



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA *Carapa guianensis*  
(ANDIROBA) SOBRE O TUMOR DE EHRLICH SÓLIDO: ENSAIO *in vivo***

São Luís  
2016

**ANDERSON CÁSSIO CAMPELO COSTA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA *Carapa guianensis*  
(ANDIROBA) SOBRE O TUMOR DE EHRLICH SÓLIDO: ENSAIO *in vivo***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Medicina  
Veterinária da Universidade Estadual do  
Maranhão, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em  
Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

São Luís  
2016

Costa, Anderson Cassio Campelo

Avaliação da atividade antitumoral da *Carapa guianensis* (Andiroba) sobre o tumor de *Ehrlich sólido* : ensaio in vivo / Anderson Cássio Campelo Costa–São Luís, 2016.

48 f

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinaria , Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientador: Profª Drª Ana Lúcia Abreu Silva

1.Andiroba.2.Ehrlich.3. Antitumoral.I.Título

CDU: 615.272.3:599.323.4:665.3

**ANDERSON CÁSSIO CAMPELO COSTA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA *Carapa guianensis*  
(ANDIROBA) SOBRE O TUMOR DE EHRLICH SÓLIDO: ENSAIO *in vivo***

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

**Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva**  
**Orientadora**

---

**Profa. MSc. Alessandra Lima Rocha**  
1º Membro

---

**Prof. Dr. Fábio Henrique Evangelista de Andrade**  
2º Membro

A Deus, por permitir a realização deste sonho.

À minha família, pela compreensão, apoio e incentivo.

Aos meus amigos, por toda amizade, ajuda e companheirismo.

Aos animais, minhas fontes de inspiração e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter me permitido viver todas as circunstâncias e conhecer tantas pessoas, essenciais para que eu superasse os desafios expostos e conseguisse realizar este grande sonho.

Aos meus pais, Carlos e Antonia, por terem me dado toda a base necessária e terem compartilhado desta importante realização.

A professora Ana Lúcia Abreu Silva e ao professor Fábio pela confiança, amizade, apoio e incentivo, e principalmente por ter acreditado em mim.

A Alessandra pela co-orientação, apoio e disposição em ajudar ao próximo.

Aos amigos, em especial a Carol, Higor, Aarão, Allana e Raquel por toda a ajuda ao decorrer deste trabalho, pela amizade e por toda motivação para seguir em frente.

Aos amigos do IFMA, Helaine, Nubiane, Evelyn, Kalyl, Stheffane, Periandro, Waldenir e Jefferson, pela amizade, motivação, apoio e pela inspiração que são para mim.

As minhas amigas Nathalia, Joicy Cortez, Renata, Isadora, Nathalia, Tatiane, Ranyelle, Gabriela e Iara, pela amizade, ajuda e conselhos dados ao decorrer do trabalho.

A Mylena Torres, por sempre me apoiar, ajudar, por ser uma grande amiga.

Aos amigos do Laboratório de Anatomopatologia Douglas, Sarah, Eslen, Isabel, Joana e Alcindo pelo apoio e companhia.

Aos meus amigos de turma em especial a Vanessa Luz, Carol Mendes, Luara Farias, Valéria Martins e Thamires Coelho pela amizade e companheirismo durante esses 5 anos de graduação.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou  
o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou  
o que era antes”.*

(Marthin Luther King)

## RESUMO

*Carapa guianensis* Aublet, da família Meliaceae, é uma árvore medicinal amplamente conhecida e utilizada pelas comunidades da região da Mata Amazônica. Entretanto, existem poucos estudos relacionando *Carapa guianensis* e o tratamento do câncer, fazendo-se necessárias novas pesquisas para ajudar a compreender o potencial antineoplásico dessa planta. Dessa forma, esse trabalho objetiva avaliar a atividade antitumoral da *Carapa guianensis in vivo* em camundongos Swiss inoculados com células neoplásicas do Tumor de Ehrlich Sólido, através de avaliações das alterações patológicas e da expressão de COX-2 na massa tumoral. Para o ensaio terapêutico, os animais foram divididos em sete grupos: um grupo controle, 3 grupos tratados com soluções de óleo de andiroba em diferentes concentrações, e 3 grupos tratados com preparados de PBS e/ou emulsificante (Tween-20). Os animais foram eutanasiados, para retirada da lesão primária e de órgãos, os quais foram processados para histopatologia e imunohistoquímica. A análise histológica revelou a presença de alterações patológicas em rim, baço e fígado em animais de todos os grupos estudados. Quanto a avaliação do coxim plantar, todos os grupos tratados apresentaram algum grau de necrose, angiogênese, invasividade e de infiltrado inflamatório. Portanto, nessas condições experimentais, as soluções em diferentes concentrações de óleo de *Carapa guianensis* não demonstraram atividade antineoplásica.

**Palavras-chave:** Andiroba, Ehrlich, Antitumoral

## ABSTRACT

*Carapa guianensis* Aublet, of the family Meliaceae, is a medicinal tree widely known and used by the communities of the region of the Amazon Forest. However, there are few studies related to *Carapa guianensis* and cancer treatment, requiring further research to help understand the antineoplastic potential of this plant. Thus, this work aims to evaluate the anti-tumor activity of *Carapa guianensis* in vivo in Swiss mice inoculated with neoplastic cells of Solid Ehrlich Tumor, through evaluations of pathological changes and COX-2 expression in the tumor mass. For the therapeutic trial, the animals were divided into seven groups: a control group, 3 groups treated with solutions of andiroba oil in different concentrations, and 3 groups treated with PBS and / or emulsifier (Tween-20) preparations. The animals were euthanized for removal of the primary lesion and organs, which were processed for histopathology and immunohistochemistry. Histological analysis revealed the presence of pathological alterations in the kidney, spleen and liver in animals of all the studied groups. Regarding the evaluation of the plantar cushion, all the treated groups showed some degree of necrosis, angiogenesis, invasiveness and inflammatory infiltrate. Therefore, under these experimental conditions, the solutions at different concentrations of *Carapa guianensis* oil did not demonstrate antineoplastic activity.

**Key words:** Andiroba, Ehrlich, Antitumor

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Alterações histopatológicas no rim e fígado de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. 34
- Figura 2:** Análise histopatológica do coxim plantar de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. 36
- Figura 3:** Marcação para COX-2 na pata de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. 37

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Avaliação ponderal dos animais dos grupos controle e tratados com ciclofosfamida, soluções de óleo de *C. guianensis* nas concentrações de 125, 250, 500 mg do dia 0 ao 14º dia de tratamento. 32
- Tabela 2:** Avaliação do volume tumoral dos camundongos tratados com quimioterápico (ciclofosfamida), PBS, PBS+Tween-20, soluções do óleo nas concentrações de 125, 250,500mg e o grupo sem tumor. 33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µm	Micrometro
µg/MI	Micrograma por mililitro
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
H	Hora
HE	Hematoxilina e Eosina
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Major Histocompatibility Complex
MI	Mililitro
Mg	Miligrama
mg/g	Miligrama por grama
n°	Número
NK	Natural killer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PNPMF	Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos
spp.	Espécies
TAE	Tumor Ascítico de Ehrlich
TSE	Tumor Sólido de Ehrlich
WHO	World health organization

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Câncer .....	15
2.2 Modelo experimental animal .....	16
2.3 Tumor de Ehrlich .....	17
2.4 Plantas Medicinais .....	18
2.5 Família Meliaceae .....	21
2.6 <i>Carapa guianensis</i> .....	21
2.7 Composição do óleo de <i>C. guianensis</i> .....	22
2.8 Cicloxigenase como marcador tumoral .....	23
3. JUSTIFICATIVA .....	25
4. OBJETIVOS .....	26
4.1 Objetivo geral .....	26
4.2 Objetivo específico .....	26
5. METODOLOGIA .....	27
5.1 Obtenção do óleo da semente de <i>C. guianensis</i> (andiroba) .....	27
5.2 Elaboração das concentrações do óleo de andiroba .....	27
5.3 Animais .....	27
5.3.1 Indução do tumor e ensaio terapêutico .....	28
5.4 Necropsia e coleta de órgãos .....	29
5.5 Marcação de proliferação celular por técnica de imuno-histoquímica e coloração de HE .....	29
5.7 Análise estatística .....	29
6. RESULTADOS .....	31
6.1 Composição do óleo de andiroba ( <i>C. guianensis</i> ) .....	31
6.2 Avaliação ponderal .....	31
6.3 Volume Tumoral .....	32
6.4 Avaliação histopatológica de rim, fígado e baço .....	33
6.5 Avaliação histológica do coxim plantar .....	34
6.5.1 Coloração de HE .....	34
6.5.2 Imunohistoquímica por COX-2 .....	35
7. DISCUSSÃO .....	37
8. CONCLUSÃO .....	39
REFERENCIAS .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

*Carapa guianensis* é uma árvore de folhas perenes, pertencente à família Meliaceae, encontrada na região amazônica e nos solos úmidos do Amapá, Pará e Bahia. Essa planta pode chegar até 60 metros de altura, tendo como principais produtos explorados a madeira e o óleo extraído das sementes (PINTO et al., 2013; SAMPAIO, 2000).

O óleo de andiroba tem atraído a atenção das indústrias farmacêuticas e cosméticas, devido suas propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias, acaricidas e vermícidas. Além disso, a andiroba é utilizada na fabricação de sabonetes, shampoos e velas medicinais, e os resíduos destes processamentos podem ser aproveitados na fabricação de repelentes, principalmente contra os mosquitos *Anopheles*, transmissor da malária, e *Aedes aegypti*, transmissor da dengue (AMARAL, 2013; FARIAS, 2009; FARIAS, 2010). Estudos sobre a análise fitoquímica da *Carapa guianensis* revelam compostos como limonóides, carapanolides e guianolides A e B a partir do óleo de semente (SAKAMOTO et al., 2015; MIYAKE et al., 2015).

A descoberta de substâncias naturais com ação específica para certos tipos de tumores, é efetivamente útil para quimioprevenção e para a quimioterapia de neoplasias malignas ou câncer (RAHNAMA et al., 2014). O câncer é uma das maiores causas de mortalidade no mundo, podendo ser tratado com quimioterápicos e radioterápicos, que apresentam efeitos colaterais indesejáveis e suas respostas terapêuticas podem ser insatisfatórias (ZUANAZZI e MAYORGA, 2010).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específica e corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongos fêmea. Várias linhagens de camundongos desenvolvem a forma ascítica, quando inoculado intraperitonealmente, e na forma sólida, quando inoculado no subcutâneo (EHRLICH, 1906). Tem sido utilizado no estudo da ação de componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, citogenética e terapêutica de células tumorais (SEGURA et al., 2000; MADY, 2002; PALERMO-NETO et al., 2003; SILVA, 2003).

A vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo (STEWART et al., 1959). Desta forma, há um incentivo na busca de drogas que apresentam uma eficiência antitumoral, com baixa toxicidade, e com menos efeitos colaterais (ZUANAZZI & MAYORGA, 2010).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Câncer**

As neoplasias malignas podem ser desencadeadas por diferentes fatores de risco e atualmente muitos deles já têm seu papel bem estabelecido no desempenho em sua etiologia. É uma doença multifatorial, que está relacionada a causas ambientais, culturais, socioeconômicos, estilos de vida ou costumes. Os hábitos alimentares, o tabagismo, fatores genéticos e o próprio processo de senescência também estão associados à patogênese dessa doença (PETO, 2001; JEMAL et al., 2010; BRAY et al., 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2030 a estimativa global para novos casos de câncer será de 21.4 milhões e 13.2 milhões de casos de morte, como resultado do aumento da densidade populacional, bem como de sua expectativa de vida. Os dados epidemiológicos mostram que houve aumento significativo de novos casos de neoplasia, tornando-a a segunda principal causa de morte na maioria dos países (HOYERT & XU, 2012).

Oliveira et al (2015) mostraram em inquérito para Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil (com dados de 2013) que o câncer de próstata foi o mais referido entre os homens; entre as mulheres, o câncer de mama foi o mais prevalente.

O câncer de mama representa um relevante problema de saúde pública devido a sua alta incidência e mortalidade no mundo (FELDEN & FIGUEIREDO, 2011). É a neoplasia mais frequente entre as mulheres, tendo sido estimado 1.67 milhões de casos novos em 2012, o que representa 25% de todos os casos de neoplasias entre mulheres no mundo (IARC, 2012).

No Brasil, excluindo o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é mais frequente entre as mulheres. Em 2016, foram estimados 57.960 casos novos de câncer de mama, com incidência de 56,20 casos a cada 100.000 mulheres (BRASIL, 2015). Nos Estados Unidos, segundo a American Cancer Society, a incidência média de câncer de mama no período de 2007 a 2011 foi de 122,8/100.000 mulheres.

## **2.2 Modelo experimental animal**

Incontáveis esforços foram empregados nos últimos tempos para a compreensão do processo de origem do câncer. Apesar de muitos estudos poderem ser conduzidos *in vitro*, como em linhagens celulares, os modelos animais oferecem uma enorme gama de possibilidades na pesquisa científica (MATHÉ, 1995) e em aulas práticas (CARLINI, 1973).

Vários modelos animais foram estudados nas últimas décadas com o intuito de compreender as questões relacionadas ao câncer. É indiscutível que o grupo específico usado nas pesquisas apresente características positivas para os pesquisadores, onde alguns animais foram estabelecidos como pertencentes à categoria das espécies convencionais de laboratório como os camundongos, ratos, hamsters, cobaias e coelhos. O modelo animal a ser escolhido deve ser aquele que melhor responda ao experimento e possibilite sua reprodução, de maneira que qualquer pesquisador possa ter acesso aos mesmos resultados.

A maior utilização dos camundongos como modelo experimental ocorre de modo mais intenso, principalmente nas áreas de imunologia, oncologia, genética, embriologia e nutrição. Essa ampla utilização dos camundongos se deve principalmente a sua prolificidade, fácil manejo, biologia e genoma conhecidos e manutenção pouco onerosa, além do fato de compartilharem similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos, permitindo que múltiplas características da doença sejam estudadas nestes modelos. Dessa forma, são utilizados milhões de camundongos a cada ano para pesquisas sobre câncer

O desenvolvimento de terapias efetivas contra o câncer é um objetivo importante e presente nas pesquisas médicas. O estudo de modelos revela as interações entre as células tumorais e o seu ambiente, onde a progressão tumoral e a metástase são promovidas e influenciadas. Por tanto, o

conhecimento acumulado, a partir do estudo de modelos animais, permitiu superar obstáculos e avançar em uma ampla gama de estudos. Esses modelos caracterizam métodos poderosos para permitir o desenvolvimento de drogas específicas para o tratamento de pacientes com câncer.

### **2.3 Tumor de Ehrlich**

Para o combate ao câncer se torna cada vez mais importante o estudo de novas substâncias, sendo a forma mais adequada a utilização de tumores experimentais como o tumor de Ehrlich, o qual desponta como uma boa alternativa à testagem de substâncias com esse objetivo (OLIVEIRA et al. 1998).

O tumor de Ehrlich (TE) é uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial, que corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas. Foi transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906 (SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006), daí a sua denominação. Possui características que o torna importante ferramenta para a oncologia experimental, pois apresenta extensas áreas de necrose, alto índice mitótico, invasivo, e fácil manuseio empírico (DAGLI, 1989).

Pode-se afirmar que o tumor de Ehrlich, por ser um dos primeiros tumores transplantáveis conhecidos, é o mais extensamente utilizado para experimentação (GUERRA,1983). Pode sofrer as influências dos hormônios envolvidos na gênese do câncer de mama, como estrógeno, prolactina, andrógenos e até mesmo dos hormônios tireoideanos.

O tumor de Ehrlich se desenvolve com duas variáveis de comportamento, de conformidade com o local do implante. Quando a inoculação de suas células é feita na cavidade peritoneal, este cresce em suspensão, traduzindo-se na forma ascítica do referido tumor. Contudo, quando a inoculação de células é feita no tecido celular subcutâneo ou no coxim do animal, este se desenvolve sob a forma sólida (TSE). Por essa razão é que se justifica a denominação, habitualmente usada de forma sólida (TSE) ou ascítica (TAE) do tumor (GUERRA,1983). A primeira, por sua vez, constitui uma eficiente ferramenta na investigação de drogas antineoplásicas (AWARA, et al., 2004; ELMORSI et al., 2013; KABEL et al., 2015).

Segundo Dagli (1989) a avaliação histológica do tumor de Ehrlich na forma sólida pode ser descrita como: células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais. As células tumorais são arredondadas, com limites celulares distintos, citoplasma escasso, núcleo central redondo ou ovóide, denso e pleomorfismo celular evidente. O arranjo destas células simula paliçadas, entretanto na maioria das vezes, estas se distribuem desordenadamente em um estroma formado de fibras colágenas e delicados capilares (GUERRA,1983).

Este tumor é considerado pouco imunogênico por não expressar MHC de classe II durante o seu crescimento, o que leva a baixa resposta de linfócito T a mitógenos e a uma progressiva perda na atividade de célula NK do baço. Além disso, o tumor na forma sólida induz a uma acentuada esplenomegalia, hematopoiese esplênica e desenvolvimento de células supressoras (BERGAMISANTOS et al., 2004; SEGURA et al., 1997; MORALES et al., 1999).

As vantagens da utilização de neoplasias transplantáveis, está relacionada com o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais, bem como com o tempo de estudo, o qual fica minimizado devido ao desenvolvimento rápido da neoplasia (OZASLAN et al., 2011). A forma sólida, depois de aproximadamente sete dias de implante apresenta-se como uma massa palpável, de consistência firme, coloração esbranquiçada, aspecto homogêneo e brilhante, pouco aderente aos planos profundo e relativamente móvel. Apresenta, também, extensas áreas de necrose, oriundas da morte de células neoplásicas, a qual é bastante intensa já na primeira semana pós-inoculação.

## **2.4 Plantas Medicinais**

São considerados medicamentos fitoterápicos aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas (BRASIL, 2010). Apesar da grande diversidade vegetal no mundo seu emprego como recursos terapêuticos ainda é

subutilizado; das 300 mil plantas conhecidas atualmente, somente 2000 são utilizadas pela medicina (PALHARIN et al., 2008).

No Brasil, conhecido internacionalmente como detentor da maior reserva florestal diversificada do planeta, tem se destacado o Estado do Maranhão, não somente por possuir densa flora diversificada, mas ainda pela tradição em pesquisa de plantas medicinais, possuindo herbário próprio com produção artesanal de diversos produtos (MALAFAIA et al., 2006).

Dessa forma, a matéria vegetal têm sido e continuará por muito anos sendo uma importante fonte de novos agentes terapêuticos, ressaltando o crescente enfoque no potencial antiinflamatório (GHOSH et al., 2010), antiproliferativo (MESQUITA et al., 2009; YU et al., 2011) e anticancerígeno das plantas (GOUN et al., 2002; NEWMAN et al., 2002). Neste contexto, o reino vegetal é uma alternativa medicinal com uma fonte potencial de compostos bioativos que podem desempenhar atividades antitumorais (ARANJANI et al., 2013), além de representar uma terapia de baixo custo, natural e de fácil acesso (MORAES, et al. 2011).

Nas últimas décadas os produtos naturais têm sido o pilar da quimioterapia para o tratamento do câncer (BARBERENA et al., 2004). Mais de 70% das drogas antineoplásicas aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (agência de vigilância de drogas e alimentos nos EUA) têm sua origem de plantas, tradicionalmente usadas como remédios antigos para várias moléstias. A identificação de compostos biologicamente ativos de plantas medicinais tornou-se uma área da pesquisa farmacêutica em constante expansão. Essa motivação surgiu porque os tratamentos atuais de doenças malignas e inflamatórias eventualmente são pouco eficazes. Ainda que a quimioterapia permaneça como estratégia convencional para o tratamento de câncer, muitas vezes os tratamentos são comprometidos devido a quimioresistência de determinados tipos de cânceres (WONG et al., 2012).

Outros fatores indesejáveis da terapia antineoplásica são os efeitos adversos, quase sempre relacionados a uma estreita janela terapêutica, à múltipla resistência farmacológica e às similaridades morfológicas e fisiológicas entre células normais e alteradas, o que torna muito difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento, principalmente, para pacientes no estágio avançado da doença, quando estes efeitos podem superar os benefícios e o aumento da

sobrevida não é acompanhado pela melhora da qualidade de vida (KAMB, 2005; SOUZA et al., 2007).

Apesar disso, os principais mecanismos utilizados pela medicina atual no tratamento de neoplasias malignas são a radioterapia e a quimioterapia, associadas ou não às cirurgias. Sendo que o melhor tratamento para cada paciente dependerá da característica do tumor, sua localização, tamanho, presença ou não de metástase (ONCO HEMATOS, 2013).

Logo, a demanda por métodos alternativos para o tratamento do câncer continua muito alta e estudos em diferentes linhagens celulares, em modelos animais e ensaios epidemiológicos humanos, sugerem um papel de proteção de um grande número de moléculas vegetais contra diferentes tipos de cânceres (FERREIRA et al., 2011; LIU et al., 2013; ULLAH et al., 2014).

Aproximadamente 60% dos fármacos antineoplásicos descobertos no século XX são de origem de metabólicos naturais. A maioria desses quimioterápicos usados no tratamento do câncer foi selecionada por apresentarem a capacidade de controlar a proliferação celular e novos estudos identificaram fármacos com atividade específica contra mecanismos metabólicos da célula tumoral e inibição da neovascularização tumoral, levando a célula a apoptose (COSTA-LOTUFO et al., 2010). O desenvolvimento de novos recursos medicamentosos para o tratamento desta doença utilizando plantas medicinais tem sido uma alternativa para os especialistas da área, a fim de promover a eficácia e o controle de tumores primários assim como as metástases (KUMMAR, 2004).

Segundo Fukumasu et al. (2008), algumas plantas têm demonstrado efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos, porém um sério problema ocorre quando pacientes realizam uso destas simultaneamente com medicamentos prescritos por especialistas, o que pode promover interações medicamentosas perigosas.

As principais espécies de plantas utilizadas para o desenvolvimento de anticancerígenos de acordo com a literatura são: *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), *Taxus baccata* L. (Taxaceae), *Catharanthus roseus* L. G. Don. (Apocynaceae), *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae), *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae), *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) e *Capraria biflora* L, que originaram os medicamentos paclitaxel e docetaxel, vincristina e

vimblastina, irinotecan e topotecan, etoposídeo e teniposídeo, piplartina e biflorina, respectivamente. Sendo os principais alvos destes fármacos, os microtúbulos, o ciclo celular e as tubulinas celulares, promovendo a interrupção do ciclo celular, desencadeando a apoptose. Contudo, a utilização de extratos naturais para a produção de fármacos é assegurada pela legislação e apresentam resultados satisfatórios no tratamento do câncer (FREIRE E ALVES, 2014).

A utilização de fitoterápicos e plantas medicinais é assegurada pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), por meio do Decreto nº 5.813 do ano de 2006, a fim de garantir à população segurança e o uso consciente de plantas, medicinal e fitoterápico (ANVISA, 2013).

## **2.5 Família Meliaceae**

Plantas da família Meliaceae têm sido submetidas a estudos fitoquímicos por apresentarem metabólitos secundários com estruturas diversificadas e com atividades biológicas significativas, principalmente os pertencentes à classe dos limonoides (TAN e LIO, 2011). Essa família é constituída por 50 gêneros e cerca de 600 espécies, possui distribuição em praticamente todas as regiões tropicais (SOUZA; LORENZI, 2012). Pode também ser encontrada nos subtropicais em ambos os hemisférios, ocorrendo em habitat de florestas chuvosas e inundadas, bem como em ambientes secos (MUELLNER et al., 2006). No Brasil ocorrem seis gêneros e aproximadamente 80 espécies (SOUZA; LORENZI, 2012).

## **2.6 *Carapa guianensis***

*Carapa guianensis* é uma árvore amplamente conhecida e utilizada como planta medicinal na região da Mata Amazônica. No Brasil, ela é conhecida popularmente como andiroba, carapa e carapinha (CORRÊA, 1984). A maioria dos autores acredita que esta árvore é uma espécie predominante de áreas úmidas, no entanto também é encontrada em regiões de clima seco (PENNINGTON, 1981; McHARGUE E HARTSHORN, 1983; FOURNIER, 2003). Sua distribuição ocorre no oeste da Índia, Antilhas, América Central, Sul de

Honduras, muitas partes da Região Amazônica e África Tropical (SMITH, 1965; PENNINGTON, 1981; McHARGUE E HARTSHORN, 1983).

Quando na fase adulta, *C. guianensis* é uma árvore de madeira rígida, de média a larga proporção. Pode atingir 2 metros de diâmetro e até 50 metros de altura (PENNINGTON, 1981; McHARGUE E HARTSHORN, 1983). Seus frutos constituem-se de cápsulas esféricas de fibra seca deiscente com quatro valvas, cada uma contendo de uma a quatro sementes (SMITH, 1965; McHARGUE E HARTSHORN, 1983; SAMPAIO, 2000).

Das sementes de ambas as espécies desse gênero, *Carapa guianensis* e *C. procera*, é extraído o conhecido óleo de andiroba, frequentemente sem se certificar de qual espécie de *Carapa* o óleo foi extraído. Dessa forma, a *Carapa guianensis* (Meliaceae) é valorizada tanto pela alta qualidade do óleo extraído de suas sementes (SHANLEY E MEDINA, 2005) quanto por ser uma considerável fonte de madeira (DAYANADAN et al., 1999).

O óleo puro das sementes de andiroba (*C. guianensis*) tem sido usado com propósitos médicos (RODRIGUES, 1989), e em produtos como sabonetes, xampus e repelente de insetos (BOUFLEUER, 2001; SHANLEY E MEDINA, 2005). Esse extrato é amplamente utilizado na medicina popular, principalmente no controle inflamatório e da dor (AMBROZIN et al., 2006; TAPPIN, et al., 2008).

Em estudos científicos, o óleo de andiroba apresentou atividade inseticida frente ao *Aedes aegypti* (MENDONÇA et al., 2005), propriedades repelentes (MIOT et al., 2004; FREIRE et al., 2006), baixo potencial teratogênico (COSTA-SILVA et al., 2007), atividade contra ácaros (FARIAS et al., 2009), atividade antimalárica frente ao *Plasmodium falciparum* (MIRANDA JUNIOR, 2010), atividade vermífuga (FARIAS et al., 2010), efeitos na redução de edemas (PENIDO et al., 2005), atividade antialérgica, analgésica e anti-inflamatória (HENRIQUES et al., 2006).

## **2.7 Composição do óleo de *C. guianensis***

O óleo de andiroba pode ser obtido da maneira tradicional, cozinhando as sementes inteiras, separando as amêndoas das cascas e extraíndo seu óleo ou, através da prensagem mecânica das amêndoas e cascas trituradas juntas (FERRAZ et al., 2002; DA SILVA, 2005). O óleo de andiroba é composto

principalmente de material saponificável, onde se destacam derivados dos ácidos graxos palmítico, oleico, esteárico e linoleico. Em adição, o óleo de andiroba contem também cerca de 5% de material insaponificável, no qual se destacam os limonoides 17 $\beta$ -hidroxiazadiradiona, xilocesina k, gedunina, 6-acetoxigedunina, 7-desacetoxi-7-oxogedunina, 1,2-di-hidro-3-b-hidroxi-7-desacetoxi-7-oxogedunina e angolensato de metila (PENIDO et al., 2005; AMBROZIN et al., 2006).

## **2.8 Cicloxigenase como marcador tumoral**

Os marcadores tumorais são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente pelas células neoplásicas ou, secundariamente pelo paciente, em resposta a presença das mesmas (ANDRIOLO, 2005).

Um marcador prognóstico pode ser definido como qualquer substância capaz de fornecer informações a respeito da evolução clínica da neoplasia no momento do diagnóstico ou da cirurgia. Para isto, esse marcador deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática. Esse mesmo marcador também poderá ser considerado como preditivo quando fornecer informações úteis na seleção de pacientes susceptíveis à determinada terapêutica específica (SCHMITT, 1999).

A imunoexpressão de marcadores do ciclo celular pode indicar anomalias na regulação do ciclo celular, podendo então distinguir o comportamento biológico do tumor, incluindo o fornecimento de informações úteis sobre o grau de malignidade, presença ou não de metástase, taxa de progressão tumoral, a resposta à terapia e sobrevida livre de doença (PAPAIOANNOU et al., 2009).

As enzimas cicloxigenases são essenciais para a síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico liberado pelas fosfolipases da membrana celular. Essas enzimas são encontradas sob duas isoformas diferentes, mas semelhantes que são do tipo cicloxigenase 1 (COX-1), constitutiva e presente na maioria das células e tecidos, e a cicloxigenase do tipo 2 (COX-2) -induzida nos processos inflamatórios e por interleucinas (GILMAN et al., 2003; RANG et al., 2004; RAMOS et al., 2010; BOSCO et al., 2011).

A cicloxigenase-2 (COX-2) é uma enzima pró-inflamatória indutível que catalisa o processo de conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos. Sua expressão é induzida por células tumorais e é regulada por processos transcricionais e translacionais que são mediados por citocinas, fatores de crescimento e oncogenes (BASU et al., 2006). Portanto, a expressão de COX-2 ocorre, normalmente, em resposta a estímulos inflamatórios como lipopolissacarídeos (LPS), Interleucina-6, Interleucina-1, Fator de Necrose tumoral- $\alpha$ , fatores de crescimento e promotores tumorais (FOSSLIEN, 2000; ZHA et al., 2004).

Estudos *in vitro* usando linhagens de células de câncer de mama e *in vivo* com camundongos demonstraram que a superexpressão de COX-2 desempenha importantes papéis na oncogênese pela estimulação da proliferação de células tumorais, inibição da apoptose, estimulação angiogênica, aumento da resistência aos quimioterápicos, da motilidade e invasão celular (BASU et al., 2006; SINGH-RANGER et al., 2008; LIU et al., 2009; SAHIN et al., 2009; THILL et al., 2009; HOELLEN et al., 2011; JENDROSSEK et al., 2013).

Estudos com carcinoma mamário demonstraram que existe uma forte relação entre a patogênese dessa doença e a expressão de ciclooxigenases, particularmente de COX-2 nos tecidos tumorais (SOSLOW et al., 2000). Por outro lado, estudos experimentais demonstraram que a atividade de COX-1 também está alterada em tumores mamários (HWANG et al., 1998), o que contradiz o que se acreditava sobre as funções fisiológicas dessa enzima, que sempre foi considerada a isoenzima constitutiva e que participava apenas de reações homeostáticas.

A maioria dos estudos que objetiva fazer o diagnóstico de neoplasias e estimar a expressão de COX-2, bem como de outros marcadores, emprega a imunohistoquímica, pois essa técnica baseia-se na identificação de antígenos "in situ", que podem apresentar valor prognóstico e terapêutico (BARRA, 2006; HORTA et al., 2012).

### 3. JUSTIFICATIVA

Casos de paciente oncológicos têm aumentado em todo o mundo, fazendo as neoplasias ocuparem a segunda principal causa de morte na maioria dos países. Em função disso, vários esforços e investimentos tem sido realizados com o objetivo de desenvolver novos protocolos terapêuticos, seja para a cura, como coadjuvante nos atuais tratamentos convencionais e/ou redução das alterações paraneoplásicas.

Nesse contexto, a fitoterapia tem se destacado como uma importante ferramenta, sendo considerada como uma fonte de cura, e muitas vezes a única, devido à escassez de outros recursos para cuidar da saúde. Dentre várias outras aplicações terapêuticas, nos últimos anos os produtos naturais têm sido a base na busca de compostos quimioterápicos para o tratamento do câncer. Entretanto, o uso de plantas medicinais ainda é subutilizado quando se considera a grande diversidade de vegetais conhecidos.

Por outro lado, *Carapa guianensis* (andiroba) tem sido largamente utilizada pelas comunidades rurais, tanto no controle biológico de insetos/parasitos, quanto no tratamento de várias moléstias. Apesar do seu uso empírico, algumas dessas propriedades já são comprovadas cientificamente. Contrariamente, ainda existem poucos estudos relacionando *Carapa guianensis* e o tratamento do câncer, fazendo-se necessárias novas pesquisas para ajudar a compreender o potencial antineoplásico dessas plantas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antitumoral da *Carapa guianensis in vivo* em camundongos Swiss inoculados com Tumor de Ehrlich Sólido.

### **4.2 Objetivo específico**

Verificar a sobrevivência dos camundongos Swiss inoculados com células neoplásicas do Tumor de Ehrlich sólido tratados com *Carapa guianensis*;

Avaliar as alterações morfológicas em baço, fígado e rim de camundongos Swiss inoculados com células neoplásicas do Tumor de Ehrlich Sólido tratados com *Carapa guianensis*;

Verificar a expressão de COX-2 na massa tumoral por imuno-histoquímica nos camundongos Swiss inoculados experimentalmente com células neoplásicas do tumor transplantável de Ehrlich e tratados com óleo de *Carapa guianensis*.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1 Obtenção do óleo da semente de *C. guianensis* (andiroba)**

As sementes de andiroba foram coletadas a partir de 20 localidades do Estado do Pará. O óleo de andiroba foi processado e caracterizado pelo Laboratório de Química da Universidade Federal do Pará. As amostras foram coletadas e os frutos conservados sob refrigeração (12 °C) e transportados para local apropriado, onde foram processados e foi feito o processo de puba para extração do óleo in natura via solvente orgânico. A extração por solvente foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Sousa Filho (2007).

### **5.2 Elaboração das concentrações do óleo de andiroba**

Para a realização dos testes o primeiro procedimento adotado foi resolver o desafio para a solubilização do óleo de andiroba, haja vista que o mesmo por ser muito lipofílico é de difícil solubilização em meio aquoso. Foi usado Tween 20 como solução emulsificante na concentração de 1:100 do óleo de andiroba. Após o preparo da solução mãe as concentrações foram divididas de forma seriada de 500, 250 e 125 µg/mL.

### **5.3 Animais**

Para a realização do experimento foram utilizados 35 camundongos da linhagem *Swiss webster* fêmeas, com idade aproximada de 60 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, forradas com xilana estéril e tampadas com grades inoxidáveis, em sala climatizada com temperatura constante de  $26 \pm 2^\circ$  C, com ciclos de claro-escuro de 12 h. Ração e água estéreis foram fornecidas *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (protocolo 09/2015).

### 5.3.1 Indução do tumor e ensaio terapêutico

Para a inoculação dos animais, foi utilizada uma linhagem do tumor de Ehrlich mantida no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. Após a retirada do líquido ascítico dos camundongos doadores, o número e a viabilidade das células foram determinados pelo método de exclusão do corante azul de Trypan 0,2%, em câmara hemocitométrica, com 98% de viabilidade. Após avaliação, os animais foram infectados via subcutânea, com 0,2 mL de uma suspensão de células tumorais contendo  $5 \times 10^6$  células/mL.

Para o ensaio terapêutico, os animais foram divididos em sete grupos, cada um contendo cinco animais. A divisão foi feita de acordo com o peso de cada animal: os camundongos foram pesados e distribuídos de forma que a média do peso dos animais fosse uniforme para todos os grupos. O tratamento oral foi realizado a cada 24 h, com auxílio de agulha de gavagem.

- **Grupo controle:** Animais tratados oralmente com 200 µl de solução de PBS, por 14 dias consecutivos;
- **Grupo 01:** Animais tratados oralmente com 200 µl de solução de PBS e Tween -20, por 14 dias consecutivos;
- **Grupo 02:** Animais tratados oralmente com 200 µl do óleo de andiroba, diluído em solução de Tween -200 na dose 125 µg/mL, por 14 dias consecutivos;
- **Grupo 03:** Animais tratados oralmente com 200 µl do óleo de andiroba, diluído em solução de Tween -20 na dose 250 µg/mL, por 14 dias consecutivos;
- **Grupo 04:** Animais tratados oralmente com 200 µl do óleo de andiroba, diluído em solução de Tween-20 na dose 500 µg/mL, por 14 dias consecutivos;
- **Grupo 05:** Animais tratados oralmente com quimioterápico (ciclofosfamida), por 14 dias consecutivos;

- **Grupo 06:** Animais sem tumor tratados oralmente com PBS, por 14 dias consecutivos;

#### **5.4 Necropsia e coleta de órgãos**

Aos 14 dias de experimento, os animais foram eutanasiados com quetamina e xilazina, para retirada de sangue, lesão primária, linfonodo drenante, baço, fígado e rim. Os órgãos foram lavados em solução salina (0,87%), fixados em formalina tamponada 10% por um período de 24 horas e incluídos posteriormente em parafina histológica.

#### **5.5 Marcação de proliferação celular por técnica de imuno-histoquímica e coloração de HE**

Os fragmentos foram colocados em formalina tamponada a 10% e após 24h de fixação foram processados por técnicas de inclusão em parafina histológica. Todo este processamento foi realizado em um histotécnico automático (Leica - TP 1020). Os cortes foram obtidos em micrótomo automático (Micron - HM 360), em espessura de 4µm para imunohistoquímica e 5 µm para histologia. Estes foram corados por hematoxilina-eosina (H.E. – hematoxilina de Harris e eosina alcoólica a 0,5%), montados em Entellan (Merck – 1.07961) examinados e fotografados em microscópio de luz (Zeiss – Axioplan). Para a técnica de imunohistoquímica para a investigação de COX-2, os cortes foram processados segundo técnica descrita por Iglesias (2012).

#### **5.7 Análise estatística**

Os dados foram analisados empregando-se o software GraphPad Prism 5. Para dados com distribuição não paramétrica foi realizado o teste Kruskal-Wallis. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ . Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os

grupos estudados foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e o Teste de Tukey foi utilizado para detectar diferenças existentes entre todos os grupos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Composição do óleo de andiroba (*C. guianensis*)

A análise do perfil lipídico do óleo integral da semente de andiroba revelou a presença de diversos ácidos graxos, esteroides e triterpenos. Os ácidos encontrados foram os ácidos mirístico, palmítico, palmitoléico, oléico, linoléico, esteárico, araquidônico, beénico e lignocérico. Dentre os esteróides, detectou-se a presença de esqualeno, estigmasterol e colesterol. Quanto aos compostos triterpenos foram obtidos tem-se a epoxigedudina, 1,3-dipalmitina, derivados de deoxilactona, deacetilgedudina e epoxideacetilgedudina.

### 6.2 Avaliação ponderal

Não houve variação significativa no peso dos camundongos tratados com quimioterápico (ciclofosfamida), PBS, PBS+Tween-20, soluções do óleo nas concentrações de 125, 250, 500mg e o grupo sem tumor. Entretanto, os grupos tratados com solução de óleo de andiroba na dose de 500 mg, quimioterápico e o grupo sem tumor apresentaram reduzido valor ponderal se comparado aos outros grupos.

**Tabela 1:** Avaliação ponderal dos animais dos grupos controle e tratados com ciclofosfamida, soluções de óleo de *C. guianensis* nas concentrações de 125, 250, 500 mg do dia 0 ao 14º dia de tratamento. Média dos pesos, seguida do respectivo desvio padrão (DP).

GRUPOS	MOMENTOS						MÉDIA DP
	1	2	3	4	5	6	
<b>CONTROL</b>	30,24A	30,54A	30,50A	31,42Aa	30,70A	31,02A	30,74a
<b>E</b>	a	a	a		a	a	
	±2,13	±2,05	±2,66	±2,95	±1,83	±1,65	±2,09
<b>GRUPO 1</b>	29,72A	28,08A	28,98A	29,24Aa	29,26A	30,06A	29,22b
	a	a	a	b	a	a	
	±0,84	±1,14	±1,18	±1,46	±1,53	±1,29	±1,31
<b>GRUPO 2</b>	29,62A	28,56A	28,46A	29,58Aa	29,50A	29,94A	29,28b
	a	a	a	b	a	a	
	±2,33	±1,98	±1,78	±1,76	±1,53	±2,25	±1,87
<b>GRUPO 3</b>	29,48A	28,34A	29,28A	28,44Aa	29,38A	29,34A	29,04b
	a	a	a	b	a	a	
	±1,30	±0,74	±0,89	±1,18	±1,08	±0,85	±1,05

<b>GRUPO 4</b>	28,44A	26,92A	27,04A	27,78Ab	27,66A	27,86A	27,62c
	a	a	a		a	a	
	±2,07	±1,72	±1,54	±0,95	±1,81	±1,04	±1,52
<b>GRUPO 5</b>	28,98A	28,36A	27,82A	27,08Ab	28,08A	28,10A	28,07b
	a	a	a		a	a	c
	±2,64	±2,64	±1,99	±1,83	±1,47	±2,13	±2,05
<b>GRUPO 6</b>	29,20A	28,42A	27,83A	28,62Aa	28,36A	29,08A	28,58b
	a	a	a	b	a	a	c
	±1,38	±1,10	±1,22	±1,21	±1,41	±1,36	±1,26
<b>MÉDIA</b>	29,38A	28,46A	28,56A	28,88A	28,99A	29,34A	28,94
<b>DP</b>	±1,82	±1,87	±1,88	±2,05	±1,70	±1,78	±1,86

### 6.3 Volume Tumoral

Os animais de todos os grupos que foram inoculados com células tumorais apresentaram maior volume do coxim plantar, quando comparados aos animais do controle (sem tumor). A análise revelou grande desvio padrão dos grupos tratados, diferentemente do grupo controle. Entretanto quando se considera as médias, os grupos 2, 3, 4 e 5 apresentaram menor valor para o volume tumoral.

**Tabela 2:** Avaliação do volume tumoral dos camundongos tratados com quimioterápico (ciclofosfamida), PBS, PBS+Tween-20, soluções do óleo nas concentrações de 125, 250, 500mg e o grupo sem tumor. Média dos valores de volume dos coxins plantares, seguida do respectivo desvio padrão (DP).

GRUPOS	MOMENTOS						MÉDIA
	1	2	3	4	5	6	DP
<b>CONTROL E</b>	16,47A	18,42Aa	26,37Aa	35,48Ab	50,30A	50,08A	32,85b
	a	b	b	c	c	c	
	±3,29	±1,15	±4,86	±6,60	±13,38	±14,11	±16,04
<b>GRUPO 1</b>	16,46A	18,43Aa	28,06Aa	40,23Aa	49,40A	53,66A	34,37b
	a				a	a	
	±1,14	±2,90	±14,33	±24,74	±35,75	±43,82	±27,75
<b>GRUPO 2</b>	16,96A	18,16Aa	21,36Aa	26,53Aa	31,70A	34,61A	25,89a
	a				a	a	b
	±0,40	±2,41	±3,64	±9,75	±15,84	±20,86	±12,49
<b>GRUPO 3</b>	17,31A	25,92Aa	23,03Aa	22,01Aa	29,65A	32,39A	25,05b
	a				a	a	
	±1,54	±14,66	±0,86	±6,42	±7,29	±8,80	±8,91
<b>GRUPO 4</b>	15,03A	18,32Aa	23,63Aa	25,64Aa	41,66A	41,87A	27,70b
	a				b	b	
	±1,51	±3,69	±4,12	±4,98	±14,50	±9,90	±12,85

<b>GRUPO 5</b>	16,47A	19,02Aa	21,05Aa	26,40Aa	36,71A	38,54A	26,36b
	a				a	a	c
	±2,16	±2,86	±3,16	±11,05	±25,82	±35,69	±19,05
<b>GRUPO 6</b>	15,91A	–	–	18,93Aa	19,00A	18,43A	18,07a
	a				a	a	c
	±2,36	–	–	±1,66	±1,80	±1,47	±2,14
<b>MÉDIA</b>	16,37a	19,71a	23,91b	27,89b	36,92b	38,51b	27,49
<b>DP</b>	±1,92	±6,55	±6,63	±12,64	±20,55	±24,36	±16,86

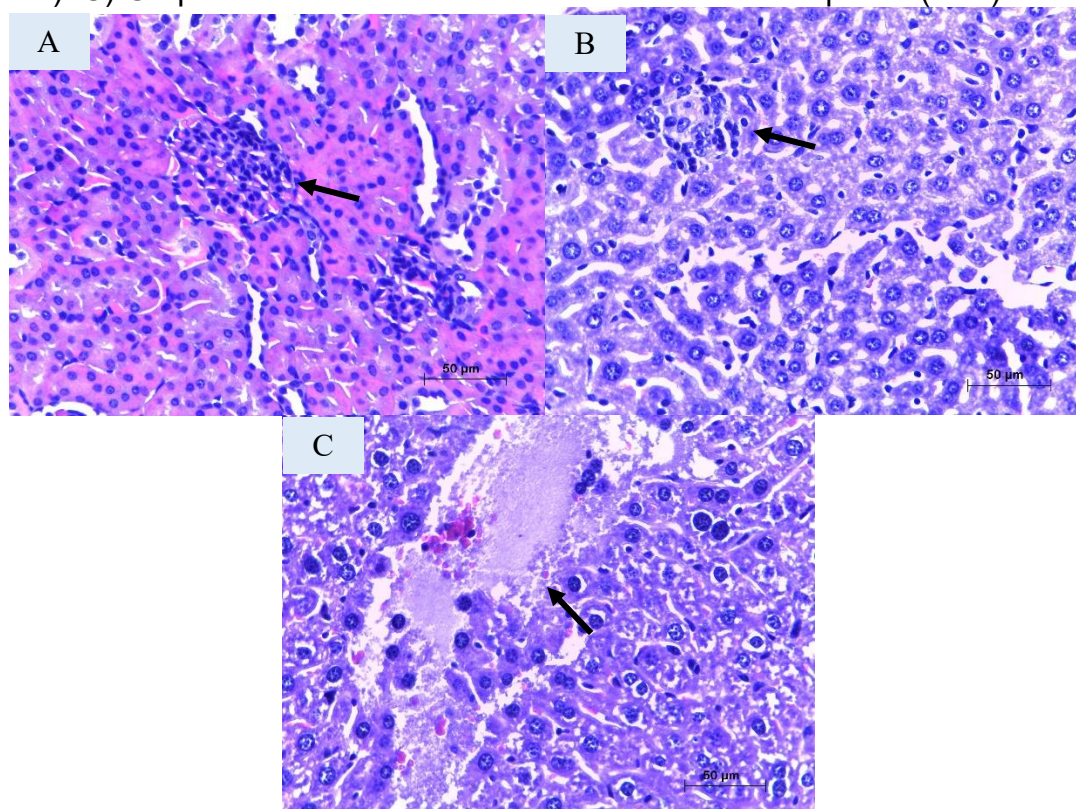
#### 6.4 Avaliação histopatológica de rim, fígado e baço

A análise histológica revelou que animais de todos os grupos estudados apresentaram algum grau de infiltrado inflamatório no parênquima hepático. Animais dos três grupos tratados com andiroba apresentaram células de Kupffer ativadas. Apenas um animal do grupo tratado com a solução de PBS e Tween - 20 revelou degeneração hidrópica dos hepatócitos, enquanto verificou-se em outro camundongo do grupo tratado com a solução de óleo a 250 µg/mL a presença de um granuloma hepático discreto.

No baço foi observado que pelo menos um animal de cada grupo apresentou infiltrado inflamatório que variou de discreto a intenso no parênquima esplênico e apoptose de polpa branca.

Nos rins foi verificado infiltrado inflamatório e congestão em animais de todos os grupos. Pelo menos um animal dos grupos 1, 3, 5 e 6 apresentou hemorragia renal. Um camundongo do grupo 3 apresentou discreta fibrose renal, porquanto outro do grupo 4 apresentou degeneração de túbulos contorcidos proximais.

**Figura 1.** Alterações histopatológicas no rim e fígado de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. A) Grupo tratado com solução de PBS e Tween-20: infiltrado inflamatório em glomérulo renal (seta). B) Grupo tratado com 250 µg/mL de óleo de *Carapa guianensis*: presença de granuloma hepático (seta). C) Grupo tratado ciclofosfamida: área de necrose hepática (seta).



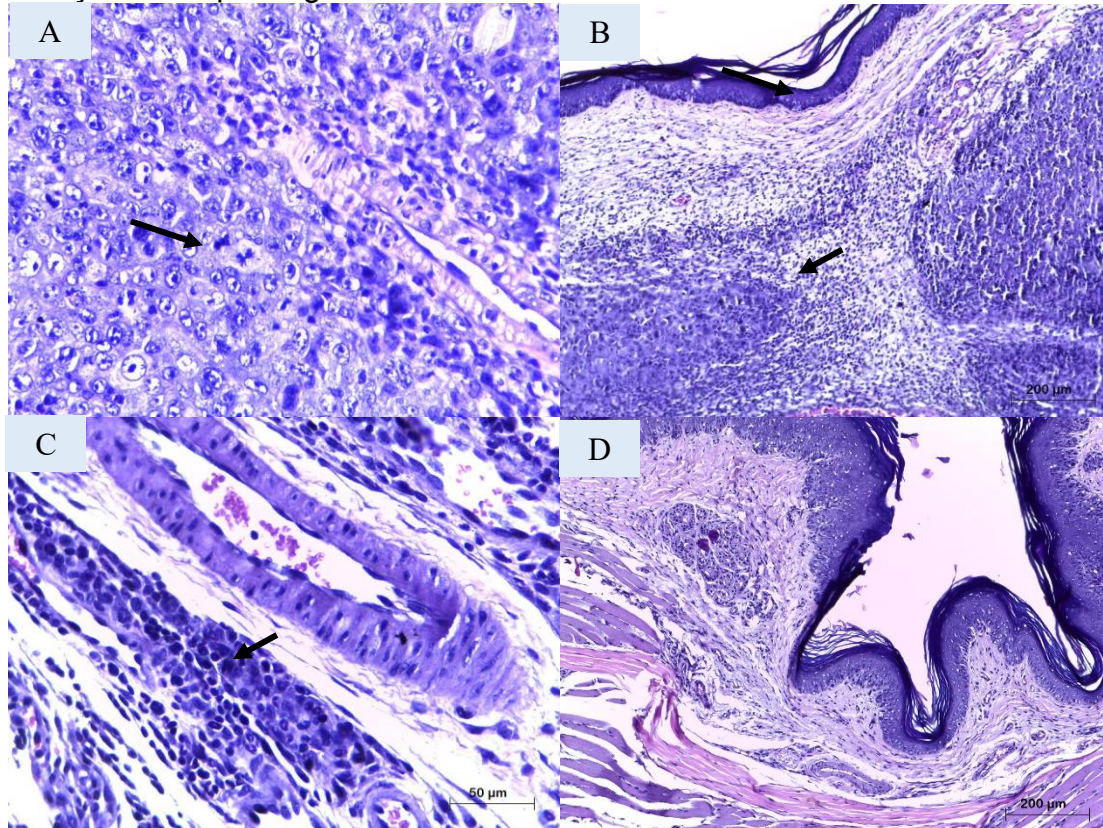
## 6.5 Avaliação histológica do coxim plantar

### 6.5.1 Coloração de HE

Em todos os grupos tratados foi observado necrose, angiogênese, invasividade e infiltrado inflamatório, variando de discreto a intenso. No grupo tratado com quimioterápico as alterações eram mais discretas quando comparadas aos grupos tratados. Conforme esperado, o grupo sem tumor não revelou alteração histológica.

Achado importante na avaliação microscópica do coxim dos animais inoculados com células tumorais foi a presença marcante de infiltrado eosinofílico.

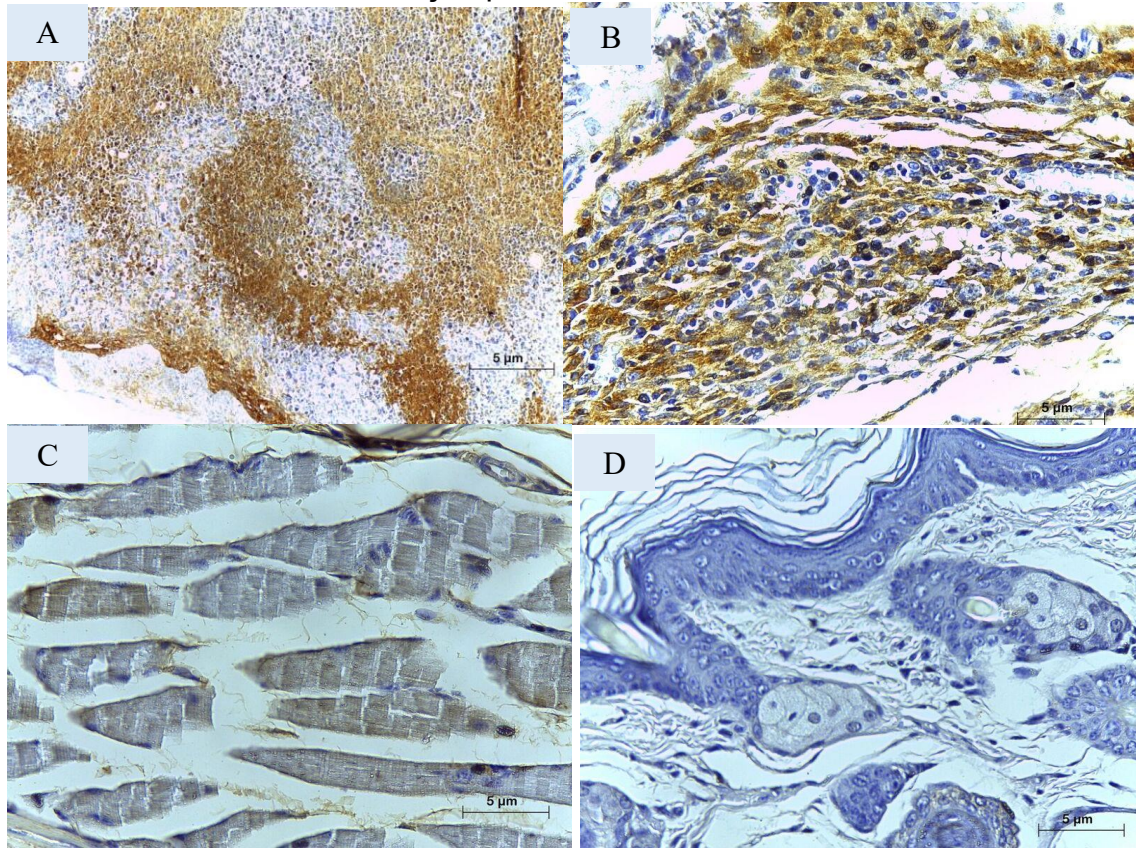
**Figura 2.** Análise histopatológica do coxim plantar de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. A) Grupo tratado com solução de PBS e Tween-20: formação neoplásica perivascular com presença de células apresentando figuras de mitose (seta). B) Grupo tratado com 500 µg/mL de óleo de *Carapa guianensis*: extensas áreas de necrose (seta). C) Grupo tratado com 500 µg/mL de óleo de *Carapa guianensis*: angiogênese e infiltrado inflamatório perivascular com presença de eosinófilos (seta) D) Grupo tratado com ciclofosfamida: sem alterações histopatológicas.



#### 6.5.2 Imunohistoquímica por COX-2

As marcações pelo anticorpo de COX-2 pela técnica de imunohistoquímica, foram graduada de discreta a intensa no grupo controle, bem como no grupo 1. Tanto o grupo 2, quanto o 4 apresentaram imunomarcacão moderada. Já o grupo 3 marcou discretamente, enquanto os grupos 5 e 6 não marcaram. Portanto não se verifica uma correlacão entre a expressão de Cox-2 e os diferentes grupos estudados.

**Figura 3.** Marcação para COX-2 na pata de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. A) Grupo tratado com solução de PBS e Tween-20: marcação intensa para COX-2 (seta). B) Grupo tratado com 125 µg/mL de *Carapa guianensis*: marcação moderada para COX-2. C) Grupo tratado com 250 µg/mL de *Carapa guianensis*: marcação discreta para COX-2. D) Grupo sem tumor tratado com PBS: sem marcação para COX-2.



## 7. DISCUSSÃO

A semelhança desta pesquisa, Ribeiro et al (2012) utilizando extrato de *A. chica* para tratar o tumor de Ehrlich sólido observaram que todos os grupos experimentais apresentaram áreas de necrose se difundindo pelo tecido tumoral, bem como a presença de discretas áreas de hemorragia.

Da mesma forma, Verçosa Junior et al. (2007) ao avaliar microscopicamente a influência do tratamento com filtrado aquoso de *Agaricus blazei* Murrill em camundongos inoculados com tumor sólido de Ehrlich (TSE), observaram estroma delicado, grandes áreas de necrose, maior concentração de células neoplásicas em áreas perivasculares e pequena quantidade de infiltrado inflamatório. Também visualizaram células tumorais distribuídas aleatoriamente, no tecido, com grande pleomorfismo, alto grau de anaplasia, núcleos evidentes, numerosos, arredondados e apresentando uma grande relação núcleo/citoplasma.

Focos inflamatórios são freqüentes no fígado de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. Miranda-Vilela et al (2014) observaram que camundongos portadores do tumor apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear nas regiões portal e intralobular, assim como células necróticas próximas às infiltrações, concordando dessa forma com as alterações encontradas neste trabalho.

A presença de lesões no fígado, como por exemplo, necrose lobular e hiperplasia da células de Kupfer, pode ser consequência local de um efeito sistêmico, produzido pela neoplasia, ou pode ser mediada por administração de drogas (LUNGUINHO, 2012).

Miranda-Vilela et al (2014) ao avaliarem microscopicamente os rins de camundongos inoculados com células tumorais, verificaram infiltrado inflamatório, pequenos focos de esclerose glomerular e tubular com picnose e raras células de descamação. Da mesma forma, SILVA (2009) demonstrou que os camundongos do grupo controle e dos grupos tratados com doses de derivados de quinonas apresentaram na histologia renal glomerulonefrite, em maior ou menor grau.

Góes-Filho et al (2009) ao avaliarem lesões hepáticas e esplênicas de camundongos com tumor de Ehrlich, submetidos a tratamento com soro de

tubarão e anti-inflamatórios, constaram a presença de hiperplasia e ativação e células de Kuppfer em todos os animais, além de hepatite mononuclear multifocal. No baço foram encontrados animais com hiperplasia de polpa branca e apoptose nos centros germinativos.

Com exceção do grupo sem tumor, em todos os outros foi observado algum grau de necrose no coxim plantar dos camundongos, o que está diretamente relacionado com a evolução tumoral, agressividade e potencial metastático (GUILARDUCCI, 2016; MAYER, 2014).

Quanto a marcação imunohistoquímica com anticorpo COX-2 verificou-se que os grupos tratados com óleos de andiroba apresentaram marcação de discreta a moderada, o que pode indicar uma regressão do processo inflamatório. De forma esperada, o grupo tratado com quimioterápico, ciclosfosfamida, e o tratado com PBS, mas sem tumor, não apresentaram imunomarcação. Mohamed et al (2016) em estudo realizado em camundongos com tumor de Ehrlich sólido, concluíram que estímulos inflamatórios, na fase inicial ou final, podem induzir a regressão do tumor, podendo ser combinados com a quimioterapia convencional ou imunoterapia.

## 8. CONCLUSÃO

- Nas condições experimentais, as soluções em diferentes concentrações de óleo de *Carapa guianensis* não demonstraram atividade antineoplásica.
- Os grupos tratados com soluções de óleo de andiroba apresentaram o padrão histológico diferente dos animais não tratados, o que pode indicar um efeito tóxico do óleo.

## REFERENCIAS

AMARAL, L. F. G.; FIERRO, I. M. Profile of medicinal plants utilization through patent documents: the andiroba example. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 716-719, 2013.

AMBROZIN, A. R. P; LEITE, A. C; BUENO, F. C. et al. **J. Braz. Chem. Soc.**, 17, 542. 2006.

ANDRIOLO, A. **Marcadores tumorais bioquímicos**. Gestão estratégica em medicina laboratorial, n.4, p.1-3, 2005.

ANVISA, **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF)**, por meio do Decreto nº 5.813 do ano de 2006, Brasília, 2013. Acessado em: 31/03/13.

ARANJANI J.M; MANUEL, A; MALLIKARJUNA, R.C. et al. Preliminary evaluation of in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity of *Xanthium strumarium* in transplantable tumors in mice. **Am J Chin Med**.41:145 e 162. 2013.

AWARA, W.M, et al. The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin? **Pharmacol Res**, 2004, 50(5): 487-98, 10.1016/j.phrs.2004.04.002.

BARRA, M.B. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Rev. AMRIGS**, Porto Alegre, v.50, n.2, p. 173-184, 2006.

BARBERENA, I; CALDERÓN, A; SOLÍS, P.N. et al. Screening of Anticancer and Immunomodulatory Activities of Panamanian Plants. **Pharmaceutical Biology**, v.42, n.7, p.552-558, 2004.

BASU, G.D; LIANG, W.S; STEPHAN, D.A. et al: A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells. **Breast Cancer Res** 8: R69, 2006.

BOSCO, J.L.F; PALMER, J.R; BOGGS, D.A. et al. Regular aspirin use and breast cancer risk in US Black women. **Cancer Causes Control**, v.22, p.1553-1561, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC No 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 5 abr 2010. [Citado 2014 17 nov]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e321990042cf06e79b57dfafbc188c8f/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+4+de+30+de+janeiro+de+2014.pdf?MOD=AJPERES>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: . Acesso em: mai. 2016.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Facts & Figures. 2ns edition. American Cancer Society. 2011.

BRAY, F; JEMAL, A; GREY, N. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **Lancet Oncol** 2012; 13: 790-801.

CORRÊA, M.P; Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas por Manuel Pio Corrêa. Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**; 1984.

COSTA-LOTUFO, et al., A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. 2010, 11p. Universidade Federal do Ceará. **Revista: Virtual Quim**, v.2. Ceará, 2010.

COSTA-SILVA, J. H; LYRA, M. M. A; LIMA, C. R. et al. **Ethnopharmacol.** 112, 122. **2007**.

DAGLI, M.L.Z. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental. São Paulo. 148p. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade de São Paulo. 1989.

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

DA SILVA, C. L. M; **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.

DAWE, C.J. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J.F. and FREI III, E. **Cancer medicine**. 2. ed. Philadelphia : Lea and Febiger, p. 209. 1982.

DAYANANDAN, S; DOLE, J; BAWA, K; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Mol. Ecol.** 8, 1585–1592. 1999.

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

ELMORSI, Y.M. et al. Effect of ketoprofen and indomethacin on methotrexate pharmacokinetics in mice plasma and tumor tissues. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**,38(1): 27-32, 10.1007/s13318-012-0113-x.2013.

FARIAS, M. P. O. et al. Potencial acaricida do óleo de andiroba *Carapa guianensis* Aubl. sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 61, p. 887, 2009.

FARIAS, M. P. O. et al. Avaliação *in vitro* dos efeitos do óleo da semente de *Carapa guianensis* Aubl. sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 12, p. 220, 2010.

FELDEN, J.B; FIGUEIREDO, A.C; [Distribution of body fat and breast cancer: a casecontrol study in the South of Brazil]. **Cien Saude Colet.**;16(5):2425-33. 2011.

FERRAZ, I. D. K; CAMARGO, J. L. C; SAMPAIO, P. T. B. S; **Acta Amazonica**, 32, 647. 2002.

FERRAZ, I.D.K; CAMARGO, J.L.C; SAMPAIO, P.T.B; Sementes e plântulas de Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica**;32(4):647–61.2002.

FERRARI, M; OLIVEIRA, M.S.C; NAKANO, A.K; ROCHA-FILHO, P.A. In vitro and in vivo determinations of sun protection factor (SPF) of emulsions with andiroba oil (*Carapa guianensis*). **Rev Bras Farmacogn.**;17(4):626–30. doi:10.1590/S0102-695X2007000400023. 2007.

FERRARIS, F.K; RODRIGUES, R; DA SILVA, V.P.et al. Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. **Int. Immunopharmacol.**, 11. [CrossRef] [PubMed] .2011.

FERREIRA, P. M. P. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1045-1058, 2011.

FREIRE, D. da C. B; BRITO-FILHA, C. R. da C; CARVALHO-ZILSE, G. S; **Acta Amazonica**, 36, 365. 2006.

FREIRE, L. H.M.S; ALVES, F. Ação de extratos naturais sobre o câncer natural (extracts of action on câncer) [http://dx. doi. org/10.15601/2238-1945/pcnb.v4n8p7-14](http://dx.doi.org/10.15601/2238-1945/pcnb.v4n8p7-14). **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 4, n. 08, p. 07-14, 2015.

FOSSLIEN, E. Biochemistry of cyclooxygenase (cox)-2 inhibitors and molecular pathology of cox-2 in neoplasia. **Crit Rev Clin Lab Sci.**; 37(5): 431-502. 2000.

FOURNIER, L.A.,. Species description *Carapa guianensis*. In: Vozzo, J.A. (Ed.), **Tropical Tree Seed Manual**. Agricultural Handbook Number 721. 2003.

SMITH JR, C.E; USDA Forest Service, Washington DC,. **Flora of Panama**. Part VI. Family 92. Meliaceae. Ann. Mo. Bot. Garden 52, 55–79. 1965.

HENRIQUES, M. G. M. O; MONTEIRO, C. P; SIANI, A. C. et al.**PCT Int. Appl. WO 2006007680 A1 2006026**, 2006.

FUKUMASU, H, et al., Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. Departamento de Ciências Básicas, FZEA – USP. **Revista Brasileira de toxicologia** 10 p. 2008.

GILMAN, A.G; GOODMAN, L.S; RALL, T.W. et al. Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica, 10.ed. Rio de Janeiro: **MacGraw- Hill**, 2003. p.1647.

HOELLEN, F; KELLING, K; DITTMER, C. et al.Impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. **Anticancer Res** 31: 4359-4367, 2011.

HORTA, R.S; COSTA, M.P; LAVALLE, G.E.et al.Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com o auxílio da imuno-histoquímica. **Cienc. Rural.**, v. 42, p. 1033-1039, 2012.

HOYERT, D.L; XU, J.Q; Deaths: preliminary data for 2011. **Natl Vital Stat Rep**; 61(6): 1-52. Disponível em: [www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr61/nvsr61\\_06.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr61/nvsr61_06.pdf). (Acessado em 15 de março de 2015). 2012.

HWNAG,D; SCOLLARD, D; BYRNE, J. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **J Natl Cancer Inst.**90: 455-460. 1998.

IGLESIAS, Déborah Pitta Paraíso. Expressão Imuno-histoquímica de COX-2, EMMPRIN, HIF-1 $\alpha$  e GLUT-1 no tecido gengival normal e inflamado. 2012. 120 f. **Tese** (Doutorado em Odontologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

**International Agency for Research on Cancer (IARC)**. Breast cancer incidence,mortality and prevalence worldwide 2012 [Internet]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) >.2012.

JEMAL, A; CENTER, M.M; DESANTIS, C; WARD, E.M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**; 19(8): 1893-907. 2010.

JENDROSSEK, V: Targeting apoptosis pathways by celecoxib in cancer. **Cancer Lett** 332: 313-324, 2013.

KABEL, A.M. et al. Effect of metformin and adriamycin on transplantable tumor model. *Tissue Cell*, 47(5): 498-505, 10.1016/j.tice.2015.07.003.2015.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models?, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p.161-165, 2005.

KUMMAR, V; ABBAS, A; FAUSTO, N; ROBBINS & COTRAN – Pathology Basis of Disease, 7a. ed., **WB Saunders**: China, 2004.

LIU, B; QU, L;TAO, H.: Cyclo-oxygenase 2 up-regulates the effect of multidrug resistance. **Cell Biol Int** 34: 21-25, 2009.

LIU, J; OUYANG, L; CHEN, Y; LIU, B. Plant natural compounds targeted cancer cell autophagy: research advances. **Journal of International Pharmaceutical Research**, v. 40, n. 6, p. 688-694, 2013.

LUNGUINHO, D. M. Estudo dos efeitos antitumorais e toxicológicos do óleo essencial das folhas de *Xylopia frutescens* Aubl.(Annonaceae). **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), UFPB/CCS, João Pessoa, 2012.

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

MALAFIA, O; CAMPOS, A.C.L; TORRES, O; GOLDENBERG, S. Os fitoterápicos e seu potencial na cicatrização. **Acta Cir Bras.**;21(3):1.2006.

McHARGUE, L.A; HARTSHORN, G.S. Seed and seedling ecology of *Carapa guianensis*. **Turrialba** 33, 399–404. 1983.

MEI, X.T; XU, D.H; HE, X.N; LU, Y.C. Pharmacological researches of curcumin solid dispersions in treatment of cancer. **Zhong Yao Cai**. v.35, p.1645-1649, 2012.

MENDONÇA, F. A. C; SILVA, K. F. S; SANTOS, K. K.et al. **Fitoterapia**, 76, 629. 2005.

MIOT, H. A; BATISTELLA, R. F; BATISTA, K. A.et al. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 46, 253. 2004.

MIYAKE, T. et al. Carapanolides T–X from *Carapa guianensis* (andiroba) seeds. **Molecules**, n. 20, p. 20955–20966, 2015.

MIRANDA, J.R. N. C.; **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Para, Brasil, 2010.

MIRANDA-VILELA, A.L; GRISOLIA, C.K; LONGO, J.P. et al. Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicininduced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. **J Nutr Biochem**; 25: 1161-1176. 2014.

MORAES, L.G; ALONSO, A.M; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Univ Ciênc Saúde.**;9(1):77-99. 2011.

MUELLNER, A. N; SAVOLAINEM, V; SAMUEL, R; CHASE, M. W.The mahogany family “out-of-Africa”: Divergence time estimation, global biogeographic patterns

inferred from plastid rbcL DNA sequences, extant, and fossil distribution of diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 40:236-250. 2006.

NAYAK, B.S; KANHAI, J; MILNE, D.M.et al. Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis* L. (Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. **J. Med. Food.**, 13, 141–146.2010.

OLIVEIRA, M.M.et al.Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil:**dados da pesquisa nacional da saúde** , 2013.

OLIVEIRA, P.F.M; HENRIQUES, L.A; RODRIGUES-FILHO, F.et al. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. **Acta Cir. Bras.**13(4): 243-8.1998.

ONCO HEMATOS, **Manual de orientações sobre quimioterapia**, Sergipe, 2013. Disponível em: . Acessado em: 31/03/13.

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

PALHARIN, L.H.D.C; FIGUEIREDO, N.E.et al. Efeitos fitoterápicos e homeopáticos da babosa. **Rev Cientif Eletron Agron.**;7(14). 2008.

PAPANOIANNOU, N; PSALLA, D; ZAVLARIS, M. et al. Immunohistochemical expression of dogTERT in canine testicular tumours in relation to PCNA, Ki67 and p53 expression. **Vet. Res.**, v. 33, p. 905-919, 2009.

PENIDO, C; COSTA, K.A; PENNAFORTE, R.J.et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflamm. Res.**54, 295–303. **[CrossRef] [PubMed]** ,2005.

PENIDO, C; CONTE, F.P; CHAGAS, M.S.S.et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflamm Res.**; 55(11):457- 64. 2006.

PENIDO, C; COSTA, K. A; PENNAFORTE, R. J.et al. **Inflammation Res.**, 54, 295. 2005.

PENNINGTON, T.D; Meliaceae. Flora Neotropica, **Monograph** No. 28. New York Botanical Garden Pr. Department, New York, 470 pp. 1981.

PEREIRA A.D.E.F; PEREIRA, L.G; BARBOSA, L.A.et al.Efficacy of methotrexate-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) implants in Ehrlich solid tumor-bearing mice. **Drug Deliv.** v.20, p.168-179, 2013.

PETO J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. **Nature**; 411: 390-95.2001.

PINTO, A. A. et al. Predação de sementes de andiroba [*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC.(Meliaceae)] por insetos na Amazônia. **Revista Árvore**, v. 37, n. 6, p. 1115-1123, 2013.

RAMOS, R.S; VOLPATO, R; LOPES, M.D. A contribuição da terapia com coxibes na oncologia de pequenos animais. **Vet. e Zootec.**, v.4, p.461- 468, 2010.

RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J.M. Farmacologia. 5.ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**,. p.904. 2004

RIBEIRO, A.F.C; TELLES, T.C; FERRAZ, V.P. et al.Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 2, 364–373. 2012.

ROY, A; SARAF, S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plant kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 29, 191–201. 2006.

SAHIN, M; SAHIN, E.G. S: Cyclooxygenase-2 in cancer and angiogenesis. **Angiology** 60: 242-253, 2009.

SAKAMOTO, A. et al. Andiroliodes W–Y from the flower oil of andiroba. **Fitoterapia**, n. 100, p. 81–87, 2015.

SAMPAIO, P.T.B. Andiroba (*Carapa guianensis*). In: CLAY, **J.W.**editors. Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: Amazonas; p. 243–51. 2000.

SAMPAIO P.T.B; CLEMENTS, C.R. (Eds.), Biodiversidade Amazônica:exemplos e estratégias de utilização (Amazonian Biodiversity: examples and use strategies). Manaus. **Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico (in Portuguese)**.

SARASWATI, S; KANAUIA, P.K; KUMAR, S.et al.Tylophorine, a phenanthraindolizidine alkaloid isolated from *Tylophora indica* exerts antiangiogenic and antitumor activity by targeting vascular endothelial growth factor receptor 2--mediated angiogenesis. **Mol Cancer**. V.12, p.82-95, 2013.

SCHMITT, F.C. Marcadores prognósticos em carcinoma mamário. In: ALVES, V.A.F; BACCHI, C.E; VASSALLO, J. Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Patologia**, p. 30-46. 1999.

SHANLEY, P; MEDINA, G. Frutíferas e Plantas úteis na Vida Amazônica (Fruiting trees and useful plants in Amazonian life). **CIFOR, Imazon**, Belém, Brazil, 304 pp. (in Portuguese). 2005.

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

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

SILVA, E.B; BREHMER, J.S. ;STEIL, A.A. Avaliação antitumoral das inflorescências de *Musa paradisíaca* D. Kuntze (*Musaceae*) no tumor ascítico de Ehrlich(TAE). **Revista de divulgação científica** v.12 n.2(A). I SIPEX 2009.

SINGH-RANGER, G; SALHAB, M.M.K. The role of cyclooxy- genase-2 in breast cancer: review. **Breast Cancer Res Treat** 109: 189-198, 2008.

SOSLOW, R.A; DANNENBERG, A.J; RUSH, D. et al. Cyclooxygenase-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumours. **Cancer**; 89: 2637-2645. 2000.

SOUSA FILHO, J. V. C. Extração supercrítica do óleo residual da torta de andiroba ( *Carapa guianensis Aublet* ) resultante da prensagem industrial. 2007. 90 f. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química , Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

SOUZA, H. P. **Compostos, Probióticos Nutricêuticos**. Brasil, 2007. Disponível em:<<https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=784943&SearchParameter=Fabaceae%20%20and%20%20%28Neoplasia%20or%20Cancer%29>>. Acesso em: 29 abr. 2016.

SOUZA, V. C; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3 ed. Nova Odessa, **Instituto Plantarum**. 2012.

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

TAPPIN, M. R. R; NAKAMURA, M. J; SIANI, A. C; LUCCHETTI, L. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 48, 1090. **2008**.

TAN, Q.G; LIO, X.D. **Chem. Rev.**,111, 7437.2011.

THILL, M; FISCHER, D; BECKER, S. et al. Prostaglandin metabolizing enzymes in correlation with vitamin D receptor in benign and malignant breast cell lines. **Anticancer Res** 29: 3619-3625, 2009.

ULLAH, M. F, et al. Cancer chemopreventive pharmacology of phytochemicals derived from plants of dietary and non-dietary origin: implication for alternative and complementary approaches. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-23, 2014.

VERÇOSA JUNIOR, D. et al. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 59, n. 1, p. 150-154, 2007.

VIEIRA, L.S. Fitoterapia da Amazônia: **manual de plantas medicinais**. São Paulo: Ceres; 1992.

WONG, K.F; YUAN, Y; LIK, J.M. Herbal Bioactive Molecules: The Hidden Jewels for Drug Development. *Tripterygium wilfordii* bioactive compounds as anticancer and anti-inflammatory agents. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.39, p.311–320, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact Sheets by Cancer**. Available at: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Accessed at: June 4, 2014.

ZHA, S; YEGNASUBRAMANIAN, V; NELSON, W.G. et al. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. **Cancer Letters**. 215: 1-20. 2004.