PEREIRA FILHO, J. L.; LOPES, A. C. C. B.; TANGERINA, M. M. P.; ILEGAS, W.; DA ROCHA, C. Q. A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus *Arrabidaea*. *Pharmaceuticals*. V. 15, 2022.

VERÇOSA JÚNIOR, D. *et al.* Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Ehrlich ascítico no camundongo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 5, p. 788-798, 2006.

YU, H., KORTYLEWSKI, M., & PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 7(1), 41-51, 2009.

YUAN, J. A. S.; FUCHS, E. Beyond genetics: driving cancer with the tumour microenvironment behind the wheel. *Nature reviews cancer*, (2024). <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00660-9>, 2024.

YUAN, J. A. S.; FUCHS, E. Beyond genetics: driving cancer with the tumour microenvironment behind the wheel. *Nature reviews cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00660-9>, 2024.

ZAIDI, M. R. The interferon-gamma paradox in cancer. *Journal of interferon & cytokine research*, 39(1), 30-38, 2019.

ZAPPAVIGNA, S., COSSU, A. M., GRIMALDI, A., BOCCHETTI, M., FERRARO, G. A., NICOLETTI, G. F., ... & CARAGLIA, M. Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2605, 2020.

ZHANG, T., MA, C., ZHANG, Z., ZHANG, H., & HU, H. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *MedComm*, 2(4), 618-653, 2021.

ZHAO et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 6:263, 2021.

ZHOU, F. Molecular mechanisms of IFN- γ to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *International reviews of immunology*, 28(3-4), 239-260, 2009.

9. APÊNCIDE A- PRODUÇÃO CIENTÍFICA (2019-2024)

Observational Study

Medicine®

OPEN

Angiolymphatic invasion and absence of koilocytosis predict lymph node metastasis in penile cancer patients and might justify prophylactic lymphadenectomy

Athienne D. M. T. do Nascimento, MA^a, Jaqueline D. Pinho, PhD^b, Antonio Augusto L. Teixeira Júnior, BSc^a, Joyce S. Lages^c, Fabrício M. Soares, MD^b, José Ribamar R. Calixto, PhD^d, Ronald W. P. Coelho, MD^e, Marta Regina C. Belfort, MA^b, Laudivan R. Nogueira, MD^e, Isabela W. da Cunha, PhD^f, Gyl E. B. Silva, PhD^{a,*}

Abstract

To analyze possible clinical-pathological parameters and predictors of lymph node metastasis and evaluate the impact of lymphadenectomy in the survival of these patients.

A retrospective study of patients diagnosed with penile cancer and submitted to regional lymphadenectomy at two reference hospitals in Maranhão, Northeast, Brazil, an area where the disease has a high incidence. We described here clinical and histopathological characteristics of patients diagnosed between January 2009 and September 2017.

Fifty-five patients with an average age of 55.4 years (range: 25–84 years) were analyzed, with 24.4 months being the average time between the onset of symptoms and start of treatment. Among patients without palpable lymph nodes at the first examination, 51% were affected by inguinal metastasis. In the multivariate analysis, the presence of angiolymphatic invasion ($P=0.029$) and absence of koilocytosis ($P=0.001$) were found to be predictive factors for lymph node metastasis. Patients submitted to prophylactic lymphadenectomy presented with a disease-free period of 25.4 months (± 5.81), whereas those who underwent therapeutic lymphadenectomy presented with a disease-free period of 19.9 months (± 3.12).

Angiolymphatic invasion and absence of koilocytosis appeared to be predictive factors for lymph node metastasis. Therefore, the submission of patients with metastatic risk to prophylactic lymphadenectomy may improve their survival. Thus, prophylactic lymphadenectomy in patients at risk for inguinal metastasis may create a positive impact in survival rates.

Abbreviations: AJCC – American Joint Committee on Cancer, EAU – European Association of Urology (EAU), HPV – Human Papillomavirus, PC – Penile cancer.

Keywords: lymphadenectomy, metastasis, penile cancer, predictor, survival

Editor: Jianxin Ding

The authors have no funding information to disclose.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

^aAdult Health (PPGSA), Federal University of Maranhão (UFMA), ^bLaboratory of Immunofluorescence and Electron Microscopy (LIME), ^cDepartment of Public Health, Presidente Dutra University Hospital (HUUFMA), ^dDepartment of Medicine II, Federal University of Maranhão (UFMA), ^eAlvarado Bello Cancer Hospital (HCAB), São Luís, MA, ^fAntonio Procheta Foundation, São Paulo, ^gDepartment of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil.

*Correspondence: Gyl E. B. Silva, Barão Itaperi Street, 227, 65020-070, São Luís, Maranhão, Brazil (e-mail: gylsilva@fmp.usp.br).

Copyright © 2020 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CC BY-NC), where it is permissible to distribute, share, remix, transform, and build upon the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

How to cite this article: Nascimento AD, Pinho JD, Júnior AA, Lages JS, Soares FM, Calixto JR, Coelho RW, Belfort MR, Nogueira LR, da Cunha IW, Silva GE. Angiolymphatic invasion and absence of koilocytosis predict lymph node metastasis in penile cancer patients and might justify prophylactic lymphadenectomy. *Medicine* 2020;99(6):e19128.

Received: 22 March 2019 / Received in final form: 17 December 2019 /

Accepted: 11 January 2020

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000019128>

1. Introduction

Penile cancer (PC) is diagnosed at different rates worldwide, and affects men with a frequency of 1/100,000 in the United States and 0.6/100,000 in the United Kingdom. In developing countries, Brazil presents high rates of PC, with a distribution of 2.9 to 6.8/100,000 inhabitants.^[1–3] Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common histological type of PC, accounting for 95% of all cases. Despite the etiology being unclear, some risk factors such as phimosis history, human papillomavirus (HPV) infection, tobacco, low socioeconomic conditions that culminate in precarious hygiene habits, and repeated penial excoriations can be highlighted.^[1,4]

Clinically, the disease has a slow onset, presenting superficial injuries that deepen into the penile tissue and invade the chorion, spongy tissue and corpora cavernosa. Lymph node involvement is the most important prognostic factor, given that the main route of tumor cells dissemination is the lymphatic vessel. However, there are still no parameters that can safely predict the lymph node status and ganglionic involvement.^[5]

The presence of palpable lymph nodes in the clinical evaluation of patients varies between 20% and 96%. However, the presence of lymph node hyperplasia and infections is very common, and can mislead the lymph node evaluation and clinical diagnosis of



Increased Glycated Hemoglobin Levels in Patients With *Helicobacter pylori* Infection Are Associated With the Grading of Chronic Gastritis

Selma Maluf^{1,2,3}, João Victor Salgado⁴, Dália Nunes Cysne⁵, Daniel Monte Freire Camelo³, Johnny Ramos Nascimento^{1,2}, Bianca Vitória T. Maluf⁶, Luis Douglas Miranda Silva¹, Marta Regina de Castro Belfort¹, Lucilene Amorim Silva^{2,5}, Rosane Nassar Meireles Guerra^{2,5}, Natalino Salgado Filho⁶ and Flávia Raquel F. Nascimento^{3,5*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Marina De Bernardi,
University of Padua, Italy

Reviewed by:

Holly Algood,
Vanderbilt University, United States
Marlo M. D'Elia,
University of Florence, Italy

*Correspondence:

Flávia Raquel F. Nascimento
nascimento.frf@yahoo.com.br

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 14 April 2020

Accepted: 05 August 2020

Published: 10 September 2020

Citation:

Maluf S, Salgado JV, Cysne DN,
Camelo DMF, Nascimento JR,
Maluf BVT, Silva LDM, Belfort MRC,
Silva LA, Guerra RNM,
Salgado Filho N and Nascimento FRF
(2020) Increased Glycated
Hemoglobin Levels in Patients With
Helicobacter pylori Infection Are
Associated With the Grading of
Chronic Gastritis.
Front. Immunol. 11:2121.
doi: 10.3389/fimmu.2020.02121

¹ Health Science Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ² Gastroenterology Service of the University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ³ Immunophysiology Laboratory, Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ⁴ Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ⁵ Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ⁶ Department of Medicine I, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

Background: Recent studies have found an association between *Helicobacter pylori* infection and prediabetes. Whether *H. pylori* per se or host factors are involved in the disturbance of glycated hemoglobin needs further investigation. The aim of this study was to determine the association of glycated hemoglobin levels with endoscopic diagnosis and the inflammatory response in *H. pylori* infection.

Methods: A cross-sectional study was carried out in 88 dyspeptic non-diabetic adults who underwent esophagogastroduodenoscopy. The diagnosis of *H. pylori* infection was performed through urease test and histopathological exam. Cases were initially distributed into two groups: control (without *H. pylori* infection, $n = 22$) and HP (patients with *H. pylori* infection, $n = 66$). HbA1c was measured to determine prediabetes status according to the American Diabetes Association criteria, and then the groups were subdivided into non-prediabetic ($n = 14$), prediabetic ($n = 8$), non-prediabetic HP ($n = 26$) and prediabetic HP ($n = 40$) groups. Gastric mucosa was histologically evaluated to determine *H. pylori* density and inflammatory activity according to Sydney System. To investigate the balance of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines we measured interleukin 10 (anti-inflammatory) and Tumor Necrosis Factor- α (pro-inflammatory) in the plasma or in the gastric mucosa.

Results: Patients with *H. pylori* infection had higher mean HbA1c levels than those without *H. pylori* infection. However, increased HbA1c levels were not associated with *H. pylori*-related factors but with the bacterial density, the intensity of inflammation and the activity of the chronic gastritis. In addition, *H. pylori* infection per se did not alter

Received: 7 October 2019 | Revised: 26 February 2020 | Accepted: 2 March 2020
DOI: 10.1002/mc.23185

RESEARCH ARTICLE

Molecular
Carcinogenesis WILEY

Genomic profiling reveals the pivotal role of hrHPV driving copy number and gene expression alterations, including mRNA downregulation of *TP53* and *RB1* in penile cancer

Juliana Macedo¹ | Elis Silva² | Leudivan Nogueira³ | Ronald Coelho³ |
Jenilson da Silva^{1,2} | Alcione dos Santos⁴ | Antônio Augusto Teixeira-Júnior⁵ |
Marta Belfort¹ | Gyl Silva⁵ | André Khayat⁶ | Edivaldo de Oliveira⁷ |
Ana Paula dos Santos⁸ | Luciane R. Cavalli^{9,10} | Silma Regina Pereira² 

¹Postgraduate Program in Health Science, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

²Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

³Aldenor Bello Cancer Hospital, São Luís, Maranhão, Brazil

⁴Public Health Department, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

⁵Biology Undergraduate Course, Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

⁶Oncology Research Center, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

⁷Tissue Culture and Cytogenetics Laboratory, Institute of Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil

⁸Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

⁹Faculdade Pequeno Príncipe, Instituto de Pesquisa Pele Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil

¹⁰Department of Oncology, Georgetown Lombardi Comprehensive Cancer Center, Washington, District of Columbia, United States

Correspondence

Silma Regina Pereira, Department of Biology,
Federal University of Maranhão, Avenida dos
Portugueses, 1966 Bacanga, CEP: 65080-805,
São Luís, Brazil.
Email: silma.pereira@yahoo.com.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa e ao
Desenvolvimento Científico e Tecnológico do
Maranhão, Grant/Award Numbers: 00973/17,
03352/16

Abstract

The incidence of penile cancer (PeCa) is increasing worldwide, however, the highest rates are reported in underdeveloped countries. The molecular mechanisms that underlie the onset and progression of these tumors are still unclear. Therefore, our goal was to determine the genome-wide copy number alterations and the involvement of human papilloma virus (HPV) (*TP53* and *RB1*), inflammatory (*COX2* and *EGFR*), and *PI3K/AKT* pathway (*AKT1*, *AKT2*, *EGFR*, *ERBB3*, *ERBB4*, *PIK3CA*, and *PTEN*) associated genes in patients with PeCa from a high incidence region in Brazil (Maranhão). HPV genotyping was performed by nest-PCR and genome sequencing. copy number alterations (CNAs) by array comparative genomic hybridization and gene copy number status, gene, and protein expression by quantitative polymerase chain reaction, reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction, and immunohistochemistry, respectively. HPV genotyping revealed one of the highest frequencies of HPV reported in PeCa, affecting 96.4% of the cases. The most common CNAs observed were located at the HPV integration sites, such as 2p12-p11.2 and 14q32.33, where

Abbreviations: aCGH, array comparative genomic hybridization; CNA, copy number alteration; Cq, quantification cycle; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; HPV, human papilloma virus; hrHPV, high risk HPV; IHC, immunohistochemistry; PCR, polymerase chain reaction; PeCa, penile cancer; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction; TMA, tissue microarray

RESEARCH ARTICLE

Editorial Process: Submission:06/17/2019 Acceptance:01/16/2020

MIR-107, MIR-223-3P and MIR-21-5P Reveals Potential Biomarkers in Penile CancerJaqueline Diniz Pinho^{1*}, Gyl Eanes Barros Silva², Antonio Augusto Lima Teixeira Júnior³, Marta Regina de Castro Belfort³, Juliana Melo Macedo⁴, Isabela Wernerck da Cunha⁵, Luciana Gonçalves Quintana², José de Ribamar Rodrigues Calixto⁶, Leudivan Ribeiro Nogueira⁷, Ronald Wagner Pereira Coelho⁸, André Salim Khayat⁹**Abstract**

Background: Inguinal lymph node involvement is the main prognostic factor in patients with penile cancer. However, there is a lack of marker/s for lymph node metastasis. microRNAs have been investigated as potential markers for prognosis of various types of cancer. Taking this into consideration, our main goal was to determine the association of *miR-223-3p*, *miR-107*, and *miR-21-5p* expression with clinicopathological characteristics, as well as presence of lymph node metastasis in patients with penile cancer. **Methods:** Formalin-fixed paraffin-embedded penile squamous cell carcinoma specimens from 50 patients, at diagnosis and prior to any cancer treatment, were obtained. Tissue samples comprising at least 70% malignant cells and adjacent non-tumor tissues were evaluated by using qRT-PCR for expression level of *miR-223-3p*, *miR-107* and *miR-21-5p*. Additionally, molecular identification of HPV was performed by PCR, and the expression levels of *PTEN* were analyzed by immunohistochemistry. **Results:** Penile squamous cell carcinoma primary tumors presented higher expression of *miR-223-3p*, *miR-107*, and *miR-21-5p* when compared to non-tumor adjacent tissues. Upregulation of *miR-223-3p* was associated lymph node metastasis. Higher expression of *miR-107* was associated with worsening of prognosis (as observed by histological grade II and III, tumors bigger than 2.0 cm, stage III and IV, and lower disease-free survival). In addition, higher expression of *miR-107* and *miR-21-5p* was correlated to the absence of *PTEN* protein expression. **Conclusions:** Our data demonstrate that higher expression of *miR-223-3p*, *miR-107*, and *miR-21-5p* is correlated with poor prognosis in penile cancer. The upregulation of these microRNAs potentially affect critical cancer pathways and may be important for the prognosis and response to therapy in penile cancer.

Keywords: miRNAs- prognosis- lymph node*Asian Pac J Cancer Prev*; 21 (2), 391-397**Introduction**

Penile cancer (PC) has a high incidence rate in developing countries such as Brazil (Coelho et al., 2018). The major risk factors for penile cancer are human papilloma virus infection and phimosis (Christoulidou et al., 2015). Moreover, owing to poor socio-economic factors, the diagnosis is delayed (Gao et al., 2016). Consequently, patients are usually diagnosed at an advanced stage, resulting in total or partial penectomy, and often present with regional lymph node metastasis and reduced survival (Protzel et al., 2009; Reis et al., 2011).

The factors of poor prognosis in patients with PC are: histological grade III and IV, advanced stage of tumor, vascular and perineural invasion, and lymph node involvement; the latter amongst these is considered the most relevant (Protzel et al., 2009). Treatment of PC involves lymphadenectomy, which is associated with post-surgical complications and high morbidity (O'Brien et al., 2017; Protzel et al., 2009). In addition, patients without diagnosable lymph nodes may present micro metastases (Leijte et al., 2007) and those with inguinal lymph node metastases have a disease-free survival rate of less than 40% for three years (Protzel et al., 2009).

¹Nucleus of Oncology Research, University Hospital João de Barros Barreto, ²Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, PA, ³Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, ⁴Antonio Prudente Foundation, São Paulo, ⁵Laboratory Immunofluorescence and Electron Microscopy, University Hospital Universitário Presidente Dutra, ⁶Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, ⁷Department of Medicine II, Federal University of Maranhão, ⁸Urologist at the Maranhense Institute of Oncology Aldenora Belo, ⁹Oncologist, Maranhense Institute of Oncology Aldenora Belo, São Luís, MA, Brazil. *For Correspondence: jackupinho@gmail.com



An Acad Bras Cienc (2021) 93(2): e20190652 DOI 10.1590/0001-376520210190652
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

DNA damage in an estuarine fish inhabiting the vicinity of a major Brazilian port

SOLANGE F. ALMEIDA, MARTA R.C. BELFORT, MARCO V.J. CUTRIM, LUIS F. CARVALHO-COSTA, SILMA R.F. PEREIRA & RICARDO LUVIZOTTO-SANTOS

Abstract: The Itaquí Port Complex (northeastern Brazil) is one of the largest Brazilian port facilities, whose effluents and waste are dumped directly into the estuarine waters. Although environmental monitoring has been a concern around this site, there has been no toxicogenetics study on organisms living in this environment. Thus, we assessed the toxicogenetics potential of the estuarine waters surrounding Itaquí, using the native catfish *Sciades herzbergii* as a biomonitor. We found a significantly higher frequency of genetic damage and mutations in the animals collected near to Itaquí in both seasons compared to the reference site (distant from Itaquí with no port activities). We also quantified chemical elements in the surface water and sediments near the port and found that chlorine, phosphorus, zinc, and boron were above the limits set by the Brazilian legislation. We suggest that such contaminants are involved in the origin of DNA damage. Moreover, we recommend including toxicogenetics assays in the environmental monitoring of pollutants, as well as in the definition of their allowable limits, as they could be used as law enforcement tools and help to predict large-scale contamination events associated with port activities.

Key words: Comet assay, estuary contamination, Itaquí Port, micronucleus test, *Sciades herzbergii*.

INTRODUCTION

Historically, coastal environments such as estuaries have been the main sites for human settlement. Such a preference imposes a large number of stressors on these areas, with chemical-derived xenobiotics posing the most important threat to the biota (Martins & Costa 2015). Xenobiotics are chemical element(s) or compound(s) found in an organism but that is not naturally produced or expected to be present, and can initiate a cascade of harmful consequences to cells, organs, the organism as a whole and even the population and entire communities (Amado et al. 2006, Grisolia et al. 2009).

One of the possible outcomes of xenobiotics is damaging the genetic material of organisms, in that many contaminants might have mutagenic and/or carcinogenic effects (Arsian et al. 2010), even at low concentration. Thus, toxicogenetics assays are highly effective methods for evaluating the impact of environmental contamination (Scalon et al. 2010, Martins & Costa 2015), especially considering that many substances released into natural environments (and their resulting metabolites) have not had their potential impacts been fully characterized yet (Van der Oost et al. 2003). For instance, genotoxic and mutagenic effects have been described in animals exposed to estuarine environments near ports (e.g., Barsiene 2002, Domingos et al. 2009, Barsiene et al. 2012).



Original Article

Downregulation of miR-145 is associated with perineural invasion in penile carcinoma

Jaqueline Diniz Pinho^{1,2,3}, Gyl Eanes Barros Silva^{2,4}, Antonio Augusto Lima Teixeira Júnior^{2,5}, Marta Regina de Castro Belfort², Juliana Melo Macedo Mendes², José de Ribamar Rodrigues Calisto⁶, Leudivan Ribeiro Nogueira⁷, Rommel Rodriguez Burbano⁸, André Salim Khayat³

¹University State of Maranhão, Zé Doca, MA, Brazil; ²Laboratory of Immunofluorescence and Electron Microscopy, Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA), São Luís, Brazil; ³Núcleo de Pesquisa em Oncologia, João de Barros Barreto University Hospital, Belém, PA, Brazil; ⁴Department of Pathology, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ⁵Departamento de Genética, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ⁶Department of Medicine II, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil; ⁷Doctor, Urologist at the Maranhense Institute of Oncology Adenora Belo (IMOAB), São Luís, Brazil; ⁸Ophir Loyola Hospital, Belém, PA, Brazil

Contribution: (I) Conception and design: JD Pinho, GEB Silva, AAL Teixeira Júnior; (II) Administrative support: AAL Teixeira Júnior, JD Pinho, MRC Belfort; (III) Provision of study materials or patients: MRC Belfort, JMM Mendes, AAL Teixeira Júnior, JRR Calisto, LR Nogueira; (IV) Collection and assembly of data: JD Pinho, AAL Teixeira Júnior, MRC Belfort; (V) Data analysis and interpretation: JD Pinho, GEB Silva, AS Khayat, RR Burbano; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: Jaqueline Diniz Pinho. Laboratory Immunofluorescence and Electron Microscopy, University Hospital Universitário Presidente Dutra, R. Barão de Itapari, 227-Centro, São Luís, MA, 65020-070, Brazil. Email: jackdpinho@gmail.com

Background: Human papillomavirus (HPV) infection is a risk factor for penile cancer (PC). The miR-145 expression has been correlated to this virus genomic amplification. In this context, this work aims to determine the expression level of miR-145 in penile tumors infected by high-risk HPV and correlate it with the clinicopathological characteristics of the tumor and protein expression of p53.

Methods: Formalin-fixed paraffin-embedded from 52 patients with PC, at diagnosis and prior to any cancer treatment, were obtained. HPV identification was performed by nested type PCR, and miR-145 expression was obtained by qRT-PCR. Immunohistochemical analysis of p53 and Ki-67 was performed.

Results: Tumoral miR-145 expression was significantly lower compared to adjacent tissue. Additionally, there was a significant reduction of miR-145 expression in invasion perineural, histological associated HPV, and absence of p53 expression in positive HPV cases. HPV infection was detected in 86.5%, the most frequent HPV16. Reduced disease-free survival was observed in patients with low expression of miR-145.

Conclusions: Our data suggest that the underexpression of miR-145 may be triggered by HPV action, decreasing protein expression of p53, and being correlated with perineural invasion. Therefore, the deregulation of miR-145 provides clues as to the potential role in penile carcinogenesis and is also a potential candidate for validation in noninvasive samples.

Keywords: miR-145; human papillomavirus (HPV); penile cancer (PC); perineural invasion

Submitted Oct 29, 2020. Accepted for publication Feb 22, 2021.

doi: 10.21037/tam-20-1378

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/tam-20-1378>

Introduction

Penile cancer (PC) represents a public health problem, due to its high incidence, especially in countries such as Asia, Africa, and South America. Brazil has one of the highest incidence of PC in the world, with 2.9–6.8 per 100,000

inhabitants (1). The etiology of PC remains inconclusive in several aspects, but some risk factors have been associated with this malignant neoplasm. Among them, we highlight the lack of personal hygiene and infection by human papillomavirus (HPV), phimosis with chronic inflammation,

RESEARCH

Open Access



A comprehensive analysis of penile cancer in the region with the highest worldwide incidence reveals new insights into the disease

Antonio Augusto Lima Telxela Júnior^{1,2}, Syomara Pereira da Costa Melo³, Jaqueline Diniz Pinho⁴, Thais Bastos Moraes Sobrinho³, Thalita Moura Silva Rocha^{2,3}, Denner Rodrigo Diniz Duarte³, Liseana de Oliveira Barbosa³, Wesleyany Everton Duarte^{2,3}, Marta Regina de Castro Belfort^{3,5}, Kelly Gomes Duarte⁶, Antonio Lima da Silva Neto³, José de Ribamar Rodrigues Calixto⁷, Lúcio Cristiano Palva Palva³, Francisco Sérgio Moura Silva do Nascimento⁷, Antonio Machado Alencar Junior^{5,7}, André Salim Khayat⁸, Rita da Graça Carvalhal Frazão Corêa⁷, Joyce Santos Lages⁷, Rodolfo Borges dos Reis⁶, Wilson Silva Araújo Jr¹ and Gyl Eanes Barros Silva^{2,3,9*}

Abstract

Background: Although penile cancer (PC) is uncommon in developed countries, it is widespread in developing countries. The state of Maranhão (Northeast, Brazil) has the highest global incidence recorded for PC, and, despite its socioeconomic vulnerability, it has been attributed to human papillomavirus (HPV) infection. This study aimed to determine the histopathological features, the prevalence of HPV infection, and the immunohistochemical profile of PC in Maranhão.

Methods: A retrospective cohort of 200 PC cases were evaluated. HPV detection was performed using nested-PCR followed by direct sequencing for genotyping. Immunohistochemistry (IHC) was performed using monoclonal antibodies anti-p16^{INK4a}, p53, and ki-67.

Results: Our data revealed a delay of 17 months in diagnosis, a high rate of penile amputation (96.5%), and HPV infection (80.5%) in patients from Maranhão (Molecular detection). We demonstrated the high rate of HPV in PC also by histopathological and IHC analysis. Most patients presented koilocytosis (75.5%), which was associated with those reporting more than 10 different sexual partners during their lifetime ($p = 0.001$). IHC revealed frequent p16^{INK4a} over-expression (26.0%) associated with basaloid ($p < 0.001$) and high-grade tumors ($p = 0.008$). Interestingly, p16 appears not to be a better prognostic factor in our disease-free survival analysis, as previously reported. We also demonstrated high ki-67 and p53 expression in a subset of cases, which was related to worse prognostic factors such as high-grade tumors, angiolymphatic and perineural invasion, and lymph node metastasis. We found a significant impact of high ki-67 ($p = 0.002$, log-rank) and p53 ($p = 0.032$, log-rank) expression on decreasing patients' survival, as well as grade, pT, stage, pattern, and depth of invasion ($p < 0.05$, log-rank).

*Correspondence: gylsilva@ufma.br

²Laboratory of Immunofluorescence and Electron Microscopy, University Hospital of the Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

10. ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Av. dos Portugueses, 1966, - Bairro Vila Bacanga, São Luís/MA, CEP 65080-805
Telefone: (98) 3272-8000 - <https://www.ufma.br>

Certificado Eletrônico nº 0943342/2024/CEUA/CCBS

NUP 23115.006978/2024-79.



CERTIFICADO



CIAEP: 02.0341.2019

Certificamos que a proposta intitulada: **"Estudo do extrato de *Fridericia platyphylla* em modelo ascítico de tumor De Ehrlich"**, Processo n. 23115.006978/2024-79, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 07/03/2024.

We certify the proposal: **"Study of *Fridericia platyphylla* extract in an ascitic model of Ehrlich tumor"**, Process n. 23115.006978/2024-79, under the responsibility of **Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho**, which involves the production, maintenance, or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) for scientific research purposes (or teaching) - is following Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 03/07/2024.