



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A. C. SIMÕES
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

EVERLAINE LEITE ESTEVAM DOS SANTOS

**EFEITO ANTITUMORAL DO TRITERPENÓ PENTACÍCLICO FRIEDELINA NO
MODELO MURINO DE CARCINOMA DE EHRlich ASCÍTICO**

Maceió – AL

2023

EVERLAINE LEITE ESTEVAM DOS SANTOS

**EFEITO ANTITUMORAL DO TRITERPENÓ PENTACÍCLICO FRIEDELINA NO
MODELO MURINO DE CARCINOMA DE EHRlich ASCÍTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Janylle Nunes de Souza Ferro.

Maceió – AL

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237e Santos, Everlaine Leite Estavam dos.
Efeito antitumoral do triterpeno pentacíclico friedelina no modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico / Everlaine Leite Estavam dos Santos. – Maceió, 2023.
100 f. : il.

Orientadora: Janylle Nunes de Souza Ferro.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 89-99.
Anexos: f. 100.

1. Neoplasias. 2. Plantas medicinais. 3. Estresse oxidativo. 4. Inflamação. 5. Angiogênese. I. Título.


CDU: 615.277

Folha de Aprovação

EVERLAINE LEITE ESTEVAM DOS SANTOS


Efeito antitumoral do triterpeno pentacíclico friedelina no modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à banca examinadora do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas e aprovado em 26 de Janeiro de 2023.


Documento assinado digitalmente
 JAMYLLÉ NUNES DE SOUZA FERRO
Data: 29/01/2023 21:28:21-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

(Orientadora – Prof^ª. Dr^ª. Janylle Nunes de Souza Ferro, Universidade Federal de Alagoas)

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 MARVIN PAULO LINS
Data: 30/01/2023 11:16:48-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

(Examinador Externo - Prof^º. Dr^º. Marvin Paulo Lins, Uninassau)

Documento assinado digitalmente
 MARCELO DUZZIONI
Data: 30/01/2023 12:48:59-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

(Examinador Interno – Prof^º. Dr^º. Marcelo Duzzioni, Universidade Federal de Alagoas)

Dedico esta conquista a Deus e à minha família que esteve comigo nos momentos mais alegres e intensos da minha vida. Em especial à minha mãe Ana Maria, que sempre acreditou nos meus sonhos. Ao meu pai Edson Estevam, (*in memoriam*) que nos foi arrancado tão cedo por essa doença terrível, mas que me deixou um rastro de coragem e determinação para ir em busca dos meus objetivos, e ao meu irmão Everton Gabriel, (*in memoriam*) que certamente sabia que este dia chegaria.

Dedico ainda àqueles que morreram e aos que vivem, assim como eu, com a esperança de que algum dia o câncer seja uma doença cada vez menos devastadora de corpos, almas, sonhos e esperanças.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um dos mais sublimes sentimentos, pois carrega outros tesouros que vão além do eu. É um dos sentimentos mais difíceis de expressar em palavras pois vão além delas, e foi durante a minha trajetória acadêmica que consegui aprimorar o valor desse nobre sentimento. Diferentes pessoas cruzaram o meu caminho durante a graduação ou até antes dela, mas que eu as considero fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado me consolando e me dando ânimo e forças para eu não desistir dos meus sonhos, mesmo que em trilhas árduas e muitas vezes insustentáveis. Por sempre cuidar de mim. Mesmo eu não merecendo, a sua graça repousa sobre mim.

À minha família que esteve comigo em todos os momentos sendo apoio, força e fonte de determinação, em especial aos meus irmãos Everton (*in memoriam*), Everline, Daniel, Jadson, Wellington e Geysse. À minha rainha, minha mãe Ana, meu porto seguro que tomou meus sonhos como seus e com toda certeza é o meu motor diário desde sempre. Ao meu pai, Edson (*in memoriam*) que sabia que esse dia chegaria e que durante o pouco tempo que viveu conosco foi fonte de força e esperança até seu último minuto, mesmo quando tudo era desfavorável. À minha filha Helô, meu maior tesouro, o presente de Deus que eu nem sabia que precisava tanto, sua vida desde o ventre é um milagre e fonte de força e amor em todos os momentos da minha vida, e ao Ivonaldo, por tudo que um dia foi para mim, para nós. Aos meus avós, Maria Lúcia e Valdemar, por terem estado comigo em momentos tão angustiantes. À minha avó, Maria Queiroz e minha tia Leni, (*in memoriam*) por todo amor e cuidado.

Aos meus colegas e amigos de trabalho que estiveram comigo, me incentivando e me animando a cada momento e que foram cruciais para que eu conseguisse conciliar por um longo período a jornada árdua de trabalho, graduação e mãe; Salesiana, Amanda, Lau, Ally, Thays, Diná, Ere, Netto, Alex, Wanderson, Wagner, Wellingta, Nathy, Natália, Fran e Marcelo. Meus supervisores e amigos Jefferson (*in memoriam*) e Ângela, esta que se tornou amiga e que hoje tem por mim um sentimento de mãe, obrigada por tudo.

Aos meus colegas e amigos companheiros de turma que foram tão importantes para o cumprimento dessa fase tão cheia de boas memórias; Ariane, Diogo, Grazy, Carla, Isaelly, Camilla, Aminie, Grazy soninho, Roberta, Liz, Carala, Jefferson, Thayla, Andressa, Luciana e Talita, obrigada por tanto carinho por mim e minha filha no momento mais especial da minha vida. E à Zaïne, Alderis, Martinha, Lisiane, Suianne, Thuelly, Alícia, Mel, Nanda, Leo, Neildson e Lays que me acolheram tão bem.

Às minhas amigas Bárbara, Alexandra, Roberta, Biarianazinha, (vulgo Beatriz) e Laura que sempre acreditaram que eu podia conquistar o que eu quisesse. À eles, Rafa, Aline e Larissa que são os donos das minhas melhores risadas e que são cheios de paz e resiliência e trouxeram um pouco disso para mim.

Aos meus professores que foram e são fontes de inspiração desde o ensino fundamental, médio e acadêmico. Obrigada por acreditarem tanto em mim, Margarete, Wagner, Ewe, Rosa, Joziane, Polyanne, Vivian, Paulo, Cristiano, Pércia, Luiz, Liriane, Jorge, Gilberto, Gaban, Emiliano, Danielma, Marvin, Tereza, Dalmo e Nandinha.

Agradeço à toda família LBC, em especial aquela que me ensinou tanto em tão pouco tempo, e não foram apenas técnicas laboratoriais, foi sobre vivências, autorrespeito, limites e tantas outros tesouros que eu levarei para toda vida, minha Nalvinha (*in memoriam*), nossa eterna peixinha que até hoje transborda amor e luz em nossos corações. À Ju, por todo suporte e ensinamentos, pelo seu carinho e cuidado comigo e minha filha, pela profissional incrível que é. Aos que me ensinaram tanto desde a minha chegada ao laboratório, Poli, Nanda, Julius, Camilla, Lilian, Lili, Ana da física, Jordana, Ray, Ana, Keyla, Felipe, Karen, Êlo e Tay (obrigada por cada palavra e cada ensinamento que ultrapassaram as paredes do LBC). Aos professores pesquisadores do LBC que juntamente a minha orientadora são fonte de amor e esperança pela Ciência no Brasil, Maria Danielma (uma daquelas pessoas que quero colocar em um potinho e levar para a vida toda, obrigada por tudo), Marvin Lins (a fonte da calma que me inspira tanto), Emiliano Barreto e Alexandre borbely, inspirações na pesquisa científica. Agradeço aos que fazem parte e aos que passaram pelo grupo de pesquisa o qual atualmente faço parte, por dividirem comigo horas incontáveis de trabalho, Jennifer, James, Débora, Cecília, Ellen, Fernanda, Cleidiane, Thamyres e Luana. Aos meus companheiros que me ensinaram tanto e estiveram comigo em experimentos de até 17 horas, Marcus e Eduarda.

Àqueles que estiveram comigo e nunca me abandonaram. Que conhecem meus monstros, meus anjos, meus medos, meus anseios, meus desejos, meu melhor e minhas frustrações. Que foram colo, ombro, ouvidos, abraços e gritos, foram calma, foram furação. Eu amo demais e sei que a jornada não teria sido a mesma sem vocês, obrigada por tudo e por tanto Matheus, Mirele, Mona, Poli e Tay (incluindo tutu aqui).

À minha ori, Jamylle Ferro, pela oportunidade de realizar o meu sonho de conhecer um pouco do mundo da Ciência aplicada ao câncer, por ter me proporcionado momentos de aprendizado dentro e fora do LBC, e ter estado comigo e me iniciado tão bem nesta jornada tão árdua que é fazer Ciência no Brasil. Por ter depositado sua confiança em mim, e nos meus momentos mais sombrios ter sido o fôlego que me inspira a continuar nesse caminho. Por ser

fonte de inspiração e aprendizagem. Que quando eu mais precisei esteve comigo e foi mais que a minha orientadora, tornou-se ouvido, voz e colo.

Por fim, agradeço as agências de fomento à pesquisa brasileira por persistirem e lutarem para que a Ciência seja valorizada no país. À coordenação do curso e a todo o corpo docente que fizeram parte dessa conquista. Aos membros da banca avaliadora pela disponibilidade e pelas importantes contribuições.

“A doença é a zona noturna da vida, uma cidadania mais onerosa. Todos que nascem têm dupla cidadania, no reino dos sãos e no reino dos doentes. Apesar de todos preferirmos só usar o passaporte bom, mais cedo ou mais tarde nos vemos obrigados, pelo menos por um período, a nos identificarmos como cidadãos desse outro lado.” (Susan Sontag, 2007).

RESUMO

A friedelina (FD) é um metabólito secundário presente em diferentes espécies vegetais com importantes atividades farmacológicas descritas, que incluem as ações anti-inflamatória, antioxidante, antidiabética e neuroprotetora. Recentemente, foi relatado que a FD possui efeito citotóxico e apoptótico *in vitro* em células de adenocarcinoma mamário humano e leucemia humana, ilustrando sua promessa como potencial candidato para o desenvolvimento de fármacos no tratamento do câncer. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antitumoral da FD frente ao modelo murino de tumor de Ehrlich ascítico (tEa). Após a padronização do modelo de tEa na UFAL, camundongos *Swiss* fêmeas induzidos com tEa foram distribuídos em 5 grupos (Controle tumoral, 5-Fluorouracil 200 $\mu\text{mol/Kg}$, Etanol 2% e FD em duas doses, 50 e 200 $\mu\text{mol/Kg}$) e tratados por 5 dias consecutivos. Nos dias 1, 6 e 11, foram registrados o peso, a circunferência abdominal dos animais e realizada a captura de imagens fotográficas e de raio-X. Após o último tratamento, os animais foram eutanasiados para a coleta e quantificação do líquido tumoral, celularidade, análise morfológica das células tumorais, análise de mediadores do estresse oxidativo e inflamatórios, morte celular, angiogênese e análise da expressão gênica por RT-qPCR de enzimas antioxidantes e proteínas envolvidas na apoptose celular. Foi observado a influência da idade dos animais e do tempo da tumorigênese no desenvolvimento e progressão tumoral no modelo de tEa, permitindo traçar um protocolo experimental para análise farmacológica de substâncias com potencial efeito antitumoral. A FD apresentou perfil citotóxico na cultura primária de células do tEa e reduziu de forma significativa todos os parâmetros do desenvolvimento tumoral avaliados neste trabalho, com redução da celularidade total, tumoral e de leucócitos, e diminuição do infiltrado de neutrófilos e macrófagos, com índice de inibição do desenvolvimento tumoral semelhante ao fármaco utilizado como controle em uma dose 4 vezes menor que a do quimioterápico amplamente utilizado na prática clínica. A FD atenuou os níveis de EROs e aumentou a expressão gênica das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Além disso, a FD induziu apoptose celular pela modulação de marcadores envolvidos na cascata de sinalização da apoptose e reduziu a angiogênese tumoral suprimindo a secreção do fator de crescimento endotelial pelas células tumorais. A atividade antiproliferativa da FD no modelo de tEa culminou no aumento do tempo de sobrevivência e da expectativa de vida de camundongos portadores do tEa. Pode-se concluir que a FD se mostra como uma molécula com potencial antitumoral sendo capaz de modular o microambiente tumoral e promover apoptose celular, inibindo a progressão tumoral no modelo de tEa.

Palavras-chave: câncer; planta medicinal; estresse oxidativo; inflamação; angiogênese.

ABSTRACT

Friedelin (FD) is a secondary metabolite present in different plant species with important pharmacological activities described, which include anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic, and neuroprotective actions. Recently, it was reported that FD has cytotoxic and apoptotic effects *in vitro* on human breast adenocarcinoma and human leukemia cells, illustrating its promise as a potential candidate for drug development in the treatment of cancer. Thus, the objective of this work was to investigate the antitumor activity of FD against the murine model of Ehrlich ascitic tumor (tEa). After standardizing the tEa model at UFAL, Swiss female mice induced with tEa were distributed into 5 groups (Tumor control, 5-Fluorouracil 200 $\mu\text{mol/Kg}$, 2% Ethanol, and FD in two doses, 50 and 200 $\mu\text{mol/Kg}$) and treated by 5 consecutive days. On days 1, 6, and 11, the animals' abdominal circumference weight was recorded and photographic and X-ray images were captured. After the last treatment, the animals were euthanized for collection and quantification of tumor fluid, cellularity, morphological analysis of tumor cells, analysis of oxidative and inflammatory stress mediators, cell death, angiogenesis, and analysis of gene expression by RT-qPCR of enzymes antioxidants and proteins involved in cell apoptosis. The influence of the age of the animals and the time of tumorigenesis on tumor development and progression in the tEa model was observed, allowing the design of an experimental protocol for the pharmacological analysis of substances with potential antitumor effects. FD showed a cytotoxic profile in the primary culture of tEa cells and significantly reduced all parameters of tumor development evaluated in this work, with a reduction in total, tumor, and leukocyte cellularity, and a decrease in the infiltrate of neutrophils and macrophages, with an index of inhibition of tumor development similar to the drug used as a control at a dose 4 times lower than that of the chemotherapy widely used in clinical practice. FD attenuated the levels of ROS and increased the gene expression of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase. Furthermore, FD induced cellular apoptosis by modulating markers involved in the apoptosis signaling cascade and reduced tumor angiogenesis by suppressing endothelial growth factor secretion by tumor cells. The antiproliferative activity of FD in the tEa model culminated in the increase in survival time and life expectancy of mice carrying tEa. It can be concluded that FD is shown to be a molecule with antitumor potential, being able to modulate the tumor microenvironment and promote cell apoptosis, inhibiting tumor progression in the tEa model.

Keywords: cancer; medicinal plant; oxidative stress; inflammation; angiogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- <i>Hallmarks</i> do câncer.....	24
Figura 2	- Visão geral dos componentes celulares do microambiente tumoral.....	25
Figura 3	- Linha do tempo dos principais marcos na oncologia moderna.....	29
Figura 4	- Visão geral dos mecanismos da terapia alvo molecular.....	30
Figura 5	- Estrutura molecular da friedelina.....	40
Figura 6	- Delineamento experimental dos ensaios de padronização, frente a cinética temporal, do modelo tumoral de Ehrlich ascítico.....	45
Figura 7	- Representação esquemática da reação de redução do sal MTT no ensaio de viabilidade celular.....	46
Figura 8	- Delineamento experimental dos ensaios de avaliação da atividade antitumoral da friedelina no modelo tumoral de Ehrlich ascítico.....	48
Figura 9	- Esquema da quantificação da área peritoneal a partir de imagens de raio-X de camundongos portadores do tEa.	49
Figura 10	- Análise da influência da idade de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas no desenvolvimento do tEa.....	56
Figura 11	- Cinética do desenvolvimento tumoral em camundongos portadores do tEa.....	58
Figura 12	- Perfil celular presente na cavidade peritoneal de camundongos <i>Swiss</i> saudáveis e de animais portadores do tEa.....	59
Figura 13	- Efeito da friedelina <i>in vitro</i> na viabilidade de células do carcinoma de Ehrlich ascítico.....	60
Figura 14	- Efeito da friedelina frente aos parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral no modelo de tEa.....	62
Figura 15	- Acompanhamento macroscópico por imagens da cinética de desenvolvimento tumoral no tEa.....	63

Figura 16	- Efeito da friedelina na modulação do perfil celular do tEa.	65
Figura 17	- Efeito da friedelina no tempo de sobrevivência de camundongos portadores do tEa.....	66
Figura 18	- Efeito da friedelina na secreção da citocina inflamatória TNF- α no microambiente do tEa.	68
Figura 19	- Efeito da friedelina na modulação do estresse oxidativo no microambiente do tEa.	69
Figura 20	- Efeito da friedelina na viabilidade de células do tEa.....	70
Figura 21	- Efeito da friedelina na morfologia de células tumorais do modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico.....	72
Figura 22	- Efeito da friedelina morte celular e na modulação do ciclo celular de células do tEa.....	74
Figura 23	- Efeito da friedelina na angiogênese tumoral no modelo murino de tEa.....	76
Figura 24	- Resumo gráfico dos efeitos da friedelina no tEa.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Principais fármacos antitumorais utilizados na prática clínica e seus efeitos adversos.....	31
Tabela 2	– Grupos experimentais utilizados na padronização do modelo de tumor de Ehrlich ascítico frente a idade dos animais.....	44
Tabela 3	– Grupos experimentais utilizados na avaliação da atividade antitumoral da friedelina.....	47
Tabela 4	– Lista dos genes utilizados para análise de RT-qPCR.....	54
Tabela 5	– Efeito da friedelina na inibição da progressão tumoral no modelo de tEa.....	66
Tabela 6	– Efeito da friedelina na sobrevivência de camundongos portadores do tEa....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
a.C.	Antes de Cristo
Actb	β -Actina
AML-196	Linhagem celular de leucemia humana
Bcl2	<i>B cell leukemia/lymphoma 2</i>
BIOCEN	Biotério Central
CAM	<i>Chick chorioallantoic membrane</i>
Cat	Catalase
cDNA	Fita de DNA complementar
Célula Treg	Linfócito T regulador
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
cm²	Centímetros quadrados
CXCL-12	Quimiocina do tipo C-X-C (C-X-C motif chemokine 12)
CXCR4	Receptor de quimiocina do tipo C-X-C (<i>C-X-C chemokine receptor 4</i>)
CXCR7	Receptor de quimiocina do tipo C-X-C (<i>C-X-C chemokine receptor 7</i>)
d.C.	Depois de Cristo
D.O.	Densidade óptica
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCF	Diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico

EAC	<i>Ehrlich ascites carcinoma</i>
ELISA	<i>Enzime-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPCs	<i>Endothelial progenitor cells</i>
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH	Etanol
FD	Friedelina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Flt-1	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
g	Gramas
H₂DCFH-DA	2',7'- diacetato diclorofluoresceína
HSP70	Chaperonas
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IARC	<i>Internacional Agency For Research On Cancer</i>
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
ICT	Inibição do Crescimento Tumoral
IEV	Incremento na Expectativa de Vida
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de propídeo
KOH	Hidróxido de potássio
LBC	Laboratório de Biologia Celular
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MDSCs	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>

mg/Kg	Miligramas por quilogramas
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mL/Kg	Mililitro por quilograma
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MT	Microambiente Tumoral
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NBT	nitroblue tetrazólio
NF-κB	Fator nuclear Kappa B
nm	Nanômetro
NT	Não tumoral
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para análise
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg/mL	Picograma por mililitro
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Número de rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
SBF	<i>Serum Bovine Fetal</i> (Soro Bovino Fetal)
Sod-1	Superóxido desmutase 1

tEa	Tumor de Ehrlich ascítico
TEM	Transição Epitelial Mesenquimal
TM	Tumoral
TMS	Tempo Médio de Sobrevida
TNF-α	<i>Tumoral necrosis factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
v.i.	Via inalatória
VEGF	<i>Vascular endothelial growth fator</i> (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
WHO	<i>World Health Organization</i>
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$\mu\text{mol/Kg}$	Micromols por quilograma

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
US\$	Dólar americano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Câncer.....	23
2.2	Tratamentos do câncer.....	28
2.3	Modelos experimentais na quimioterapia do câncer.....	35
2.3.1	Tumor de Ehrlich.....	36
2.4	Produtos naturais e o câncer.....	38
2.5	Friedelina.....	39
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivo geral.....	41
3.2	Objetivos específicos.....	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	Reagentes e soluções.....	42
4.2	Friedelina.....	42
4.3	Animais	42
4.4	Obtenção e manutenção da matriz doadora do carcinoma de Ehrlich ascítico.....	43
4.5	Indução tumoral e padronização do modelo experimental de Ehrlich ascítico.....	43
4.6	Análise de viabilidade celular após o tratamento com friedelina <i>in vitro</i>	46
4.7	Grupos experimentais e tratamento com friedelina <i>in vivo</i>.....	47
4.7.1	Parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral.....	49

4.7.2	Análise de sobrevida.....	50
4.7.3	Ensaio de viabilidade celular <i>ex vivo</i>	51
4.7.4	Análise morfológica das células tumorais e perfil de células imunes.....	51
4.7.5	Análise das fases do ciclo celular.....	51
4.7.6	Quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular.....	52
4.7.7	Quantificação do ânion superóxido por NBT.....	52
4.7.8	Quantificação de citocinas por ELISA.....	52
4.7.9	Quantificação de morte celular.....	53
4.7.10	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.....	53
4.7.11	Análise da angiogênese tumoral.....	54
4.8	Análises estatísticas.....	54
5	RESULTADOS.....	55
5.1	Caracterização do desenvolvimento tumoral do modelo experimental de Ehrlich ascítico.....	59
5.2	Avaliação da atividade antitumoral da friedelina no modelo murino de carcinoma Ehrlich ascítico.....	59
5.2.1	Efeito da friedelina na viabilidade de células do tEa <i>in vitro</i>	59
5.2.2	A friedelina reduz o desenvolvimento tumoral no modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico.....	60
5.2.3	A friedelina aumenta o tempo de sobrevida de camundongos portadores do tEa.....	66
5.2.4	A friedelina modula mediadores inflamatórios e do estresse oxidativo no microambiente do tEa.....	67
5.2.5	A friedelina induz a morte celular e interfere nas fases do ciclo celular de células do tEa.....	69

5.2.6	A friedelina reduz a angiogênese tumoral associada a progressão do tEa.....	75
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	86
	PERSPECTIVAS	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

Define-se como câncer um conjunto de doenças que têm em comum a presença de células em proliferação desordenada que se agrupam dando origem a tumores malignos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As neoplasias malignas são doenças multifatoriais que surgem a partir do acúmulo de mutações gênicas mediadas por erros durante a replicação do Ácido desoxirribonucleico (DNA) ou pela exposição aos oncopromotores (WHO, 2022). O processo de formação de células neoplásicas é definido por carcinogênese, sendo caracterizado pela ocorrência de mutações genéticas que levam a ativação de proto-oncogenes em oncogenes, responsáveis por transformar células normais em neoplásicas (INCA, 2022). O câncer é uma doença complexa e intimamente regulada por componentes celulares, moleculares e bioquímicos do microambiente tumoral ao mesmo tempo em que as células cancerígenas modulam os componentes desse microambiente favorecendo a progressão tumoral (FEITOSA *et al.*, 2021).

O microambiente tumoral (MT) é formado por uma rede complexa de células saudáveis locais e recrutadas formando o estroma, além das células neoplásicas (FEITOSA *et al.*, 2021). A complexa sinalização molecular e bioquímica neste MT favorece a manutenção e a progressão tumoral (FEITOSA *et al.*, 2021). Um exemplo dessa modulação é a inflamação, um processo fisiopatológico envolvido na patogênese de diferentes doenças, dentre elas o câncer (GUO *et al.*, 2013). Após a formação do tumor, o processo inflamatório pró-carcinogênico é ativado levando ao recrutamento de células imunes que passam a desenvolver atividades voltadas para a manutenção de um ambiente favorável à progressão tumoral, com a liberação de citocinas e quimiocinas que favorecem um MT inflamatório (BURKHOLDER *et al.*, 2014), além das espécies reativas de oxigênio, que em alguns tipos de cânceres, podem promover a proliferação, a migração, a invasão, a angiogênese e a metástase celular.

As neoplasias malignas estão entre as causas mais comuns de mortalidade no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2040, haverá cerca de 28,9 milhões novos casos de câncer e 16,2 milhões de mortes. No Brasil, a estimativa é que ocorra um aumento de 80,9% no número de mortes por câncer até 2040 (IARC, 2022). De acordo com a OMS (2022), a incidência de câncer aumenta com a idade, devido a maior exposição aos carcinógenos, combinado com a redução dos mecanismos de reparo celular. As principais terapias empregadas no tratamento do câncer são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia, sendo ainda a quimioterapia o tratamento com maior grau de eficiência, entretanto, os quimioterápicos atualmente utilizados vêm acompanhados de vários efeitos

adversos graves que prejudicam a qualidade de vida do paciente diminuindo a adesão ao tratamento (ACS, 2016). Além disso, por se tratarem de doenças heterogêneas, alguns tipos de cânceres não respondem aos quimioterápicos utilizados, levando, nesses casos, a um mau prognóstico (INCA, 2020). Nesse cenário, a busca por terapias alternativas que visam a diminuição dos efeitos adversos e uma melhor resposta ao tratamento são fundamentais para um melhor prognóstico dos pacientes.

Devido à grande diversidade de moléculas com potencial terapêutico, os produtos naturais continuam sendo importantes fontes de bioativos para o desenvolvimento de fármacos no tratamento e na prevenção de diversas doenças, dentre elas o câncer. Estima-se que cerca de 60% dos fármacos utilizados na quimioterapia do câncer sejam originados de moléculas encontradas na natureza, o que impulsiona as pesquisas por moléculas naturais com potencial terapêutico (DUTRA *et al.*, 2016). A friedelina é um metabólico secundário encontrado em diversas espécies vegetais que tem demonstrado importantes atividades biológicas como os efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antinociceptivo, antidiabético, antiulcerogênico, cicatrizante e neuroprotetor (ARAÚJO *et al.*, 2019; SUNIL *et al.*, 2013; SUNIL *et al.*, 2021; SHI *et al.*, 2021; SOMWONG *et al.*, 2022; SANDHU *et al.*, 2022). Estudos recentes indicaram que a friedelina é uma molécula com potencial citotóxico *in vitro* por ser capaz de induzir a morte de células tumorais a partir da inativação de vias que promovem a manutenção e a progressão tumoral (SUBASH-BABU; LI; ALSHATWI, 2017; CHANG; WANG; XIAO, 2020), entretanto, o efeito antitumoral *in vivo* desse triterpeno natural ainda é desconhecido. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral da friedelina no modelo experimental de tumor de Ehrlich ascítico, um adenocarcinoma murino com alto poder tumorigênico que tem sido amplamente utilizado na avaliação da atividade antitumoral de moléculas (SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O termo câncer refere-se a um conjunto de doenças caracterizadas pela presença de células em contínua proliferação, com propriedades que possibilitam a sobrevivência, a proliferação e a metástase celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essas doenças possuem uma elevada incidência, e de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2022), a estimativa é que entre os anos de 2020 a 2040 ocorram cerca de 28,9 milhões de novos casos em todo mundo. No Brasil, a estimativa é que ocorram 995 mil novos casos de câncer atrelados a um aumento de 80,9% do número de mortes por câncer até 2040. No mundo o câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente em mulheres, possuindo ainda uma alta taxa de mortalidade. No Brasil em 2020, foram registradas 17.825 mortes por esse tipo de câncer (INCA, 2022). Os fatores de risco mais comuns associados ao desenvolvimento do câncer de mama feminino incluem fatores genéticos como mutações no gene BCRA1 e BCRA2 e hereditários, idade acima de 50 anos, menopausa tardia e obesidade (BRAY *et al.*, 2018)

Depois das doenças cardiovasculares, o câncer é a segunda principal causa de mortalidade associada a doenças no mundo (WHO, 2020). Em 2010, a OMS estimou que, no mundo, o custo anual total da doença foi de US\$ 1,16 trilhão (WHO, 2018), o que destaca a repercussão negativa do câncer na saúde e na economia mundial. Estudos recentes demonstram o impacto da pandemia da COVID-19 no diagnóstico e no tratamento do câncer (JONES *et al.*, 2020; ADDEO; FRIEDLAENDER, 2020). De acordo com a OMS, houve a suspensão do tratamento contra o câncer em mais de 40% dos países pesquisados atrelada ao aumento no abandono da terapia durante a pandemia, trazendo um impacto ainda não mensurado na saúde e na economia mundial (WHO, 2020), podendo trazer um aumento crítico na estimativa de mortes por câncer nos próximos anos.

As neoplasias malignas são doenças multifatoriais que surgem a partir do acúmulo de mutações gênicas mediadas por erros durante a replicação do DNA, ou pela exposição, geralmente crônica, a oncopromotores, sejam eles químicos, físicos ou biológicos (WHO, 2020). O processo de formação de células neoplásicas é definido por carcinogênese, sendo caracterizado pela ocorrência de mutações genéticas que levam a ativação de proto-oncogenes em oncogenes - responsáveis por transformar células normais em neoplásicas (INCA, 2022). O processo de carcinogênese pode ser dividido em 3 etapas que se relacionam entre si denominadas de iniciação, promoção e progressão tumoral (INCA, 2022). A fase de iniciação

é desencadeada por agentes que causam danos que podem ser irreversíveis ao material genético de células saudáveis. Na etapa de promoção, as células mutadas geram células filhas com mutações iniciais e essas células sofrem o efeito de oncopromotores, responsáveis por transformar essas células em malignas de forma lenta e gradual. O terceiro e último estágio da carcinogênese é a progressão, em que as células malignas se multiplicam de forma descontrolada e irreversível (INCA, 2022). Esse processo se repete diversas vezes durante a vida, entretanto, na maioria dos casos, o câncer não se estabelece, pois, o sistema imunológico do hospedeiro evoluiu para combater e eliminar células cancerígenas, ao mesmo tempo em que as células cancerígenas evoluíram com mecanismos que garantem a sobrevivência e a progressão celular.

Diferentes mecanismos são utilizados pelas células tumorais para a manutenção da carcinogênese. De acordo com Hanahan e Weinberg (2011) as células cancerígenas possuem algumas características marcantes que permitem a sobrevivência e a progressão tumoral ilustradas na Figura 1.

Figura 1 – *Hallmarks* do câncer.

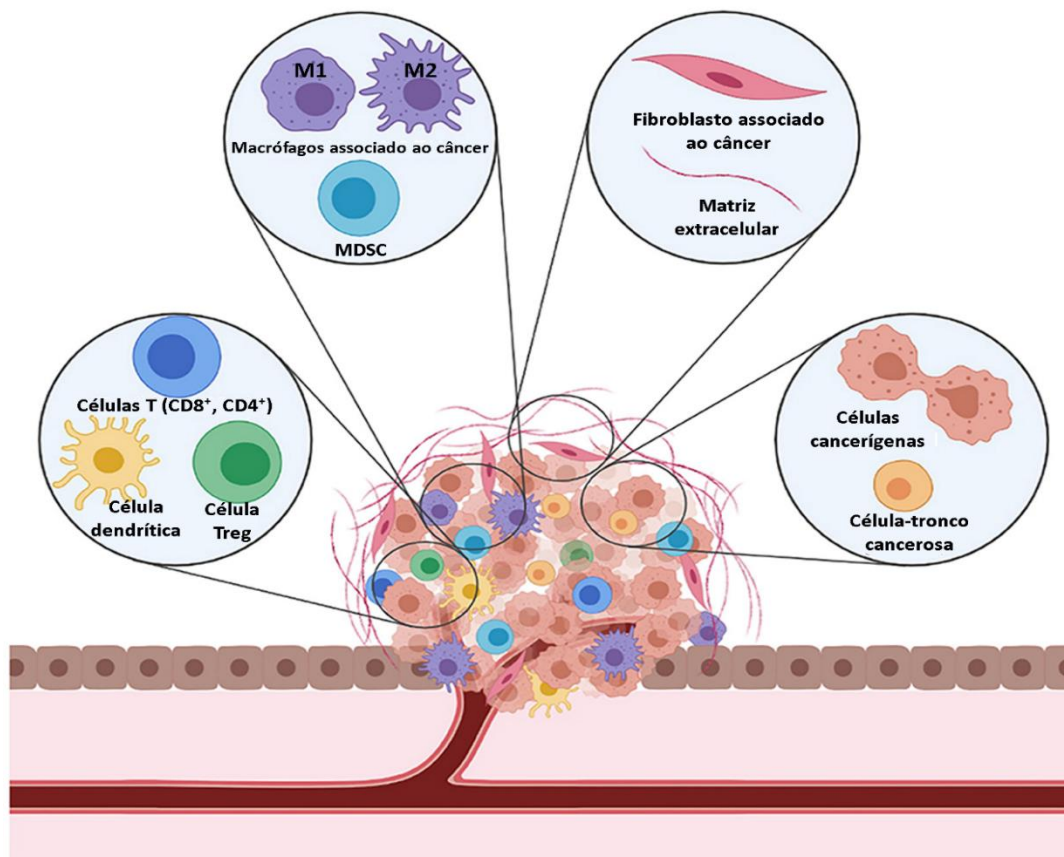


Fonte: Modificado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Assim, os tumores malignos exibem alta complexidade, pois, além das células

neoplásicas possuem células saudáveis recrutadas que formam o estroma tumoral que contribui para a aquisição de diferentes características marcantes que promovem a formação do microambiente tumoral (MT) (FEITOSA *et al.*, 2021). Nos últimos anos, as investigações em relação aos componentes e ao funcionamento do microambiente tumoral cresceram, possibilitando não apenas a compreensão da biologia dos tumores, mas apresentando diferentes caminhos na terapêutica do câncer, a exemplo a descoberta da terapia do câncer pela compreensão da modulação de componentes imunológicos por James P. Allison e Tasuku Honjo, que foi destaque sendo responsável pelo prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2018. Uma complexa interação bioquímica e molecular entre as células neoplásicas e saudáveis, como células inflamatórias, fibroblastos e células endoteliais, tem sido descrita (KALLURI; ZEISBERG, 2006; OVERALL; KLEIFELD, 2006; DE VISSER *et al.*, 2006; BENAVENTE *et al.*, 2020). Além disso, a remodelação da matriz extracelular contribui com o microambiente tumoral, favorecendo a progressão, a migração, a disseminação e a promoção do crescimento neoplásico irrestrito (OVERALL; KLEIFELD, 2006; DE VISSER *et al.*, 2006; BENAVENTE *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2022) (Figura 2).

Figura 2 – Visão geral dos componentes celulares do microambiente tumoral.



Fonte: Modificado de BENAVENTE *et al.*, 2020.

Uma vez o tumor formado, o microambiente tumoral libera sinais para o início da resposta inflamatória na qual células imunes são recrutadas (BURKHOLDER *et al.*, 2014). No entanto, as células tumorais possuem diferentes mecanismos de escape do sistema imunológico sendo capazes de interferir nas etapas da resposta inflamatória antitumoral bloqueando e regulando as funções de células imunes, favorecendo a ativação de diversos mecanismos que promovem a manutenção e a progressão tumoral (BURKHOLDER *et al.*, 2014). Assim, nesse contexto, tem sido discutido o papel da inflamação no câncer, propondo que enquanto que a inflamação aguda induz a ativação da imunidade antitumoral pela maturação de células dendríticas e a ativação da vigilância imunológica (MA *et al.*, 2013), a inflamação crônica está envolvida no desenvolvimento de um microambiente imunossupressor com grande número de células imunossupressoras (macrófagos M2, MDSCs, células Treg, dentre outras) e citocinas, favorecendo assim o desenvolvimento e metástase tumoral, além de promover a resistência terapêutica (SHACTER; WEITZMAN, 2002; LI *et al.*, 2022). Após estabelecido um microambiente tumoral inflamatório, fatores inflamatórios produzidos por células tumorais ou por células intersticiais levam a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor, favorecendo a sobrevivência e a proliferação de células tumorais (RITTER; GRETEN; 2019). Além disso, células inflamatórias associadas ao tumor, como os Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs), secretam fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas inflamatórias que favorecem o MT para a evasão do sistema imune, a angiogênese e a progressão tumoral (GUO *et al.*, 2013). É o caso do TNF- α , uma das principais citocinas pró-inflamatórias, produzida principalmente por monócitos e macrófagos, que possui papel-chave na ativação de vias cruciais de retroalimentação da inflamação no câncer promovendo, por exemplo, a translocação do Fator nuclear Kappa B (NF- κ B) para o núcleo, acarretando em uma regulação positiva de diferentes quimiocinas e citocinas inflamatórias (PIKARSKY *et al.*, 2004; BAKSHI *et al.*, 2022). A desregulação de fatores inflamatórios no câncer é frequentemente causada por vias inflamatórias alteradas. Tomando como exemplo a via do NF- κ B, já foi descrito mais de 500 genes relacionados ao câncer e que são regulados por essa via inflamatória (TANIGUCHI; KARIN, 2018).

Dentre os componentes do microambiente tumoral inflamatório, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas com papéis controversos no contexto do câncer. É bem apresentado na literatura que células tumorais possuem níveis mais elevados de EROs que células saudáveis, provavelmente pela alta demanda energética requerida pelas células tumorais devido à alta taxa mitótica dessas células (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013). No entanto, as consequências do aumento dos níveis de EROs no tumor podem ser muito diferentes, com

evidências de que tanto suportam quanto inibem o comportamento maligno do câncer. Enquanto, o ambiente oxidativo favorece a progressão tumoral podendo essas moléculas funcionarem como agentes sinalizadores para promover a proliferação, a migração, a invasão, a angiogênese e a metástase celular, além de participar de forma ativa no processo inflamatório, oxidando biomoléculas como os lipídios e as proteínas, promovendo assim a ativação de sinais inflamatórios (CHEUNG; VOUSDEN, 2022). Em altos níveis no microambiente tumoral, as EROs podem causar danos celulares que podem culminar na morte celular por apoptose, podendo ainda aumentar a sensibilidade aos quimioterápicos (APPIERTO *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2022).

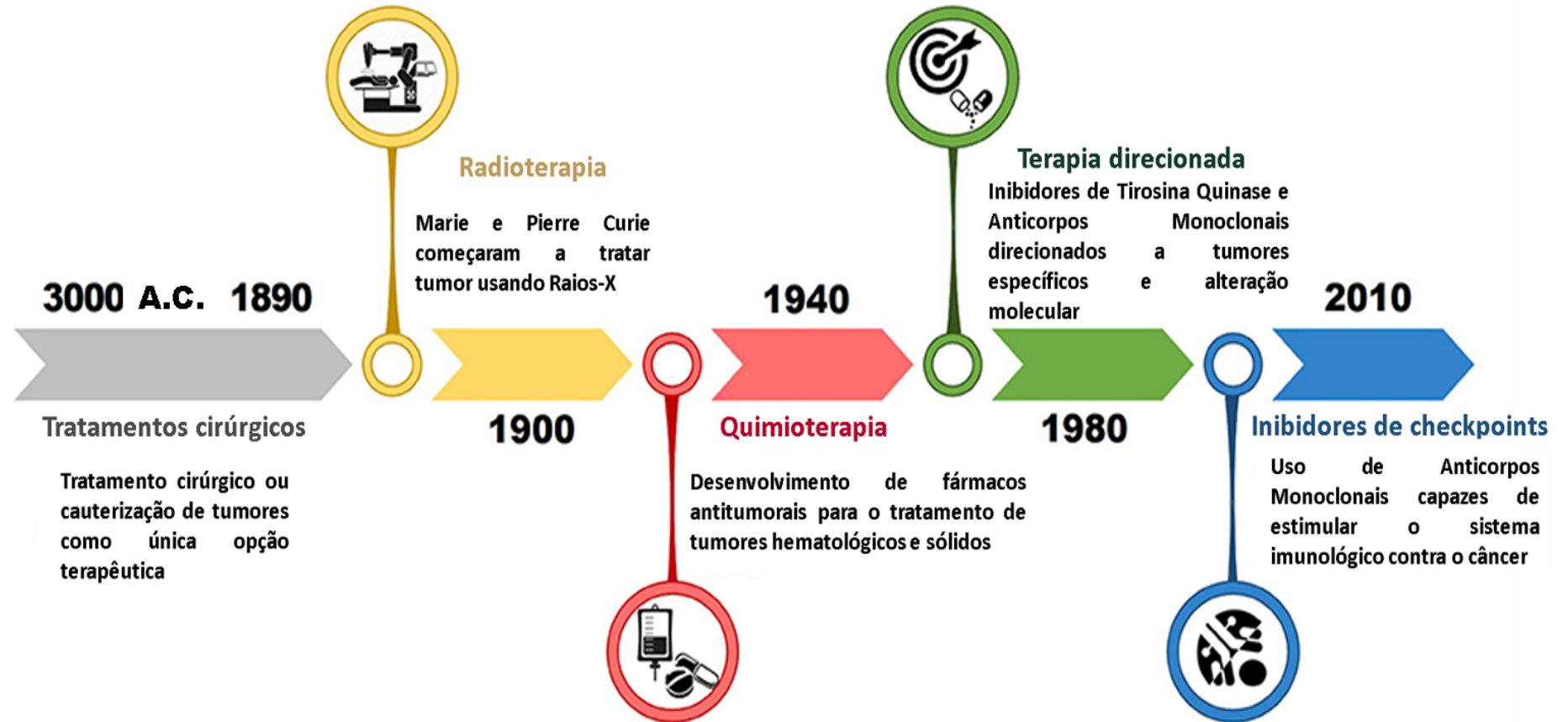
À medida que o tumor cresce, o tecido hiperproliferativo canceroso apresenta déficit nutricional e um ambiente hipóxico, levando a neovascularização (EULBERG *et al.*, 2022). De maneira geral, os tumores utilizam a formação de novos vasos como mecanismo primordial para o estabelecimento do suprimento sanguíneo (JIANG *et al.*, 2020). A angiogênese é definida por um processo fisiológico envolvido na patogênese de diferentes doenças e que é responsável pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes, promovido por fatores pró-angiogênicos, como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), um potente mitógeno de células endoteliais que após ligar-se aos seus receptores superficiais Flt-1 (Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular) e KDR/Flk-1, estimula a proliferação de células endoteliais promovendo a progressão, a invasão e a metástase tumoral (EULBERG *et al.*, 2022). O HIF-1 α é um fator transcricional importante na ativação do processo de angiogênese, uma vez que em resposta à hipóxia ou a inflamação, o HIF-1 α promove a ativação de fatores pró-angiogênicos como a quimiocina CXCL-12 que no microambiente tumoral atrai células EPCs CXCR4/CXCR7⁺ promovendo a revascularização tumoral (LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2020). O TNF- α é outra molécula que tem sido avaliada na patogênese do câncer por estimular a proliferação de células neoplásicas, promovendo a sua sobrevivência e a angiogênese tumoral (FOLKMAN; KLAGSBRUN; 1987; WANG *et al.*, 2017; BAKSHI *et al.*, 2022). Considerando a importância do mecanismo de angiogênese para a manutenção da carcinogênese, o nível de vascularização é considerado um dos marcadores prognósticos de sobrevida em pacientes com câncer (EULBERG *et al.*, 2022). No microambiente tumoral, o aumento da proliferação, de alterações genética das células cancerígenas, da inflamação relacionada ao tumor e da expressão aumentada de fatores pró-angiogênicos são fatores que ativam de maneira contínua a sinalização pró-angiogênica (JIANG *et al.*, 2020). Essa concordância sugere que o microambiente tumoral não apenas permite que as células cancerígenas se disseminem fisicamente, mas que também pode conferir a capacidade

de auto-renovação celular que é crucial na manutenção tumoral (BRABLETZ *et al.*, 2005; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

2.2 Tratamentos do câncer

O desenvolvimento das primeiras formas de tratamento direcionadas ao câncer datam de 1600 a.C. (papiro de Edwin Smith) no antigo Egito, onde a prática cirúrgica, ainda rudimentar, era utilizada na retirada de tumores de mama (BREASTED, 1930). Mas foi no início do século I d.C. quando as primeiras descrições de procedimentos cirúrgicos mais adequados ao tratamento oncológico surgiram, com incisões para excisão do tecido tumoral com margens de tecidos saudáveis, sendo até os dias atuais o pilar na terapia cirúrgica no câncer (WYLD; AUDISIO; POSTON, 2015). Desde então, os princípios cirúrgicos evoluíram e permanecem até os dias atuais como uma das principais formas de tratamento do câncer, entretanto, a depender do estágio da doença a terapia combinada é atualmente o manejo mais adequado na maioria dos cânceres. A quimioterapia surgiu no início do século XX, mas foi após a segunda guerra mundial que o desenvolvimento da quimioterapia direcionada ao câncer ganhou suas ramificações, seguida do aperfeiçoamento da radioterapia no tratamento de tumores malignos (DEVITA; CHU; 2008; FALZONE; SALOMONE; LIBRA, 2018) (Figura 3, p. 29). Atualmente, a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são as principais linhas no combate ao câncer, entretanto, devido as características distintas dos tumores e dos indivíduos, bem como a quimiorresistência, o desenvolvimento de terapias voltadas para o câncer tornou-se um dos maiores desafios da ciência (VISSER; JONKERS, 2009).

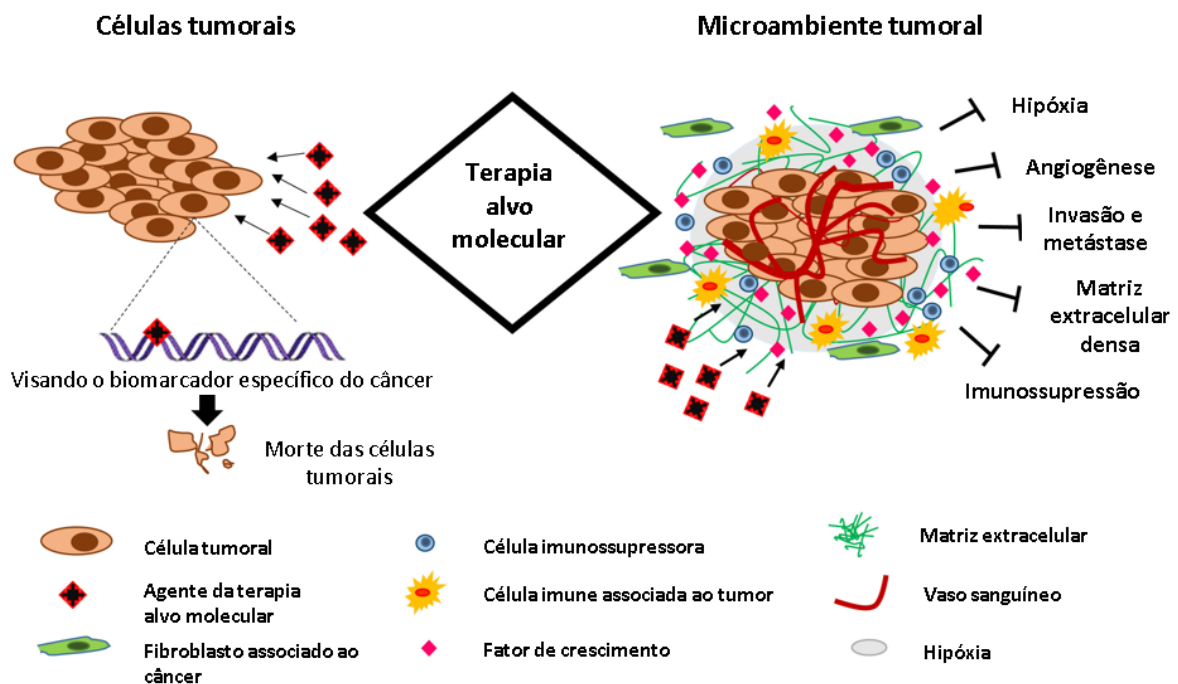
Figura 3 - Linha do tempo dos principais marcos do tratamento na oncologia moderna.



A oncologia moderna teve início após o desenvolvimento da radioterapia no início dos anos 1900, com a descoberta dos primeiros quimioterápicos por volta de 1940. Após esse marco, os avanços no campo da oncologia médica foram iniciados com o desenvolvimento da terapia-alvo em 1980. A última virada histórica ocorreu em 2010 com a introdução de inibidores de checkpoints imunológicos. Fonte: Modificado de FALZONE; SALOMONE; LIBRA, 2018.

Com os desafios apresentados na terapia do câncer, o surgimento de terapias complementares tornou-se necessária, como por exemplo as terapias de alvo molecular, possíveis graças às análises de biologia molecular que auxiliam na escolha de fármacos direcionadas a alvos específicos de células cancerígenas a fim de inibir o crescimento tumoral e induzir a morte das células neoplásicas a partir da modulação de diferentes alvos moleculares (Figura 4) (LEE; TAN; OON, 2018). Outra terapia promissora é a imunoterapia, que tem por princípio a ativação ou modulação do sistema imune do hospedeiro para combater células neoplásicas (DOBOSZ; DZIECIATKOWSKI, 2019), entretanto, a ativação da resposta imune de forma eficaz ainda é comprometida devido a imunossupressão, especialmente devido à baixa imunogenicidade dos tumores (HUANG *et al.*, 2022).

Figura 4 – Visão geral dos mecanismos da terapia alvo molecular.



A terapia alvo molecular no câncer é direcionada a moléculas altamente expressas em células cancerígenas ou na modulação do microambiente tumoral relacionado aos mecanismos de vasculatura tumoral, metástase ou hipóxia. Fonte: Modificado de LEE; TAN; OON, 2018.

Apesar dos avanços no desenvolvimento de diferentes terapias, a quimioterapia continua sendo a principal forma de tratamento no câncer, sobretudo devido ao seu alto grau de eficiência (VANNEMAN; DRANOFF, 2012). Entretanto, os efeitos adversos (Tabela 1) bem como a quimiorresistência são ainda importantes entraves nessa terapia (DEVITA; CHU; 2008; VISSER; JONKERS, 2009). Com isso, alternativas terapêuticas que visam a diminuição dos efeitos adversos dos quimioterápicos bem como a redução da resistência farmacológica tem sido amplamente estudadas, é o caso do uso combinado de fármacos quimioterápicos e de adjuvantes para a sensibilização de células neoplásicas (VANNEMAN; DRANOFF, 2012).

Tabela 1 – Principais fármacos antitumorais utilizados na prática clínica e seus efeitos adversos.

Fármaco	Indicações na oncologia	Efeitos adversos
Agentes antimetabólitos		
Bleomicina	Linfoma de Hodgkin; Sarcoma de Kaposi; Tumor de células germinativas do ovário; Tumor testicular de células germinativas.	Alterações dermatológicas; Distúrbios nos sistemas cardiovascular, gastrointestinal, vascular, imune e respiratório.
Carboplatina	Câncer cervical; Câncer de mama em estágio inicial; Câncer epitelial do ovário; Câncer de cabeça e pescoço (como radiosensibilizador); Glioma de baixo grau; Câncer de nasofaringe; Nefroblastoma (Tumor de Wilms) ; Câncer de pulmão de células não-pequenas; Osteosarcoma; Tumor de células germinativas do ovário; Retinoblastoma; Tumor testicular de células germinativas.	Tumores benignos, malignos e inespecíficos; Distúrbios cardíacos, vasculares, gastrointestinais, renais, hematológicos, linfático, do metabolismo e nutrição, no sistema nervoso nos olhos, no ouvido e labirinto, hepatobiliares, no sistema imune, pele e tecido subcutâneo, musculoesquelético e de tecido conectivo.

Folinato de cálcio	Linfoma de Burkitt; Câncer de cólon em estágio inicial; Câncer retal em estágio inicial; Neoplasia trofoblástica gestacional; Câncer colorretal metastático; Osteosarcoma.	Pirexia; reações anafilactóides e urticária; náuseas; vômito.
Fluorouracil	Câncer de mama em estágio inicial; Câncer de cólon em estágio inicial; Câncer retal em estágio inicial; Câncer colorretal metastático; Câncer de nasofaringe.	Distúrbios nos sistemas gastrointestinal, hematopoético, nervoso central, cardiovascular; distúrbios oculares, cutâneos, choque anafilático.
Metrotexato	Leucemia linfoblástica aguda; Leucemia promielocítica aguda; Linfoma de Burkitt; Câncer de mama em estágio inicial; Neoplasia trofoblástica gestacional; Osteosarcoma	Infecções e infestações; Neoplasias benignas, malignas e inespecíficas (incluindo cistos e pólipos); Distúrbios dos sistemas linfático e sangue, imune, nervoso, cardiovascular, gastrointestinal, renal e urinário, reprodutivo e mamas; distúrbios oculares, respiratórios, torácicos e do mediastino, hepatobiliares, da pele e do tecido subcutâneo, musculoesqueléticos, dos tecidos conjuntivo e ósseo, gerais.

Agentes alquilantes

Bendamustina	Leucemia linfocítica crônica; Linfoma folicular.	Infecções e infestações; Distúrbios nos sistemas gastrointestinal, cardiovascular, linfático, vascular, musculoesquelético, imune e
--------------	--	---

		respiratório.
Ciclofosfamida	<p>Leucemia linfoblástica aguda; Linfoma de Burkitt; Leucemia linfocítica crônica; Linfoma difuso de grandes células B; Câncer de mama em estágio inicial; Sarcoma de Ewing; Linfoma folicular; Neoplasia trofoblástica gestacional; Linfoma de Hodgkin; Glioma de baixo grau; Câncer de mama metastático; Mieloma múltiplo; Nefroblastoma (Tumor de Wilms); Rabdomyosarcoma.</p>	<p>Infecções e Infestações; neoplasias benignas, malignas e não especificadas (incluindo cistos e pólipos); Distúrbios do sangue, sistema linfático, cardíacos, vasculares, respiratórios, gastrointestinais, do sistema imune, endócrino, do metabolismo e de nutrição, do sistema nervoso, oculares, do ouvido e labirinto, Doenças psiquiátricas; hepatobiliares, dos tecidos cutâneos e subcutâneos, musculoesqueléticos e dos tecidos conjuntivos, renais e urinários.</p>
Cisplatina	<p>Câncer cervical; Câncer de cabeça e pescoço (como radiosensibilizador); Glioma de baixo grau; Câncer de nasofaringe (como radiosensibilizador); Câncer de pulmão de células não pequenas; Osteosarcoma; Tumor de células germinativas do ovário; Tumor testicular de células germinativas.</p>	<p>Nefrotoxicidade; Ototoxicidade; alterações hematológicas e Gastrintestinais; Distúrbios eletrolíticos séricos; Hiperuricemia; neurotoxicidade; Toxicidade ocular; Reações anafiláticas; Hepática; Alterações cardíacas; Distúrbios cutâneos.</p>
Ifosfamida	<p>Linfoma de Burkitt; Sarcoma de Ewing; Nefroblastoma (Tumor de Wilms); Tumor de células germinativas do ovário; Osteosarcoma;</p>	<p>Distúrbios transitórios de desorientação e confusão mental; alopecia; náusea e vômito; hematúria; hematúria grave; toxicidade no sistema nervoso</p>

	Rabdomiosarcoma; Tumor testicular de células germinativas.	central; infecção; insuficiência renal; disfunção hepática; flebite; febre; Distúrbios nos sistemas gastrointestinal, cardiovascular; alterações cutâneas.
--	--	--

Agentes antimetabólicos

Docetaxel	Câncer de mama em estágio inicial ou metastático e câncer de próstata metastático	Neutropenia, infecções e anemia severa, trombocitopenia.
Paclitaxel	Câncer cervical; Câncer epitelial de ovário; Câncer de mama em estágio inicial; Câncer de mama metastático; Sarcoma de Kaposi; Câncer de nasofaringe; Câncer de pulmão de células não pequenas; Tumor de células germinativas do ovário.	Toxicidades Hematológicas; Reações de Hipersensibilidade, Distúrbios cardiovasculares, respiratórios, neurológicos, hepáticos, gastrintestinais; Artralgia / Mialgia.
Vinblastina	Linfoma de Hodgkin; Sarcoma de Kaposi; Glioma de baixo grau; Tumor de células germinativas do ovário; Tumor testicular de células germinativas.	Alterações hematológicas, dermatológicas, gastrintestinais, neurológicas, cardiovasculares, pulmonares, renal/genitourinária.

Antibiótico citotóxico

Doxorrubicina	Leucemia linfoblástica aguda; Linfoma de Burkitt; Linfoma difuso de grandes células B; Câncer de mama em estágio inicial; Sarcoma de Ewing; Linfoma folicular; Linfoma de Hodgkin; Sarcoma de Kaposi;	Infecções e infestações; Neoplasmas benignos, malignos e não especificados (incluindo cistos e pólipos); Distúrbios do sangue e do sistema linfático, do sistema imunológico, metabólicos e
---------------	---	---

Câncer de mama metastático; Mieloma múltiplo; Nefroblastoma (Tumor de Wilms); Osteosarcoma.	nutricionais, oculares, cardíacos, vasculares, gastrointestinais, da pele e do tecido subcutâneo, renais e urinários, do sistema reprodutor e das mamas.
--	---

Modulador seletivo do receptor de estrogênio

Tamoxifeno	Câncer de mama em estágio inicial ou metastático.	Distúrbios nos sistemas sanguíneo e linfático, imune, nervoso, cardiovascular, gastrointestinal; distúrbios metabólicos e nutricionais, psiquiátricos.
------------	---	--

Anticorpo monoclonal

Trastuzumabe	Câncer de mama HER2 positivo em estágio inicial; Câncer de mama metastático HER2 positivo.	Infecções e infestações; Distúrbios nos sistemas sanguíneo e linfático, imune, nervoso, cardiovascular, gastrointestinal; distúrbios metabólicos e nutricionais, psiquiátricos, oculares, respiratórios, torácicos e do mediastino, de pele e tecido subcutâneo, musculoesqueléticos e do tecido conjuntivo, gerais e condições no local de administração, hepatobiliares, do ouvido e do labirinto; danos, intoxicação.
--------------	--	--

Fármacos antitumorais mais utilizados na prática clínica presentes na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde. Fonte: Modificado de WHO, 2021.

2.3 Modelos experimentais na quimioterapia do câncer

O desenvolvimento de modelos experimentais na busca por fármacos para o combate de doenças, teve início em 1908 por Paul Ehrlich, com o uso de modelo de coelho para sífilis, o que levou ao desenvolvimento de várias substâncias arsenicais para o tratamento dessa doença (DEVITA JR, CHU, 2008). Essa conquista levou a grandes ramificações nos avanços da quimioterapia, sobretudo no câncer após o desenvolvimento de modelos animais para a triagem de substâncias antitumorais (FALZONE; SALOMONE; LIBRA, 2018).

Atualmente, as análises de bioinformática, métodos *in vitro* e modelos pré-clínicos animais são essenciais no desenvolvimento de novos fármacos com atividade anticancerígena, permitindo a triagem de um arsenal de moléculas naturais ou sintéticas com potencial terapêutico. É o caso da ferramenta *in silico* de *docking* molecular por exemplo, que prevê a afinidade de ligação de um ligante ao seu receptor a partir de análises computacionais e que nos últimos anos tornou-se uma ferramenta chave no design de fármacos (FAN; FU; ZHANG, 2019). As análises *in vitro* são importantes ferramentas no entendimento da biologia dos tumores, bem como nos testes primários de substâncias com potencial antitumoral, com métodos que permitem tanto a triagem de moléculas com potencial citotóxico, como os ensaios colorimétricos, como por exemplo o teste MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e marcadores específicos para a identificação de tipos de morte celular, além de análises que avaliam o efeito de substâncias na função celular (BAHCECIOGLU *et al.*, 2020). Entretanto, os ensaios *in vitro* não representam a complexidade do sistema *in vivo*, bem como a complexidade do microambiente tumoral o qual as células neoplásicas estão inseridas, por isso, substâncias com alta eficiência em modelos tumorais *in vitro* podem não responder em modelos tumorais em animais e posteriormente em humanos, o que destaca a importância dos modelos animais para esse fim, tanto que atualmente se tornou o padrão-ouro como teste final para que qualquer tratamento empregado a doenças humanas possa avançar para os ensaios clínicos (BAHCECIOGLU *et al.*, 2020).

Existem vários modelos animais que permitem estudos que englobam a fisiopatologia do câncer, contribuindo para aplicações de testes de eficácia de terapias contra o câncer. Os camundongos são os animais mais utilizados como modelos tumorais nas pesquisas pré-clínicas, isso se dá devido ao estabelecimento de diferentes linhagens animais que contribuem para o entendimento da progressão tumoral de forma semelhante intraespecífica, possibilitando além do acompanhamento da manutenção tumoral, a reprodutibilidade das pesquisas (RANGARAJAN; WEINBERG, 2003; KANG *et al.*, 2022). Além disso, as similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos fazem com que modelos tumorais nesses animais bem como a resposta terapêutica de substâncias sejam semelhantes à de tumores humanos (CHEON;

ORSULIC, 2011; KUNNUMAKKARA *et al.*, 2022). Dentre os modelos tumorais *in vivo* mais utilizados, estão o Sarcoma 180 e o tumor de Ehrlich (DEVITA; CHU, 2008).

2.3.1 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich ascítico juntamente com o sarcoma 37 (S37), sarcoma 180 (S180) e Walker 256 foram os primeiros modelos tumorais murinos utilizados nos estudos para a compreensão da biologia e testes farmacológicos no câncer (DEVITA; CHU, 2008). O tumor de Ehrlich foi descrito inicialmente pelo químico alemão Paul Ehrlich, em 1896 como adenocarcinoma mamário espontâneo em camundongos de origem epitelial maligna (MATSUZAKI, 2004). Esse tumor possui alto poder tumorigênico, é isento de regressão espontânea, com crescimento rápido e a sua agressividade pode ser controlada pelo quantitativo do inóculo tumoral (FEITOSA *et al.*, 2021). A característica de ser um tumor transplantável de fácil manipulação e de baixo custo de manutenção, faz do tumor de Ehrlich um dos mais utilizados nas pesquisas pré-clínicas na farmacologia do câncer (FEITOSA *et al.*, 2021). A depender da via de inoculação, o tumor de Ehrlich pode se desenvolver na sua forma ascítica ou sólida. Quando as células de Ehrlich são inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos, o tumor se desenvolve na sua forma ascítica, já quando inoculadas pelas vias subcutânea ou intramuscular é observado o crescimento de uma massa sólida (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992). Essa versatilidade do tumor de Ehrlich possibilita análises citológicas e comportamentais completas dentro da oncologia de modelos pré-clínicos.

O tumor de Ehrlich se desenvolve em diferentes linhagens murinas, sendo um modelo espécie-específico e, acredita-se que o motivo da capacidade de proliferação em diferentes cepas murinas seja devido a perda dos antígenos do complexo de histocompatibilidade principal das células de Ehrlich (CHEN; WATKINS, 1970; FEITOSA *et al.*, 2021). A agressividade e a resistência à morte celular foram associadas à alta expressão das chaperonas HSP70 relacionadas com a proliferação, a invasão e a metástase celular (GABAI *et al.*, 1995) além da ausência de receptores de estrogênio (AYDINER *et al.*, 1997). As células de Ehrlich proliferam rapidamente com pico de crescimento a partir do 6º dia após a inoculação intraperitoneal, apresentando células pleomórficas, anaplásicas, com baixa razão núcleo-citoplasma, núcleo com cromatina frouxa e múltiplos nucléolos (SEGURA; BARBERO; MÁRQUEZ, 2000). Entretanto, alterações no sistema imunológico são observadas a partir do 2º dia pós inoculação; redução dos linfócitos esplênicos (HAMASATO *et al.*, 2014), infiltrado de neutrófilos que auxiliam no desenvolvimento tumoral (BERGAMI-SANTOS; MARIANO; BARBUTO,

2004), recrutamento de macrófagos imunossupressores (SEGURA; BARBERO; MÁRQUEZ, 2000), além de diferentes mecanismos de evasão do sistema imune garantem uma progressão rápida do tumor de Ehrlich (FEITOSA *et al.*, 2021).

O modelo tumoral de Ehrlich é amplamente utilizado para compreender os processos biológicos, tumorigênicos, imunológicos, fisiopatológicos, bioquímicos e farmacológicos no câncer (MATSUZAKI, 2004; FEITOSA *et al.*, 2021). O uso do tumor de Ehrlich ascítico nas pesquisas pré-clínicas na farmacoterapia do câncer é crescente, com relatos que datam de 1950 (KURNICK *et al.*, 1950). As projeções de incidência e de prevalência do câncer cada vez mais elevadas estimulam a busca por moléculas com ação antitumoral, sendo os produtos naturais importantes fontes de bioativos no tratamento de diversas doenças de impacto na saúde global, dentre elas o câncer.

2.4 Produtos naturais e o câncer

O uso de produtos de origem natural para o tratamento de doenças é uma prática comum há milhares de anos, sendo as plantas medicinais as mais utilizadas para esse fim (SKIRY CZ *et al.*, 2016). A exemplo, o uso da papoula (*Papaver somniferum*) para fins terapêuticos é descrito há mais de 4.000 anos. Entretanto, só a partir do século XIX que a identificação de moléculas com atividade biológica teve início e suas ramificações intensificadas após Friedrich Serturmer, isolar o alcaloide morfina da papoula, sendo um marco na história da medicina (DUTRA *et al.*, 2016). O uso de produtos naturais para o tratamento de doenças humanas tem sido cada vez mais incentivada, e no Brasil, a portaria GM/MS nº 971/2006 tem respaldado as pesquisas no tema (Ministério da Saúde, 2006). É inegável a importância de fontes naturais de substâncias com potencial terapêutico. Estima-se que cerca de 30% dos fármacos disponíveis para o tratamento de diversas doenças tenham sua origem vinda de produtos naturais. Na oncologia a estimativa é que cerca de 60% dos fármacos utilizados sejam derivados de produtos naturais, como exemplo desse cenário pode ser mencionado os agentes antineoplásicos vimblastina, vincristina, etoposido, paclitaxel (Taxol®), docetaxel e topotecano, o que respalda as pesquisas na área da fitoterapia aplicada ao câncer (CRAGG; NEWMAN, 2013; CRAGG; PEZZUTO, 2016; DUTRA *et al.*, 2016).

Dentre os metabólitos secundários de espécies vegetais, os terpenos mostram-se como uma grande classe de metabólitos formados por um arsenal de compostos identificados e relacionados com diversas atividades biológicas, como as ações gastroprotetora, antioxidante, citotóxica, cicatrizante e anti-inflamatória (ANTONISAMY *et al.*, 2015; UTAMI *et al.*, 2013;

PATERAKI; HESKES; HAMBERGER, 2015; AGRA *et al.*, 2016). Esses compostos químicos são produzidos por plantas e alguns outros organismos fazendo parte da dieta alimentar de seres vivos no cotidiano (MEHTA; MEENA; NAGDA, 2022) e são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas de hidrocarbonetos (C_5H_8) que o constituem, como hemiterpenos (1 unidade isoprênica), monoterpenos (2), sesquiterpenos (3), diterpenos (4), sesterpenos (5), triterpenos (6) e tetraterpenos (8) (SAHU; BHOWMICK; KALI, 2020). Nas plantas, as vias metabólicas envolvidas na biossíntese dos terpenos são as do acetato-mevalonato e do fosfato de metileritritol (OLDFIELD; LIN, 2012), tendo como principal função a alelopatia e a proteção contra fatores bióticos e abióticos (KATO-NOGUCHI; KATO, 2022).

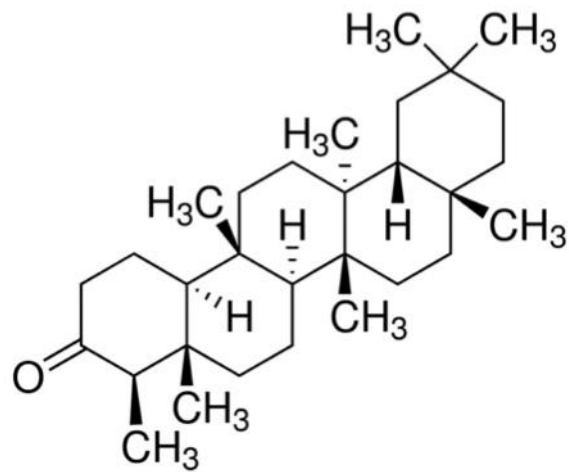
Os triterpenos são moléculas amplamente encontradas em diferentes espécies vegetais dos gêneros *Aralia*, *Panax*, *Glycyrrhiza*, *Cornus*, *Boswellia*, *Terminalia*, *Acacia*. entre outras (KVASNICA *et al.*, 2015; PANDA; THANGARAJU; LOKESHWAR, 2022). Essas substâncias são utilizadas na medicina tradicional devido aos seus efeitos anti-inflamatório, diurético, gastroprotetor, anti-proliferativo, dentre outros (KVASNICA *et al.*, 2015; PANDA; THANGARAJU; LOKESHWAR, 2022). Estudos recentes demonstraram o efeito antitumoral do ácido ursólico, um triterpeno presente em diferentes partes de diversas plantas medicinais (fruto, flores, folhas e casca) em diferentes linhagens tumorais *in vitro*. Foi observado que o efeito antitumoral desse triterpeno estava associado a capacidade de inibir diferentes atividades envolvidas no crescimento de células cancerígenas, inibição da inflamação induzida por células tumorais, capacidade antiangiogênica, indução da apoptose celular e atividade antioxidante (PANDA; THANGARAJU; LOKESHWAR, 2022). *In vivo*, utilizando o modelo murino de tumor de Ehrlich ascítico, Saraswati e colaboradores (2013) observaram um efeito antiproliferativo do ácido úrsólico pela indução da morte celular por apoptose. Além disso, o triterpeno apresentou efeitos antioxidante e antiangiogênico. Esses resultados demonstram o potencial dos triterpenos contra neoplasias malignas.

2.5 Friedelina

A friedelina, fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ e peso molecular de 426,72 g/mol, faz parte do grupo dos triterpenos pentacíclicos e é amplamente distribuída em diferentes espécies vegetais, a exemplo as espécies dos gêneros *Maytenus*, *Azima*, *Vismia*, *Callophyllum*, *Clusia*, *Quercus*, *Cassia* (TAMOKOU *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2011; HERBERT *et al.*, 2022; SANDHU *et al.*, 2022; JOSHI *et al.*, 2022). As unidades isoprênicas da friedelina são

distribuídas em cinco anéis de carbono formados por ligações saturadas com a presença de oito grupamentos CH₃ (Figura 5, p. 40). O núcleo ciclopentanoperidrofenantreno (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-hexadecahidro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthrene) dessa molécula se assemelha a dos esteroides, o que pode favorecer a sua interação com as membranas celulares e com os bolsões hidrofóbicos de enzimas, proteínas e receptores biológicos (MORZYCKI, 2014; SIMÕES *et al.*, 2016; HE; ZHU; CHEN, 2018).

Figura 5 – Estrutura molecular da friedelina.



Fonte: Sigma-Aldrich

As atividades biológicas dessa molécula têm sido bastante exploradas nos últimos anos, destacando-se as atividades anti-inflamatória, antioxidante, antinociceptiva, antidiabética, antiulcerogênica, cicatrizante e neuroprotetora (ARAÚJO *et al.*, 2019; SUNIL *et al.*, 2013; SUNIL *et al.*, 2021; SHI *et al.*, 2021; SOMWONG *et al.*, 2022; SANDHU *et al.*, 2022). Além disso, estudos recentes relataram um potencial antitumoral da friedelina *in vitro* em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) e em células de leucemia humana (AML-196) (SUBASH-BABU; LI; ALSHATWI, 2017; CHANG; WANG; XIAO, 2020). Nas células MCF-7 a friedelina apresentou citotoxicidade por indução dos mecanismos intrínsecos da apoptose (SUBASH-BABU; LI; ALSHATWI, 2017). Já nas células AML-196 a friedelina inibiu a progressão tumoral pela indução da apoptose e parada do ciclo celular, além de bloquear as vias de sinalização MERK/ERK e PI3K/AKT, sendo essas vias envolvidas em mecanismos que promovem a manutenção e progressão tumoral (CHANG; WANG; XIAO, 2020), entretanto, o efeito antitumoral *in vivo* desse triterpeno ainda é desconhecido.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

No presente estudo, buscou-se investigar o potencial efeito antitumoral do triterpeno pentacíclico friedelina no modelo experimental murino de tumor de Ehrlich ascítico.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar na UFAL os parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral que permitam a avaliação da atividade antitumoral de substâncias.
- Avaliar o efeito da friedelina sobre os parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral no modelo murino de Ehrlich ascítico.
- Avaliar o efeito da friedelina no tempo de sobrevivência de camundongos portadores do tumor de Ehrlich ascítico.
- Avaliar o efeito da friedelina na geração de mediadores inflamatórios e do estresse oxidativo no tEa.
- Avaliar o efeito da friedelina sobre a viabilidade, a proliferação e a morte de células do tEa.
- Avaliar o efeito da friedelina na angiogênese associada ao desenvolvimento tumoral do tEa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Friedelina (855022), cisplatina (15663-27-1), Tampão Fosfato Salina (PBS), brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), nitroblue tetrazólio (NBT), 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (H₂DCFH-DA), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), TriReagent, L-glutamina, corante azul de Tripán, RNase e Iodeto de propídeo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, MO, USA). O hidróxido de potássio (KOH), clorofórmio, corante cristal violeta e paraformaldeído foram adquiridos da Dinâmica, Brasil. A água ultraPure, meio de cultivo celular (RPMI-1640), gentamicina e o soro bovino fetal (SBF) foram adquiridos da Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os oligonucleotídeos *Sod1*, *Cat* e *Bcl2*, o blue juice e o kit de cDNA foram obtidos da Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, SP, BR). Os kits para quantificação de TNF- α ELISA e Kit PE Annexin V/7AAD Apoptosis Detection foram adquiridos da BD biosciences (BD OptEIA, CA, USA). O kit para quantificação de VEGF foi adquirido da PreproTech, ELISA (Thermo Fisher, USA). 5-fluorouracil (Libbs, SP, BR), isofluorano (BioChimico, RJ, BR), triton X-100 (INLAB, SP, BR), panótico rápido (Laborclin), dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, SP, BR), álcool etílico (NEON, SP, BR), marcodine iodopovidona e thiopentax (Cristália, BR). O Power SYBR Green Master Mix foi adquirido da applied biosystems by life technologies (Warrington, UK) e a Agarose Low EEO obtida da Kasvi.

4.2 Friedelina

A friedelina (PubChem CID: 91472) adquirida da Sigma-Aldrich foi diluída em solução etanólica (PBS a 2% de álcool etílico) até 1 hora antes do tratamento dos animais e da cultura celular primária (FERRO, 2016).

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) fêmeas, com idades de 5-20 semanas e pesando entre 25-35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (Biocen – UFAL) e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular (LBC) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS). Os animais foram mantidos em

gaiolas de polipropileno nas medidas (L×C×A) de 45×60×25 cm, em grupos de 5 animais por caixa, com livre acesso à água e ração em condições controladas de luminosidade (ciclo claro-escuro de 12-12 horas) e temperatura (20 ± 2 °C). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UFAL (CEUA nº 15/2019) (Anexo 1).

4.4 Obtenção e manutenção da matriz doadora do carcinoma de Ehrlich ascítico

As células provenientes do “Ehrlich Ascites Carcinoma” (EAC) foram gentilmente cedidas pela professora Dr^a Ivone Antônia de Souza do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Recife-PE, Brasil).

As células foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* fêmeas (10-14 semanas de idade), sendo realizado o transplante celular a cada 11 dias. As células obtidas dos animais tumorizados após aspiração com o auxílio de uma seringa, foram suspensas em solução tampão salina-fosfato estéril (PBS) contendo o antibiótico gentamicina (40 µg/mL) para prevenção de infecções. Parte da ascite coletada foi centrifugada para a obtenção do sobrenadante tumoral que foi adicionado à suspensão de células (5×10^6 células em 0,5 mL de solução). A solução foi administrada intraperitonealmente (i.p.) acima da mama superior esquerda do animal receptor saudável após antissepsia local. O desenvolvimento tumoral foi observado a partir 6º dia da indução tumoral (Adaptado de SANTOS *et al.*, 2018).

Em outro conjunto experimental, foi realizada a cultura primária das células do tumor de Ehrlich ascítico provenientes de animais no 11º dia de indução tumoral. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10%, 10% de sobrenadante tumoral coletado após centrifugação da ascite tumoral, L-glutamina (2 mM) e gentamicina (40 µg/mL), mantidas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%) por 1 hora antes de serem utilizadas.

4.5 Indução tumoral e padronização do modelo experimental de Ehrlich ascítico

Os animais portadores do carcinoma de Ehrlich em sua forma ascítica, no 11º dia de indução tumoral, foram eutanasiados por injeção intravenosa (i.v.) de tiopental (200 mg/kg). Após a antissepsia da região abdominal utilizando álcool 70% e álcool iodado (0,1%), foi realizada a exposição da região peritoneal dos camundongos doadores seguida da punção da ascite tumoral. As células foram avaliadas quanto a viabilidade utilizando o método de exclusão

com o corante azul de Tripán. Após ambientados, os animais receptores foram inoculados com as células tumorais (5×10^6 células em 0,5 mL de PBS; i.p.) na cavidade peritoneal. O dia da indução do tumor foi considerado o dia 1 do protocolo experimental.

Para avaliar a influência da idade dos animais no desenvolvimento tumoral, camundongos em diferentes faixas etárias foram induzidos com o tumor e avaliados no 11º dia de indução tumoral (Tabela 2).

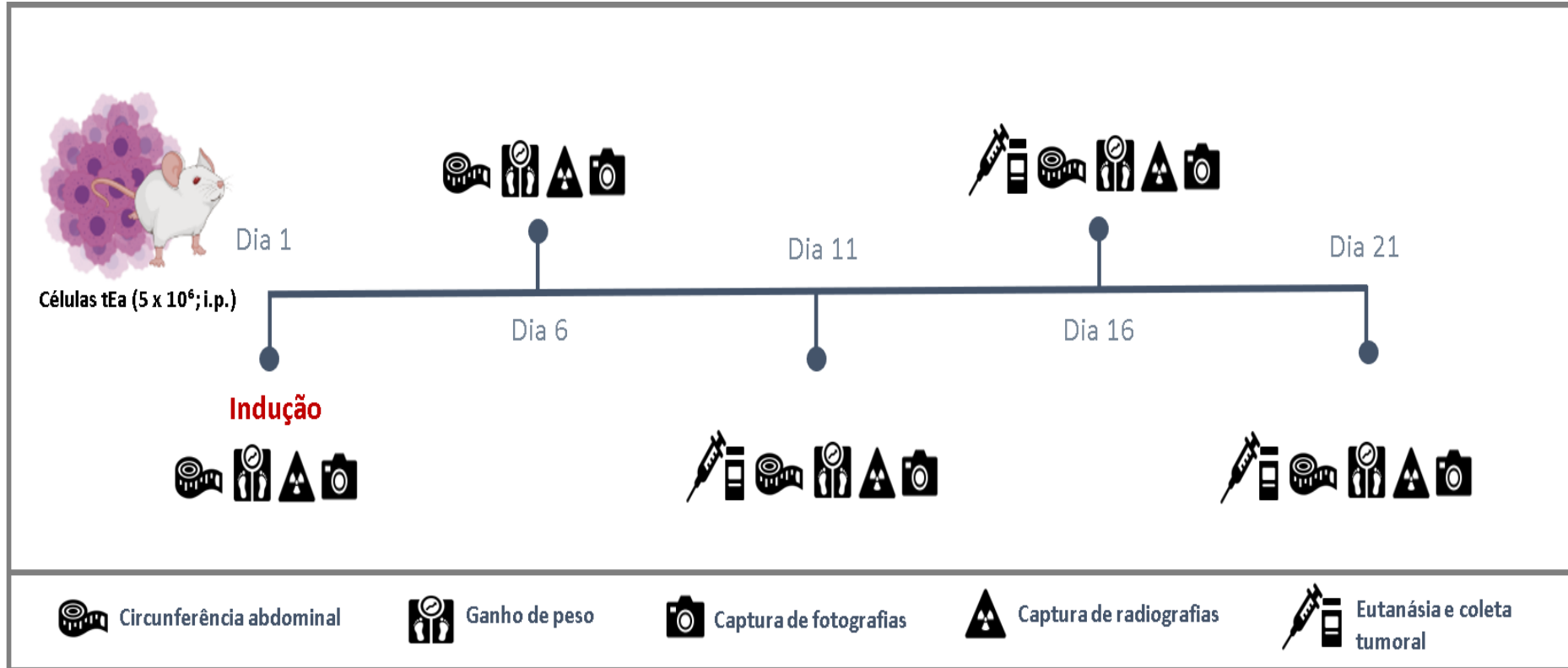
Tabela 2 – Grupos experimentais utilizados na padronização do modelo de tumor de Ehrlich ascítico frente a idade dos animais.

Grupo	Tumorizados	Idade em semanas
Controle não tumoral (NT)	-	5 – 20
Tumoral 1 (TM1)	+	5 - 7
Tumoral 2 (TM2)	+	8 - 10
Tumoral 3 (TM3)	+	11 - 13
Tumoral 4 (TM4)	+	14 - 16
Tumoral 5 (TM5)	+	17 - 20

Os grupos experimentais foram compostos por camundongos *Swiss* fêmeas (n = 10, 25-35g, 5-20 semanas).Fonte: Autor, 2022.

Para caracterizar a cinética temporal de crescimento tumoral do modelo experimental estudado, animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico (10-14 semanas de idade; 25-35 g) foram distribuídos em diferentes grupos e avaliados nos dias 6, 11, 16 e 21 da indução tumoral. Os animais foram observados quanto ao ganho de peso (g), medida abdominal transversal (mm), volume ascítico tumoral (mL), celularidade presente no tumor, quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular, acompanhamento macroscópico por imagens e observações comportamentais como ingesta hídrica e alimentar, eriçamento de pelos, alopecia e atividade locomotora. Animais saudáveis não tumorizados foram utilizados como controle negativo (Figura 6, p. 45). Cabe destacar que parte dos experimentos realizados para a padronização do protocolo experimental do tEa foi realizado em parceria como parte da tese de doutorado da atual Dr^a Tayhana Priscila Medeiros Souza, PPGCS, UFAL.

Figura 6 – Delineamento experimental dos ensaios de padronização, frente a cinética temporal, do modelo tumoral de Ehrlich ascítico.

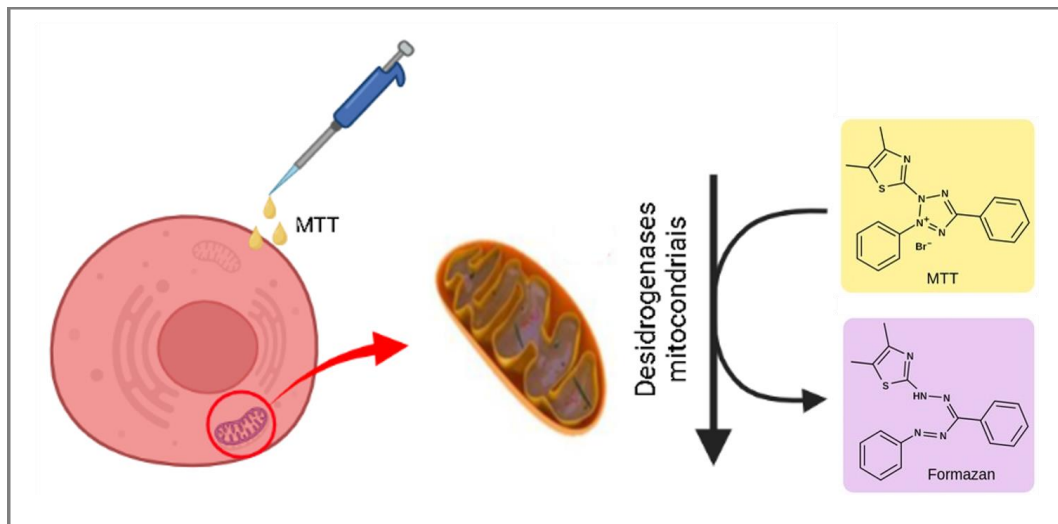


Esquema utilizado na padronização do protocolo experimental no modelo de tumor de Ehrlich ascítico. Os animais (10-14 semanas; 25-35 g) foram distribuídos em diferentes grupos e inoculados com células do tEa. Nos dias 11, 16 e 21, de acordo com os grupos experimentais, os animais foram eutanasiados para coleta tumoral e quantificação da celularidade total presente na ascite tumoral. Fonte: Autor, 2022.

4.6 Análise de viabilidade celular após o tratamento com friedelina *in vitro*

Para avaliar o efeito da friedelina sobre a viabilidade de células do tEa, foi utilizado o ensaio colorimétrico brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MTT) descrito por Mosmann (1983). Esse ensaio indica a viabilidade celular a partir da atividade mitocondrial, baseando-se na conversão do sal MTT em cristais de formazan por desidrogenases mitocondriais (Figura 7).

Figura 7 – Representação esquemática da reação de redução do sal MTT no ensaio de viabilidade celular.



Esquema representativo do ensaio colorimétrico brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).
Fonte: Autor, 2022.

As células coletadas do líquido ascítico puncionado de um camundongo portador no 11º dia da tumorigênese, foram semeadas (5×10^4 em 0,1 mL/poço) em microplacas de 96 poços com meio de cultura RPMI-1640 suplementado (10% de SBF, 10% de sobrenadante tumoral, 2 mM de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina). As células foram mantidas na estufa com atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ (37 °C) por 1 hora para acomodação celular. Decorrido esse tempo, as células foram tratadas com friedelina (0,625; 0,25; 1; 4; e 64 µM) ou com o quimioterápico cisplatina (CIS - 7 µM) por 24 ou 48 horas. Um grupo de células sem adição de tratamento foi utilizado como controle experimental. Após a incubação, foi adicionado 23 µL/poço do sal MTT (5 mg/mL) por 3 horas. O sobrenadante foi removido para adição de 150 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO, P.A.) para a solubilização dos cristais de formazan. A densidade óptica (DO) de cada poço foi mensurada em espectrofotômetro de microplaca (540 nm). O percentual de viabilidade celular foi determinado em relação à amostra

controle:

$$\text{Percentual (\%)} \text{ de viabilidade celular} = (\text{densidade óptica de células tratadas} / \text{densidade óptica de células não tratadas}) \times 100$$

4.7 Grupos experimentais e tratamento com friedelina *in vivo*

Para a avaliação da atividade antitumoral da friedelina, 50 camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (10 animais/grupo) descritos na tabela 3.

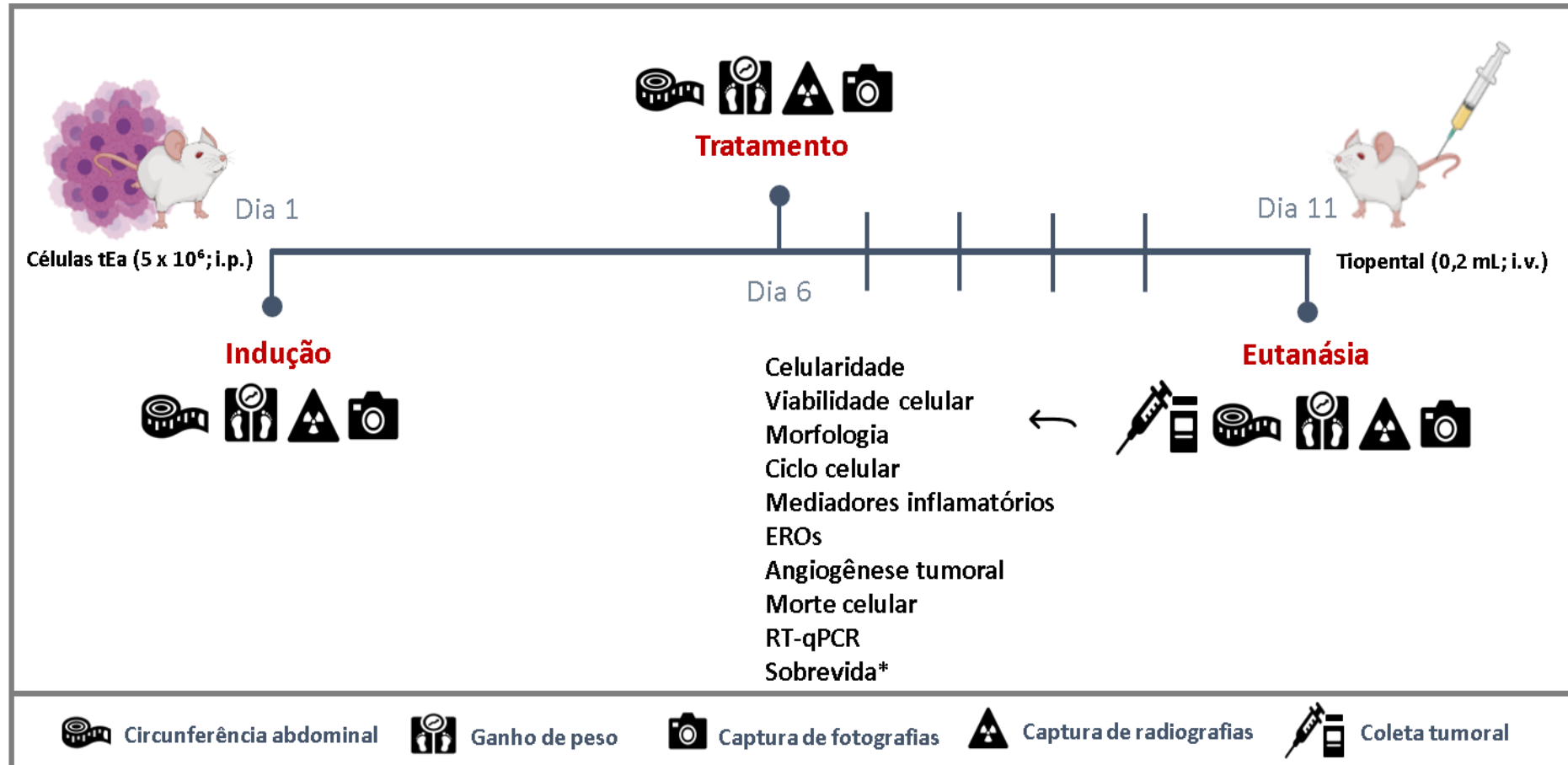
Tabela 3 – Grupos experimentais utilizados na avaliação da atividade antitumoral da friedelina.

Grupo	Tratamento intraperitoneal
Controle tumoral (TM)	PBS estéril (0,1 mL/Kg)
Controle quimioterápico (5-FU)	5-fluorouracil (200 µmol/Kg)
Controle veículo (EtOH)	PBS-EtOH estéril 2% (0,1 mL/Kg)
Friedelina (FD50)	Friedelina (50 µmol/Kg)
Friedelina (FD200)	Friedelina (200 µmol/Kg)

Os grupos experimentais foram compostos por camundongos *Swiss* fêmeas (n = 10, 25-35g, 10-12 semanas).
Fonte: Autor, 2022.

No dia 1, após a ambientação, os animais foram injetados com células do tumor de Ehrlich ascítico (5×10^6 células em 0,5 mL; i.p.) provenientes do animal doador. No 6º dia após a indução tumoral, os animais foram tratados por 5 dias consecutivos seguindo os tratamentos descritos (Figura 8, p. 48).

Figura 8 – Delineamento experimental dos ensaios de avaliação da atividade antitumoral da friedelina no modelo tumoral de Ehrlich ascítico.



Esquema do protocolo experimental utilizado na avaliação do efeito antitumoral da friedelina no modelo de tumor de Ehrlich ascítico. No 6º dia do protocolo experimental, os animais foram tratados intraperitonealmente com PBS (0,1 mL/Kg), 5-fluorouracil (200 µmol/Kg), solução etanólica 2% (0,1 mL/Kg) ou Friedelina (50 ou 200 µmol/Kg) por 5 dias consecutivos. Após 24 horas do último tratamento, os animais foram eutanasiados para coleta da ascite tumoral e posteriores análises. *Em outro conjunto experimental, os animais foram avaliados quanto ao tempo médio de sobrevivência e incremento da expectativa de vida. Fonte: Autor, 2022.

4.7.1 Parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral

Para o acompanhamento do desenvolvimento tumoral, nos dias 1, 6 e 11 do protocolo experimental, foi registrado o ganho de peso (g) dos animais. Após anestesiados (isoflurano 3%; v.i.) foi registrada a circunferência abdominal (cm) e foram realizadas aquisições de imagens fotográficas (câmera fotográfica Canon PowerShot SX420 IS) dos animais. O percentual do ganho de peso e circunferência abdominal foi determinado em relação ao mesmo animal no dia 1 como apresentado na equação:

$$\text{Percentual (\%)} = (\text{Medida final} - \text{Medida inicial}) / \text{Medida inicial} \times 100$$

Para a padronização do acompanhamento do desenvolvimento tumoral a partir de imagens de raio-X, nos dias 1, 6 e 11 do tumor, foram realizadas capturas de imagens de raio-X dos animais utilizando o Sistema de imageamento In-Vivo MS FX PRO – Bruker, após anestesia inalatória (isoflurano 3%; v.i.). A área peritoneal dos animais foi quantificada utilizando as imagens radiográficas pelo software Image J como ilustrado na Figura 9 e o percentual da área peritoneal foi determinado em relação ao mesmo animal no dia 1 como apresentado na equação:

$$\text{Percentual (\%)} = (\text{Medida final} - \text{Medida inicial}) / \text{Medida inicial} \times 100$$

Figura 9 – Esquema da quantificação da área peritoneal a partir de imagens de raio-X de camundongos portadores do tEa.

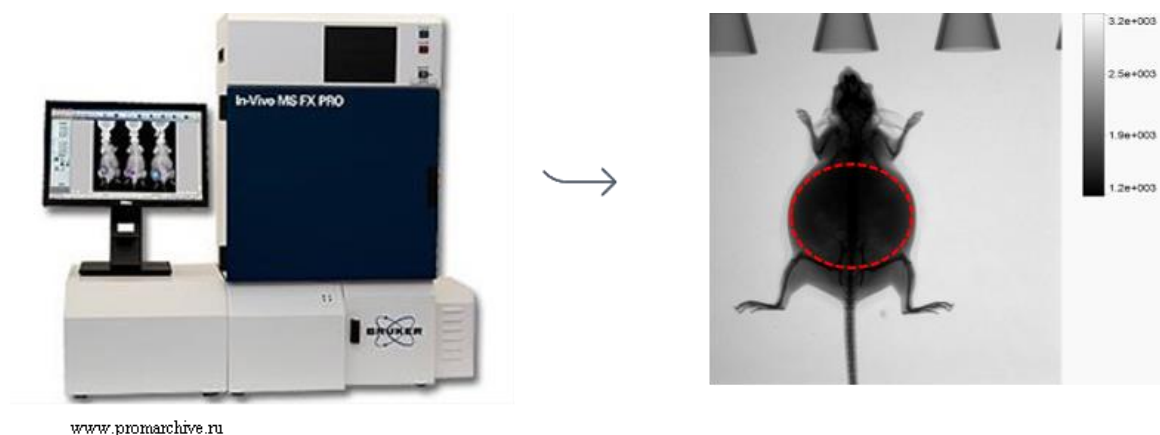


Imagem representativa da captura de imagem radiográficas no Sistema de imageamento In-Vivo MS FX PRO – Bruker. A quantificação da área peritoneal foi realizada utilizando o software Image J.

Após 24 horas do último tratamento, os animais foram eutanasiados (tiopental 200 mg/Kg; 0,2 mL/animal; i.v.) para a coleta do fluido tumoral, que foi quantificado quanto ao peso (g) e ao volume (mL). A viabilidade das células obtidas do líquido tumoral foi avaliada utilizando o método de exclusão com o corante azul de Tripán (STROBER, 2015). O percentual de células viáveis foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Percentual (\%)} \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células tumorais vivas} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de células tumorais totais}}$$

A taxa de inibição do crescimento tumoral (% ICT) (MORSI *et al.*, 2022) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ ICT} = \frac{[(\text{Número médio de células tumorais do grupo controle} - \text{Número médio de células tumorais do grupo tratado}) / \text{Número médio de células tumorais do grupo controle}] \times 100}{1}$$

4.7.2 Análise de sobrevida

Em outro conjunto experimental, utilizando o mesmo protocolo de avaliação da atividade antitumoral da friedelina, 25 camundongos tumorizados foram tratados de acordo com os grupos experimentais descritos na Tabela 3 (p. 41) e observados quanto ao tempo médio de sobrevida e percentual de incremento de expectativa de vida (NICOL; PRASAD, 2006). O tempo de sobrevida de cada grupo foi observado pela contagem da mortalidade.

O tempo médio de sobrevida (TMS) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{TMS} = (\text{dia do primeiro óbito} + \text{dia do último óbito}) / 2$$

O percentual de incremento de expectativa de vida (% IEV) foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$(\%) \text{ IEV} = (T - C) / C \times 100$$

Onde T se refere ao TMS dos animais tratados e C representa o TMS do grupo controle. A especificação da finalização deste experimento foi a morte não induzida de camundongos.

4.7.3 Ensaio de viabilidade celular *ex vivo*

As células coletadas dos animais tratados *in vivo* com friedelina, foram plaqueadas (8×10^4 de células/animal, 0,2 mL/poço) em placas de 96 poços e submetidas ao ensaio de viabilidade celular como descrito anteriormente (item 4.6, p. 40). A análise da viabilidade celular foi realizada nos tempos de 1, 24 e 48 horas após a coleta das células tumorais.

4.7.4 Análise morfológica das células tumorais e perfil de células imunes

As células recuperadas da cavidade peritoneal dos animais foram citocentrifugadas (1×10^5) (Citocentrífuga CTT-2000 - Cienttec) e coradas utilizando o kit de coloração panótico rápido. As células tumorais foram avaliadas sob microscopia óptica (Nikon) quanto a sua morfologia, além da contagem diferencial dos leucócitos para avaliar o perfil de células imunes presentes no líquido tumoral.

A morfologia nuclear foi analisada com o marcador fluorescente DAPI. As células citocentrifugadas foram fixadas com paraformaldeído 4% e marcadas com o corante fluorescente DAPI ($10 \mu\text{g/mL}$) à temperatura ambiente por 10 min. As células foram fotografadas no microscópio de epifluorescência invertido (Nikon Eclipse 50i) (LINGARAJU *et al.*, 2018).

4.7.5 Análise das fases do ciclo celular

A análise das fases do ciclo celular das células coletadas da ascite tumoral, foi avaliada utilizando o agente fluorescente iodeto de propídeo (IP). Esse ensaio baseia-se na intercalação desta sonda fluorescente (IP) ao DNA da célula, sendo a intensidade de fluorescência observada diretamente proporcional à quantidade de DNA presente na célula, indicando a fase do ciclo celular em que esta se encontra (NICOLLETI *et al.*, 1991). 1×10^6 células de cada animal foram fixadas com 1 mL de solução fixadora (PBS/Etanol 70%) por 2 horas à 18°C . Decorrido esse tempo, as células foram centrifugadas e suspensas em solução de marcação contendo RNase (1 mg/mL), iodeto de propídeo (1 mg/mL), triton X-100 (0,1%) e PBS (1x, q.s.p.), incubando-se por 30 minutos ao abrigo da luz. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto II TM (BD Biosciences) adquirindo-se 20.000 eventos/amostra. (Adaptado de NICOLLETI *et al.*, 1991).

4.7.6 Quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular

Para mensurar a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular, foi utilizado o 2',7'- diacetato diclorofluoresceína (H₂DCFH-DA), um composto lipossolúvel que penetra facilmente à célula e é hidrolisado enzimaticamente por esterases intracelulares, formando, então, o DCFH não fluorescente que ao entrar em contato com EROs é oxidado no composto fluorescente DCF (2',7'-diclorofluoresceína) (KALYANARAMAN *et al.*, 2012). 1x10⁶ de células/animal foram expostas ao H₂DCFH-DA a 5 µM por 15 minutos protegidas da Luz. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto II TM (BD Biosciences) adquirindo-se 20.000 eventos/amostra. Os dados foram apresentados como média de intensidade de fluorescência.

4.7.7 Quantificação do ânion superóxido por NBT

Para o ensaio de redução de nitroblue tetrazólio (NBT), as células (1×10⁵ células em 0,1 mL) foram semeadas (RPMI-1640, 10% de SBF e 40 µg/mL de gentamicina) em placas de 96 poços por 1 hora para acomodação celular e incubadas com solução de NBT (1 mg/mL) por 1 hora. Decorrido esse tempo, o sobrenadante celular foi removido para adição da solução reveladora (KOH 1 M em DMSO P.A.). A leitura foi realizada no espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm. Os níveis do ânion superóxido foi calculado de acordo com a fórmula:

$$(\%) \hat{\text{A}}\text{nion superóxido} = (\text{densidade óptica de células tratadas} / \text{densidade óptica de células não tratadas}) \times 100$$

4.7.8 Quantificação de citocinas por ELISA

Os níveis do fator de crescimento endotelial vascular - VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e do fator de necrose tumoral alfa – TNF-α (*Tumoral necrosis factor alpha*) presente no sobrenadante tumoral foi quantificado pelo ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) seguindo as instruções do fabricante (PreproTech, ELISA). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Polaris₂ Celer Biotecnologia S.A.) e os resultados expressos em pg/mL de citocina.

4.7.9 Quantificação de morte celular

A apoptose e a necrose celular foram avaliadas utilizando o Kit PE Annexin V/7AAD Apoptosis Detection (BD biosciences) conforme orientações do fabricante. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II TM (BD Biosciences) adquirindo-se 20.000 eventos/amostra. Os dados foram apresentados em porcentagem.

4.7.10 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

O RNA total das células do tumor de Ehrlich ascítico coletadas dos animais tratados, foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio e utilizado como molde para a síntese de cDNA seguida de análise da expressão gênica via RT-qPCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*). 10x10⁶ células/animal foram plaqueadas em placas de 6 poços (1 mL de PBS/SBF 2% e sobrenadante tumoral q.s.p.) e mantidas na estufa de CO₂ por 2 horas. Decorrido esse tempo, as células superficiais foram coletadas e centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos, 24°C), seguida da contagem de células tumorais recuperadas com o corante azul de Tripán. A lise celular foi realizada pela adição de 1 mL de Trizol (TriReagent®, Molecular Research Center, Ohio, EUA). Após a homogeneização, o RNA foi purificado de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado com auxílio do NanoDrop One, tratado com a enzima DNase, para garantir a eliminação de qualquer resíduo de DNA genômico e a sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose (1,5%). Em seguida, o RNA foi transcrito reversamente para obtenção do DNA complementar (cDNA). A RT-qPCR foi realizada no equipamento QuantiStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As sequências específicas dos genes-alvo e do gene constitutivo (β -actina) são apresentadas na Tabela 4 (p. 54).

Tabela 4 - Lista dos genes utilizados para análise de RT-qPCR.

Gene-alvo (símbolo)	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
β -actina (<i>Actb</i>)	ACACAGTGCTGTCTGGTGGT	GTACTTGCGCTCAGGAGGA G
B cell leukemia/lymphoma 2 (<i>Bcl-2</i>)	GGATAACGGAGGCTGGGATG C	TCACTTGTGGCCCAGGTAT G
Catalase (<i>Cat</i>)	GGACGCTCAGCTTTTCATTC	TTGTCCAGAAGAGCCTGG AT
Superóxido dismutase 1 (<i>Sod-1</i>)	TGTCCATTGAAGATCGTGTG A	CACCTTTGCCCAAGTCATC T

Fonte: Autor, 2022.

4.7.11 Análise da área dos vasos sanguíneos

A pele abdominal total da região peritoneal dos camundongos foi coletada e posta em lâmina para a aquisição de imagens no microscópio óptico acoplado à câmera digital (Olympus IX 70, aumento 40x). Foi realizada a captura aleatória de 10 microfotografias por animal. A área dos vasos sanguíneos foi mensurada utilizando o software Image J (Adaptado de AGRAWAL *et al.*, 2011).

4.8 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), e analisados estatisticamente com a análise de variância (ANOVA) e pós-teste Bonferroni ou Newman-Keuls. Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc, San Diego CA, EUA) e os resultados foram adotados significantes quando $p < 0,05$.

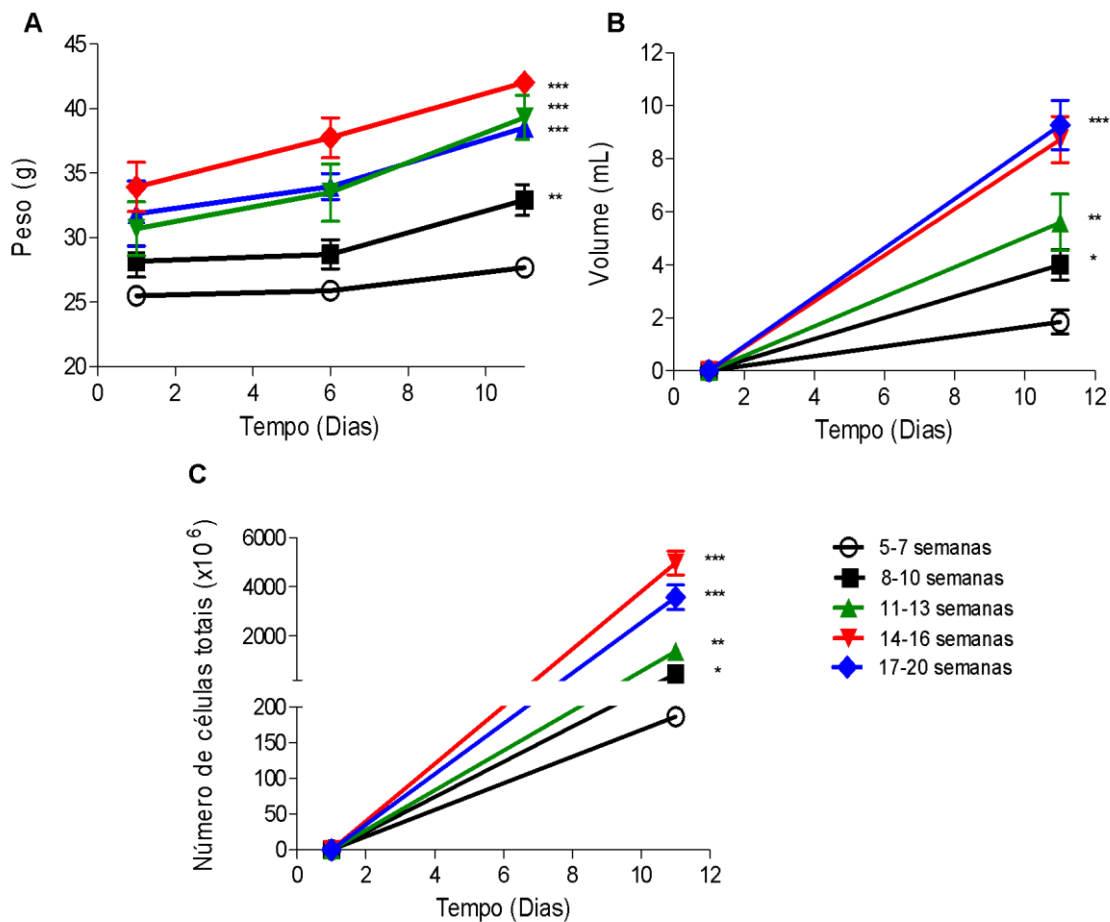
5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do desenvolvimento tumoral do modelo experimental de Ehrlich ascítico

A padronização do modelo experimental de tumor de Ehrlich em sua forma ascítica, se deu a partir da indução tumoral via inóculo intraperitoneal de células provenientes de um animal doador seguida de observações diárias dos animais frente a diferentes parâmetros de avaliação.

Inicialmente, a fim de compreender a influência da idade dos animais na progressão tumoral no modelo experimental estudado, camundongos *Swiss* fêmeas em diferentes faixas etárias (5-20 semanas de idade) foram induzidos com o tEa e observados quanto ao ganho de peso e o desenvolvimento tumoral. Foi visto que após a indução, o desenvolvimento tumoral foi perceptível macroscopicamente a partir do 6º dia do protocolo experimental. Os resultados apresentados na Figura 10 (p. 56) evidenciam a influência da idade dos animais na progressão tumoral, no qual animais mais velhos (10-20 semanas) foram mais permissíveis na estabilização e na progressão tumoral quando comparados a animais mais jovens. Foi observado um aumento progressivo com a idade do ganho de peso dos animais (Figura 10 A, p. 56), estando este aumento relacionado ao desenvolvimento tumoral evidenciado pelo volume tumoral coletado (Figura 10 B, p. 56). Foi observado ainda que animais com idades entre 8-10 e 11-13 semanas apresentaram duas e quatro vezes, respectivamente, mais células no líquido tumoral em comparação aos animais com idades entre 5-7 semanas. Já os animais de 14-16 e 17-20 semanas exibiram o número total de células de sete e nove vezes, respectivamente, maior em comparação aos animais de 5-7 semanas de idade (Figura 10 C, p. 56). A partir dos dados obtidos, foi selecionada uma janela de idade dos animais, de 10-14 semanas para o prosseguimento das análises.

Figura 10 – Análise da influência da idade de camundongos *Swiss* fêmeas no desenvolvimento do tEa.

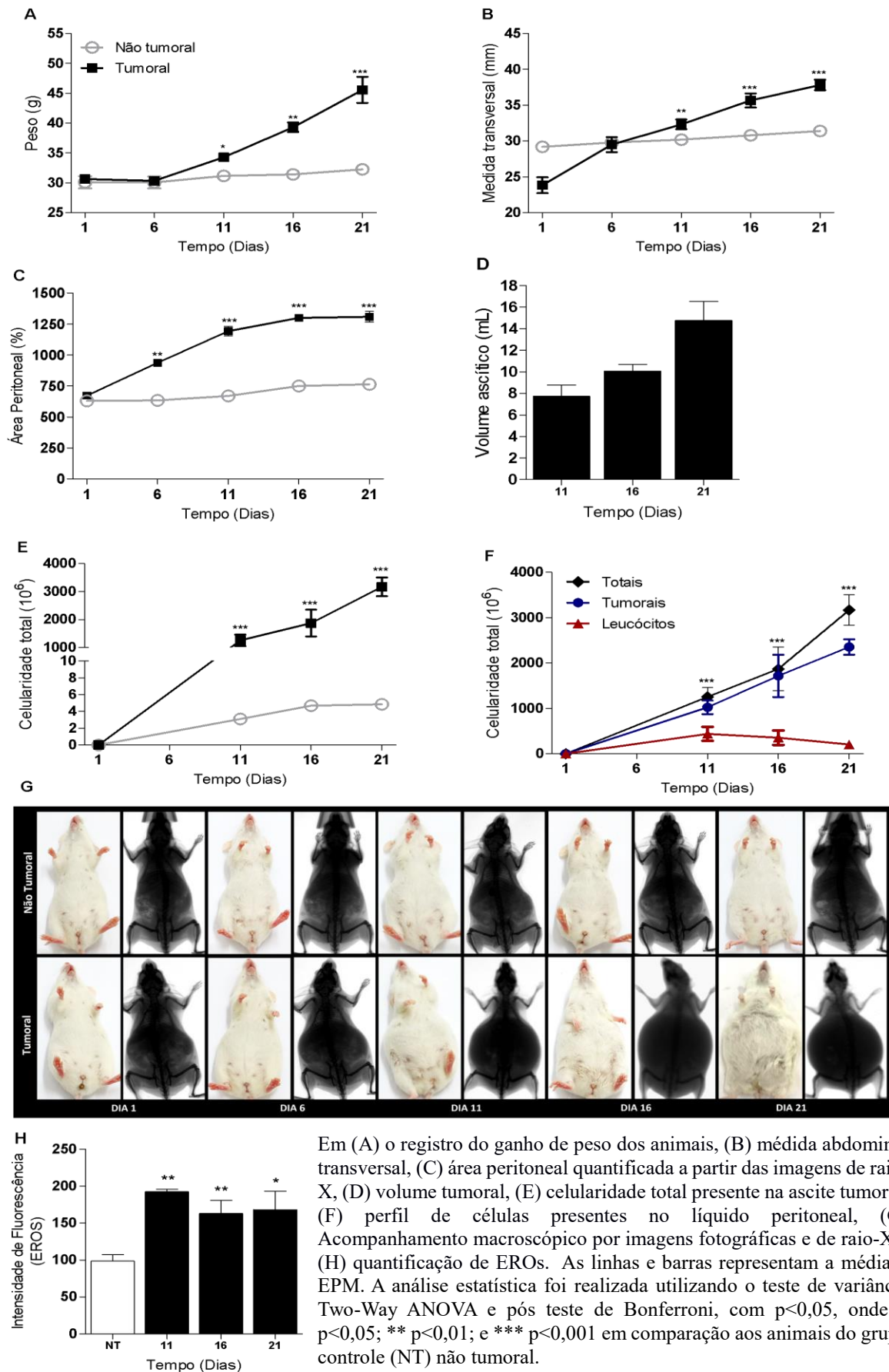


Em (A) registro do ganho de peso dos animais, (B) o volume tumoral coletado da cavidade peritoneal de camundongos inoculados com células do tEa e (C) a celularidade total presente na ascite tumoral quantificada pelo ensaio de azul de Tripán. As linhas representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, com $p < 0,05$, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$ em comparação aos animais do grupo com idades entre 5-7 semanas.

Para compreender a cinética do desenvolvimento tumoral e estabelecer um protocolo experimental que permita a avaliação da atividade antitumoral de substâncias no modelo tumoral estudado, no LBC-UFAL, camundongos *Swiss* fêmeas de 10-14 semanas de idade foram distribuídos em grupos e inoculados com células do tEa para avaliação nos dias 11, 16 e 21 de acordo com os grupos experimentais. Foi observado um aumento progressivo do desenvolvimento tumoral de acordo com o tempo de análise, com aumento de 12%, 27% e 41% no ganho de peso nos animais observados nos dias 11, 16 e 21, respectivamente, em relação aos animais saudáveis (NT) que mantiveram o peso médio constante de 30 ± 2 g (Figura 11 A, p. 58). Foi visto ainda um aumento progressivo com o tempo de análise da medida abdominal transversal (Figura 11 B, p. 58) e da área peritoneal (Figura 11 C, p. 58) dos animais. Após a

eutanásia dos animais, o líquido tumoral foi coletado e o perfil celular foi observado. Foi visto que de maneira semelhante, o desenvolvimento tumoral se deu de forma progressiva com o tempo de análise, em que os animais apresentaram, em média, o volume tumoral de 8, 10 e 15 mL, nos dias 11, 16 e 21, respectivamente. Avaliando o conteúdo tumoral, foi visto um aumento progressivo com o tempo de análise da celularidade total (Figura 11 D, p. 58) e que a progressão tumoral estava associada à proliferação de células tumorais (Figura 11 E, p. 58). Os resultados obtidos são refletidos no acompanhamento macroscópico por imagens fotográficas e de raio-X, em que é possível observar um aumento progressivo na distensão abdominal em camundongos portadores do tEa avaliados nos dias 11, 16 e 21 do protocolo experimental em comparação a animais não tumorizados. (Figura 11 F e G, p. 58). Após as observações diárias durante o protocolo experimental, foi visto que próximo ao 21º dia, os animais apresentaram alterações comportamentais com redução da atividade locomotora, aspecto debilitado com redução da abertura ocular e da busca por alimento e água, alopecia e eriçamento de pelos. Por fim, para investigar a influência do tempo de análise na geração de mediadores importantes para a progressão tumoral, foi mensurado os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular, e foi observado um aumento significativo desse mediador nas células do conteúdo ascítico coletado de camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich ascítico em comparação a animais não tumorizados. Entretanto, não foram observadas alterações significativas nos níveis de EROs nos animais tumorizados avaliados nos diferentes tempos (Figura 11 H, p. 58). Com os resultados obtidos, foi selecionado o protocolo experimental de 11 dias de avaliação para análise do potencial antitumoral de substâncias, visto que não foram observadas alterações comportamentais nos animais, e o desenvolvimento tumoral se deu de maneira semelhante aos animais avaliados no 16º dia de indução tumoral.

Figura 11 – Cinética do desenvolvimento tumoral em camundongos portadores do tEa.



O perfil das células coletadas da cavidade peritoneal de animais tumorizados e não tumorizados são indicadas na Figura 12. Observa-se a presença de células comumente residentes da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* saudáveis, com a prevalência de macrófagos peritoneais, além de outros leucócitos como neutrófilos e linfócitos (Figura 12 A). Vale destacar que a coleta das células de animais não tumorizados foi realizada a partir do lavado peritoneal com 10 mL de PBS estéril. Já na Figura 12 B são representadas as células presentes na cavidade peritoneal de camundongos portadores do tEa, com a prevalência de células tumorais caracterizadas como células grandes, com morfologia arredondada, presença de vacúolos citoplasmáticos, citoplasma basofílico e baixa razão núcleo/citoplasma. Além das células tumorais, é possível observar a presença de macrófagos e um forte infiltrado neutrofílico.

Figura 12 – Perfil celular presente na cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* saudáveis e de animais portadores do tEa.

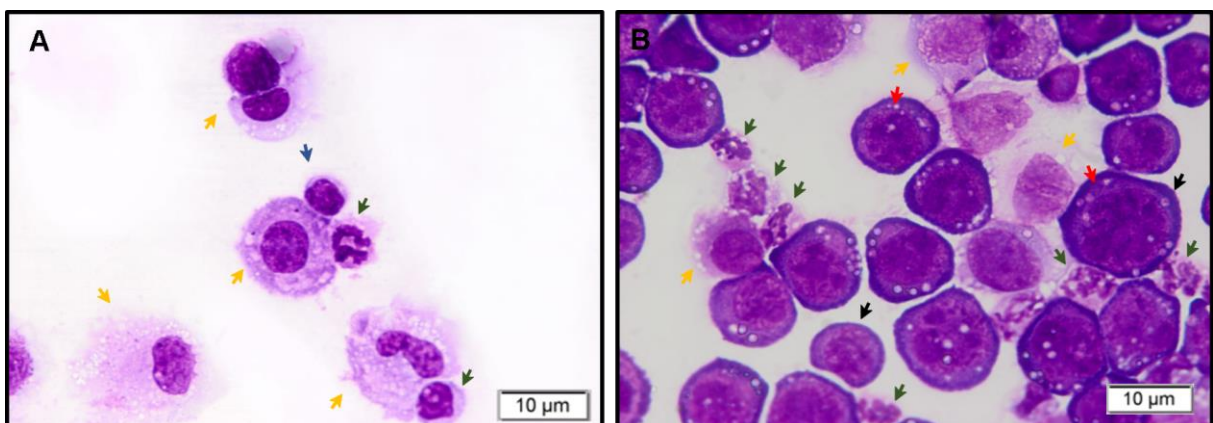


Imagem representativa das células presentes na cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* saudáveis (A) e animais portadores do carcinoma de Ehrlich ascítico (B). Macrófagos (seta amarela); neutrófilos (seta verde); linfócitos (seta azul); células do tEa (seta preta); núcleo das células do tEa (seta vermelha).

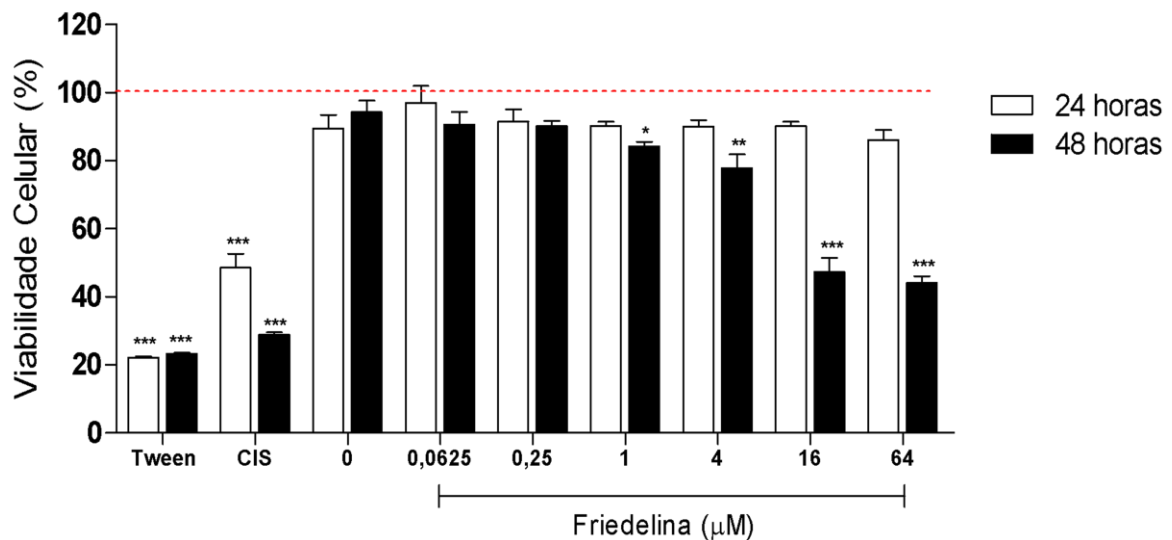
5.2 Avaliação da atividade antitumoral da friedelina no modelo murino de carcinoma Ehrlich ascítico

5.2.1 Efeito da friedelina na viabilidade de células do tEa *in vitro*

Uma vez padronizado, na UFAL, o protocolo experimental para avaliação da atividade antitumoral de substâncias no modelo murino de tumor de Ehrlich ascítico, deu-se início às investigações do potencial antitumoral da friedelina.

Inicialmente, utilizando a cultura primária de células do tEa, foi realizada a análise da viabilidade celular pelo ensaio de MTT nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento. Foi observado que a friedelina foi capaz de reduzir a viabilidade de células do tEa, de maneira significativa, nas concentrações de 1, 4, 16 e 64 μM , após 48 horas de exposição, sugerindo um efeito citotóxico da friedelina *in vitro* em células do tEa. Enquanto as células tratadas com o controle quimioterápico cisplatina (5 μM) apresentaram uma redução de 50% e 70% na viabilidade celular, em 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente (Figura 13).

Figura 13 – Efeito da friedelina *in vitro* na viabilidade de células do carcinoma de Ehrlich ascítico.



Células do tEa foram tratadas *in vitro* com friedelina (0,0625 – 64 μM), veículo (etanol 0,0284%), controle de morte (tween 1%) ou com o quimioterápico (cisplatina - CIS 5 μM) por 24 ou 48 horas. Os dados são apresentados em porcentagem (%) de células viáveis quando comparados ao grupo controle sem tratamento representado pela linha tracejada em vermelho. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, com $p < 0,05$, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; e *** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle.

5.2.2 A friedelina reduz os parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral no modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico

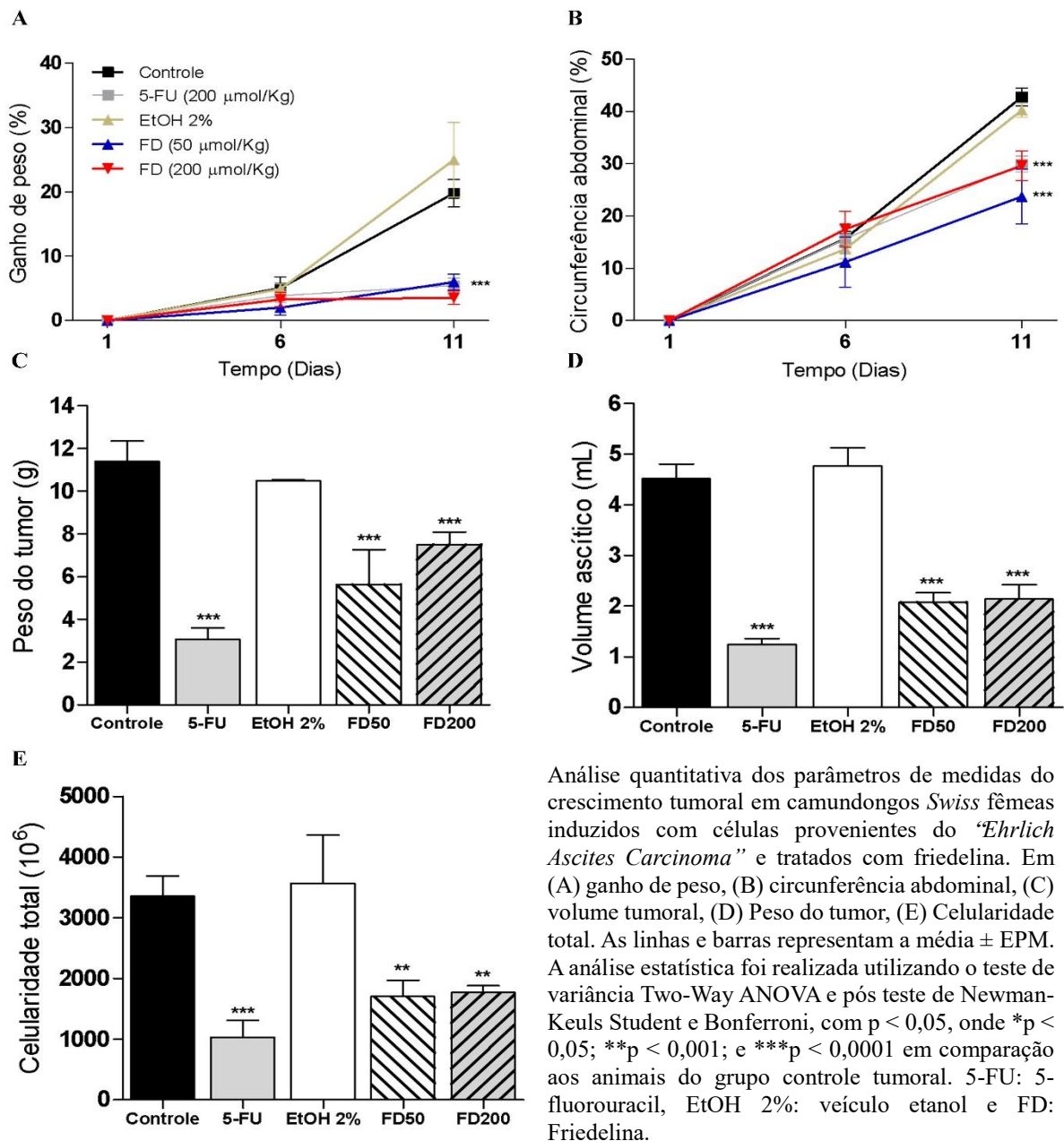
Com o propósito de investigar o potencial antitumoral da friedelina *in vivo*, foi avaliado o efeito desse triterpeno frente aos parâmetros de desenvolvimento e progressão tumoral no modelo experimental de tEa.

Utilizando o protocolo de 11 dias de avaliação, foi observado que a friedelina, em ambas as doses avaliadas (50 e 200 $\mu\text{mol/Kg}$), foi capaz de reduzir de forma significativa todos os parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral avaliados neste trabalho, com redução de

69,7% e 82,3% do ganho de peso dos animais e 44,5% e 30,7% da circunferência abdominal, FD50 e 200 $\mu\text{mol/Kg}$, respectivamente, (Figura 14 A e B, p. 62) estando esses parâmetros intimamente relacionados com o desenvolvimento tumoral no modelo experimental avaliado.

Após a coleta da ascite tumoral, foi observado uma redução do volume tumoral formado de aproximadamente 4,5 mL do grupo controle tumoral para 2 mL no grupo tratado com FD, uma redução de 54% independentemente da dose avaliada, sendo esse resultado refletido na redução do peso líquido do tumor (Figura 14 C e D, p. 62). A redução do volume tumoral formado na cavidade peritoneal de camundongos portadores do tEa tratados com friedelina foi acompanhada de uma redução de 57% e 40%, FD50 e 200 $\mu\text{mol/Kg}$, respectivamente, (Figura 14 E, p. 62) do quantitativo total de células presentes no microambiente tumoral, indicando um efeito antiproliferativo da friedelina no modelo experimental de tEa.

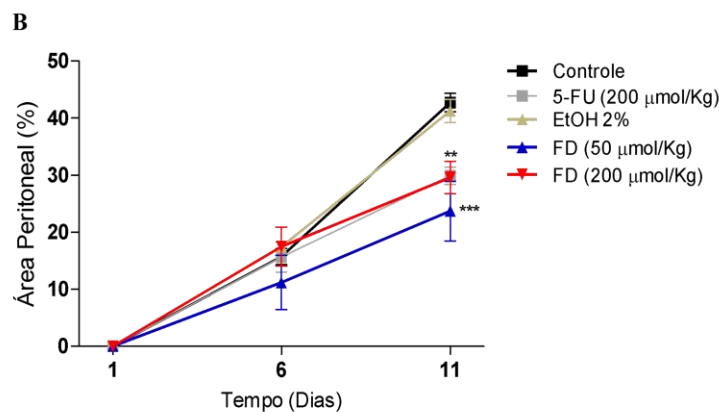
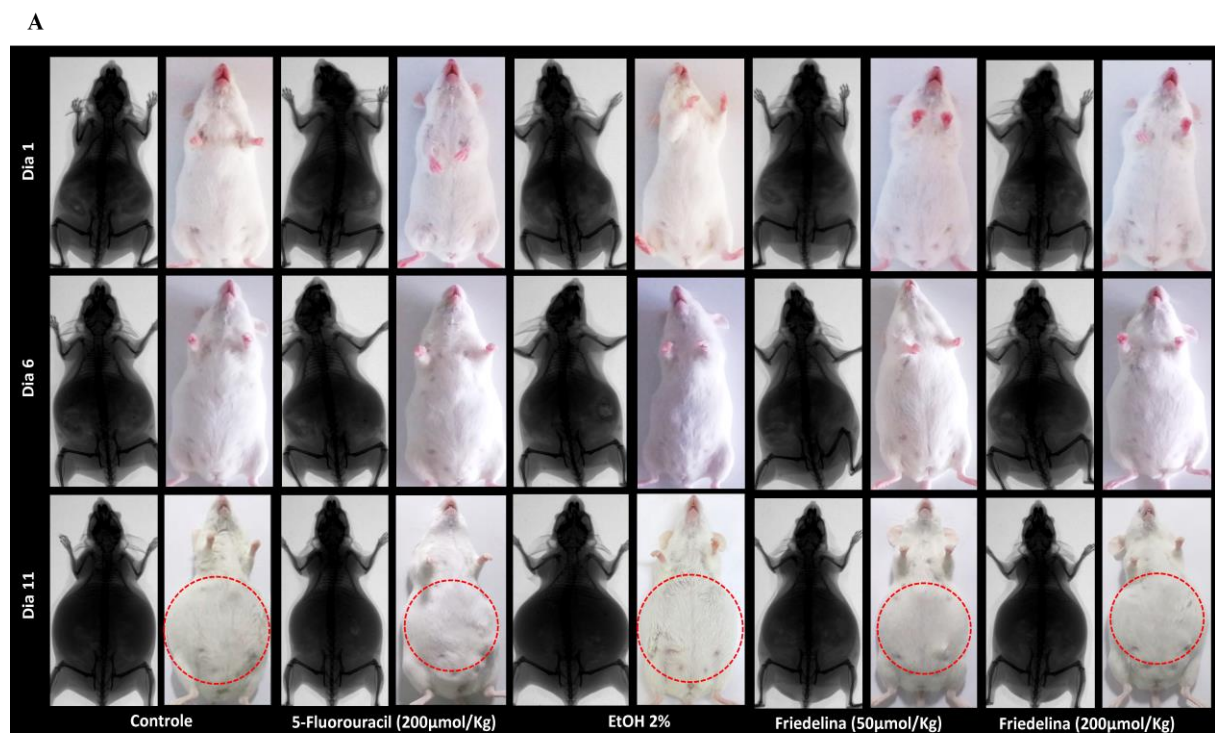
Figura 14 – Efeito da friedelina frente aos parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral no modelo de tEa.



Os resultados obtidos na Figura 14 são refletidos no acompanhamento macroscópico por imagens fotográficas e radiográficas (Figura 15 A, p. 63) em que é possível observar o desenvolvimento tumoral na região abdominal de camundongos a partir do 6º dia da indução tumoral, sendo evidenciado pelo aumento do diâmetro abdominal dos camundongos em relação ao mesmo animal no dia 1. É possível observar ainda que animais tratados com friedelina, bem como os animais tratados com o controle quimioterápico 5-FU, obtiveram uma redução no diâmetro abdominal em relação aos animais dos grupos controles, tumoral e veículo. Quantificando a área peritoneal dos animais a partir das imagens de raio-X, esse perfil se repete

(Figura 15 B), com um aumento de 43% na área peritoneal dos animais do grupo controle tumoral em relação ao mesmo animal no dia 1 e uma diminuição de 45% e 30% da área peritoneal dos animais tratados com friedelina nas doses de 50 $\mu\text{mol/Kg}$ e 200 $\mu\text{mol/Kg}$, respectivamente. Cabe destacar que até o momento não há relatos na literatura do uso de imagens radiográficas para o acompanhamento macroscópico do desenvolvimento tumoral no modelo experimental estudado, sendo os resultados apresentados neste trabalho um importante indicativo que esse parâmetro é um método não invasivo de avaliação para o acompanhamento do crescimento tumoral e da atividade antitumoral de substâncias.

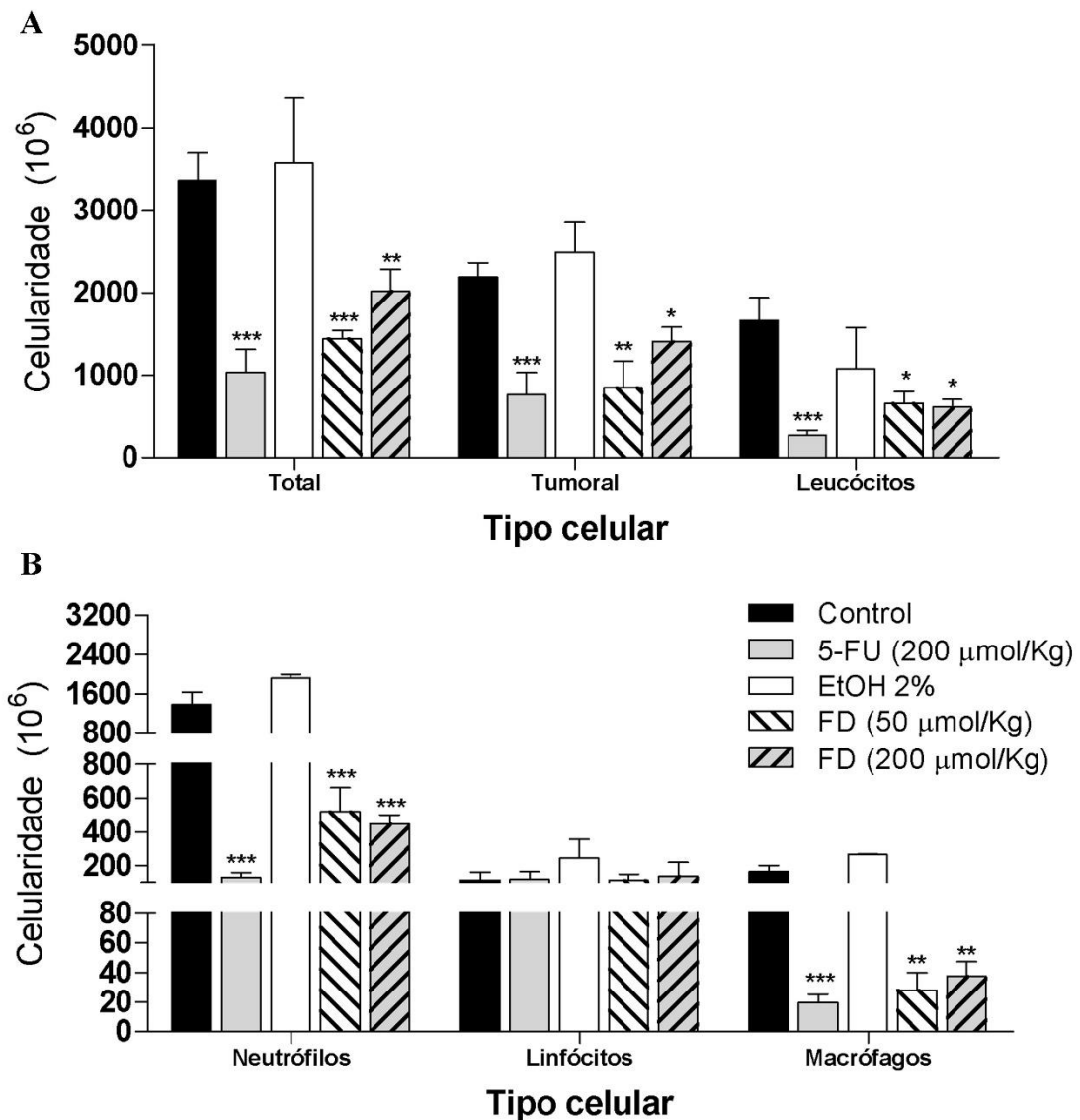
Figura 15 – Acompanhamento macroscópico por imagens da cinética de desenvolvimento tumoral no tEa.



Em (A) imagens fotográficas e radiográficas de camundongos portadores do tEa e (B) quantificação da área peritoneal a partir de imagens de raio-X. As linhas representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Newman-Keuls Student e Bonferroni, com $p < 0,05$, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; e *** $p < 0,0001$ em comparação aos animais do grupo controle tumoral. 5-FU: 5-fluorouracil, EtOH 2%: veículo etanol e FD: Friedelina.

A fim de avaliar o efeito da friedelina na modulação do perfil celular presente no microambiente tumoral no modelo experimental de Ehrlich ascítico, as células coletadas foram contadas e diferenciadas quanto ao tipo celular. Observou-se uma redução significativa no quantitativo de células tumorais (61,2% e 36%) e do conteúdo leucocitário total (60,4% e 63,4%) nos animais dos grupos FD50 e 200 $\mu\text{mol/Kg}$, respectivamente, (Figura 16 A, p. 65). Além disso, analisando o perfil de leucócitos na ascite tumoral, o grupo controle tumoral apresentou um proeminente infiltrado de neutrófilos e de macrófagos, e o tratamento com friedelina (50 $\mu\text{mol/Kg}$ e 200 $\mu\text{mol/Kg}$) reduziu, respectivamente, a contagem de neutrófilos em 62% e 68% e de macrófagos em 83% e 77% no microambiente tumoral, sem alterar contudo, o número de linfócitos (Figura 16 B, p. 65). Os animais que receberam o tratamento com 5-FU apresentaram o mesmo perfil de redução do desenvolvimento tumoral observados nos grupos tratados com friedelina.

Figura 16 – Efeito da friedelina na modulação do perfil celular do tEa.



Em (A) perfil celular do tEa e (B) perfil de células imunes no microambiente do tEa. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Newman-Keuls Student e Bonferroni, com $p < 0,05$, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; e *** $p < 0,0001$ em comparação aos animais do grupo controle tumoral. 5-FU: 5-fluorouracil, EtOH 2%: veículo etanol e FD: Friedelina.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (% ICT) foi calculado a partir do quantitativo de células tumorais em relação ao grupo controle tumoral, e foi observado que a friedelina apresentou um ICT de 61,22 e 35,61%, FD50 e 200 µmol/Kg, respectivamente. Enquanto o grupo controle quimioterápico 5-FU apresentou um ICT de 65,13 % (Tabela 5, p. 66).

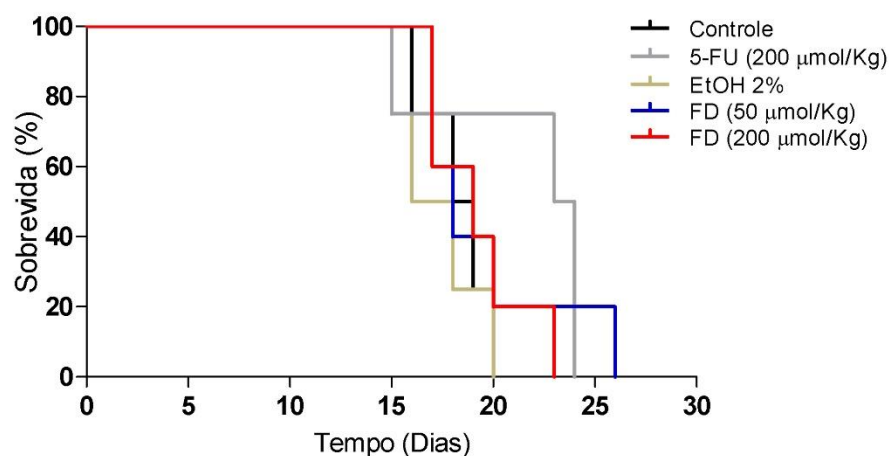
Tabela 5 - Efeito da friedelina na inibição da progressão tumoral no modelo de tEa.

Grupos	% ICT
5-FU (200 $\mu\text{mol/Kg}$)	65,13
EtOH 2%	-13,86
FD50 (50 $\mu\text{mol/Kg}$)	61,22
FD200 (200 $\mu\text{mol/Kg}$)	35,61

O percentual (%) de Inibição do Crescimento Tumoral (ICT) foi calculado em relação ao grupo controle tumoral.

5.2.3 A friedelina aumenta o tempo de sobrevida de camundongos portadores do tEa

Em outro conjunto experimental, os animais foram avaliados quanto ao tempo de sobrevida representado na curva de Kaplan-Meier (Figura 17). Animais portadores do tEa tratados com friedelina obtiveram um aumento no tempo médio de sobrevida e um incremento na expectativa de vida (19,44% e 11,11%, FD50 e 200 $\mu\text{mol/Kg}$, respectivamente) quando comparados aos animais do grupo controle sem tratamento, enquanto o grupo controle quimioterápico apresentou aumento de 8,33% na expectativa de vida dos animais portadores do tumor (Tabela 6, p. 67).

Figura 17 – Efeito da friedelina no tempo de sobrevida de camundongos portadores do tEa.

As linhas demarcam os dias de morte não solicitada de camundongos tumorizados. A análise estatística foi realizada pelo método de Kaplan-Meier. 5-FU: 5-fluorouracil, EtOH 2%: veículo etanol e FD: Friedelina.

Tabela 6 – Efeito da friedelina na sobrevivência de camundongos portadores do tEa.

Grupos	% TMS	% IEV
Controle tumoral	18	–
5-FU (200 µmol/Kg)	19,5	8,33
EtOH 2%	17,5	-2,77
FD50 (50 µmol/Kg)	21,5	19,44
FD200 (200 µmol/Kg)	20	11,11

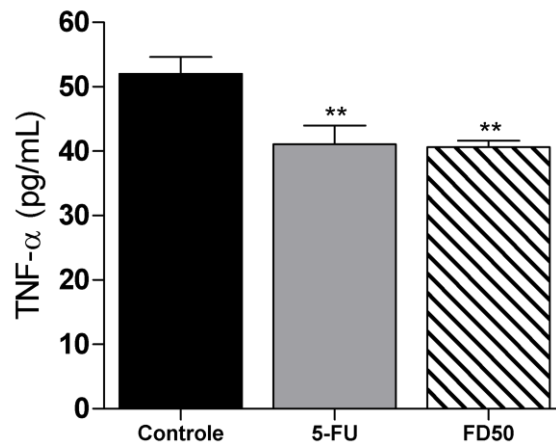
Percentual (%) do Tempo Médio de Sobrevida (TMS) e % Incremento de Expectativa de Vida (IEV). O IEV foi calculado em relação ao grupo controle tumoral (n= 5/grupo).

O conjunto de resultados obtidos até o momento, sugere que a friedelina possui atividade antitumoral no modelo tumoral de Ehrlich ascítico de maneira independente das doses avaliadas, sem interferência do solvente utilizado (EtOH 2%), além de apresentar um perfil de inibição da progressão tumoral semelhante ao do controle quimioterápico (5-FU 200 µmol/Kg) na dose de 50 µmol/Kg, uma dose 4x menor que a da dose utilizada neste trabalho do quimioterápico que já é amplamente utilizado na prática clínica. Com isso, visando o uso racional do quantitativo de animais de experimentação utilizados na pesquisa, foi selecionada a menor dose de friedelina (50 µmol/Kg) para o prosseguimento dos ensaios para a investigação dos mecanismos de ação da friedelina no modelo experimental de carcinoma de Ehrlich ascítico.

5.2.4 A friedelina modula mediadores inflamatórios e do estresse oxidativo no microambiente do tEa

Para investigar a influência da friedelina na modulação da resposta inflamatória observada nos resultados apresentados na Figura 16 (p.65), foi avaliado o efeito da friedelina frente à modulação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), um mediador importante no processo inflamatório. Foi visto que a friedelina atenuou em 22% os níveis da secreção de TNF- α . De maneira semelhante, o fármaco controle 5-FU reduziu a secreção desse mediador inflamatório no microambiente tumoral do tEa (Figura 18, p. 68).

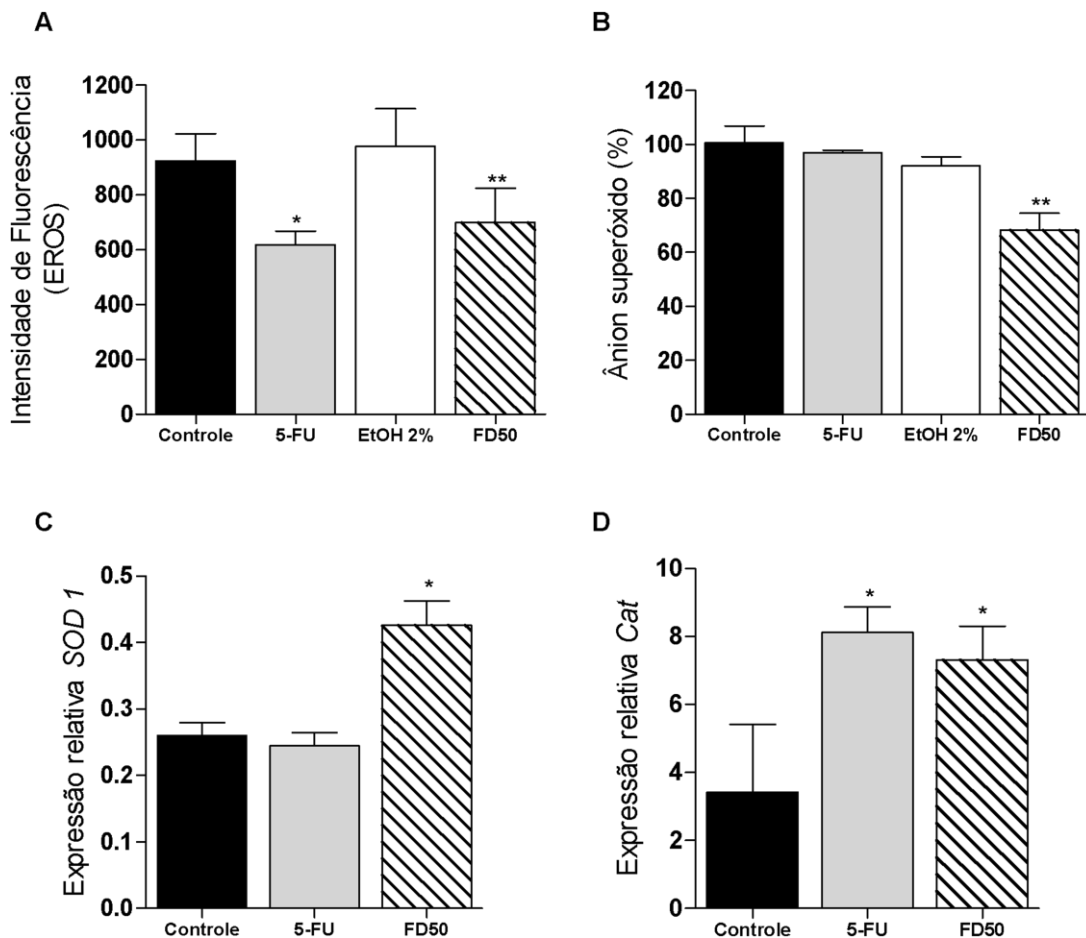
Figura 18 – Efeito da friedelina na secreção da citocina inflamatória TNF- α no microambiente do tEa.



As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Newman-Keuls Student e Bonferroni, com $p < 0,05$, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; e *** $p < 0,0001$ em comparação aos animais do grupo controle tumoral. 5-FU: 5-fluorouracil e FD: Friedelina.

Para investigar o efeito da friedelina na modulação de mecanismos envolvidos na progressão tumoral, foi investigado o potencial da friedelina na regulação de mediadores envolvidos no estresse oxidativo. As células recuperadas da ascite tumoral foram discriminadas com base no tamanho e granulosidade por citometria de fluxo e tiveram seus níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular mensurados pela sonda fluorescente H₂DCFH-DA, e a produção do ânion superóxido avaliado pelo ensaio de NBT. Em comparação ao grupo controle tumoral, as células dos animais tratados com friedelina na dose de 50 $\mu\text{mol/Kg}$, apresentaram uma redução nos níveis de EROs intracelular de 31% (Figura 19 A, p. 69) e 32% do ânion superóxido (Figura 19 B, p. 69). Além disso, foi avaliado a expressão gênica de enzimas antioxidantes, e foi observado que o tratamento com o triterpeno foi capaz de elevar a expressão de mRNA das enzimas superóxido dismutase 1 e catalase nas células do tEa (Figura 19 C e D, p. 69).

Figura 19 – Efeito da friedelina na modulação do estresse oxidativo no microambiente do tEa.



Em (A) quantificação de EROs intracelular total, (B) níveis do ânion superóxido, (C) expressão relativa da enzima superóxido desmutase por RT-qPCR e (D) expressão relativa da enzima catalase. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Newman-Keuls Student e Bonferroni, com $p < 0,05$, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; e *** $p < 0,0001$ em comparação aos animais do grupo controle tumoral. 5-FU: 5-fluorouracil, EtOH 2%: veículo etanol e FD: Friedelina.

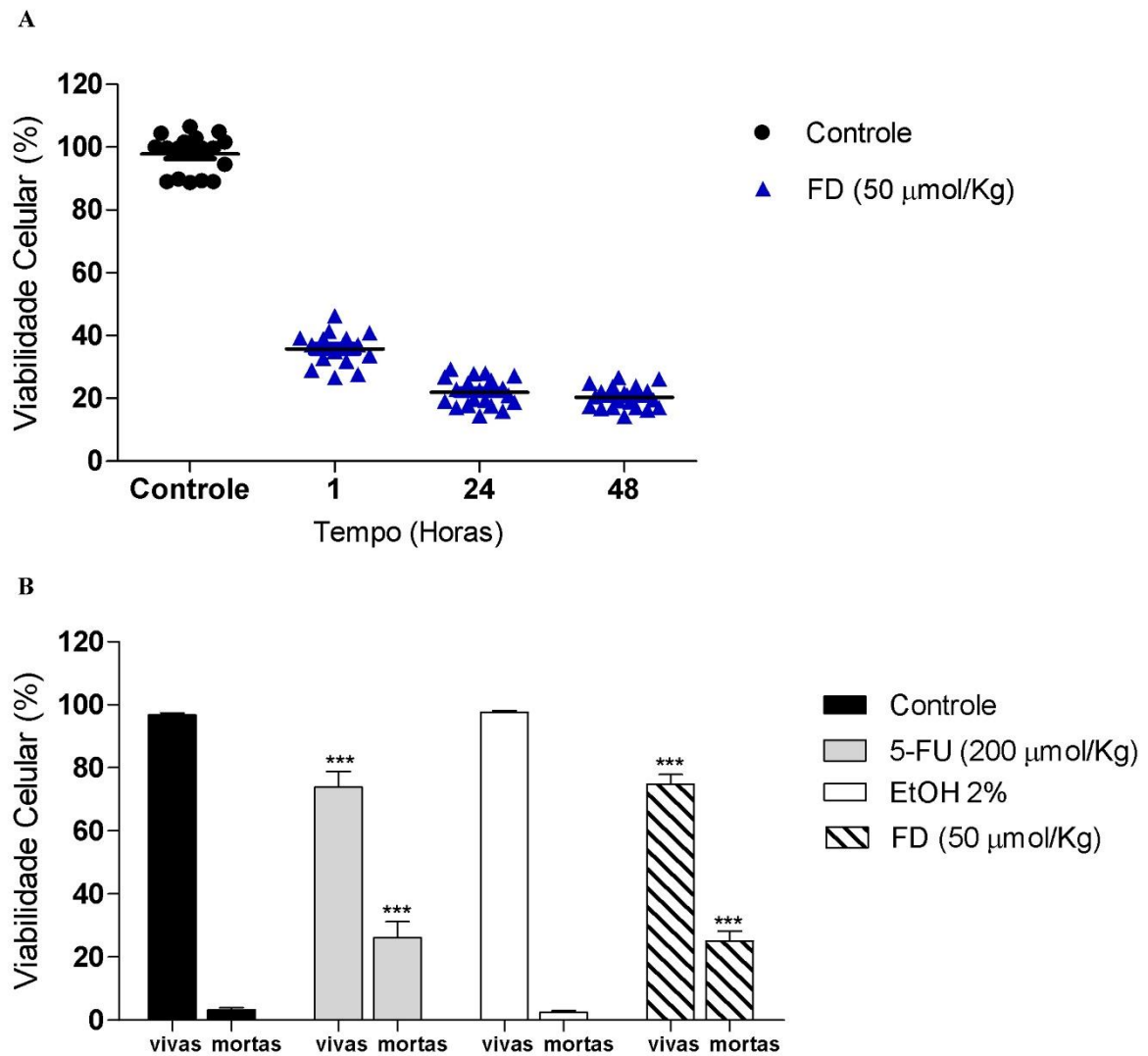
5.2.5 A friedelina induz a morte celular e interfere nas fases do ciclo celular de células do tEa

As vias mais comuns relatadas na literatura com relação a substâncias de origem natural com atividade antitumoral incluem a parada do ciclo celular, inibição da proliferação, danos ao DNA e distúrbios metabólicos que culminam na morte da célula tumoral, em geral por necrose ou apoptose (CHINEMBIRI *et al*, 2014). Os resultados obtidos até o momento, sugerem que a friedelina é um triterpeno natural com atividade antitumoral que modula diferentes componentes do microambiente tumoral que são importantes desde as etapas iniciais da carcinogênese até a evolução da doença. Assim, os experimentos seguintes abordaram a

investigação de possíveis vias de ação da friedelina pela inibição da proliferação celular no modelo de tEa.

Avaliando a viabilidade das células EAC coletadas dos camundongos tratados com friedelina (FD 50 $\mu\text{mol/Kg}$) utilizando o ensaio de MTT *ex vivo*, observou-se uma redução significativa no quantitativo de células viáveis de 62%, 76% e 78%, nos tempos de 1, 24 e 48 horas de avaliação, respectivamente, em comparação ao grupo controle tumoral (Figura 20 A). E utilizando o ensaio de exclusão com o corante azul de Tripán, foi visto uma redução significativa na viabilidade de células do tEa de animais tratados com FD em relação ao grupo controle tumoral (Figura 20 B).

Figura 20 – Efeito da friedelina na viabilidade de células do tEa.

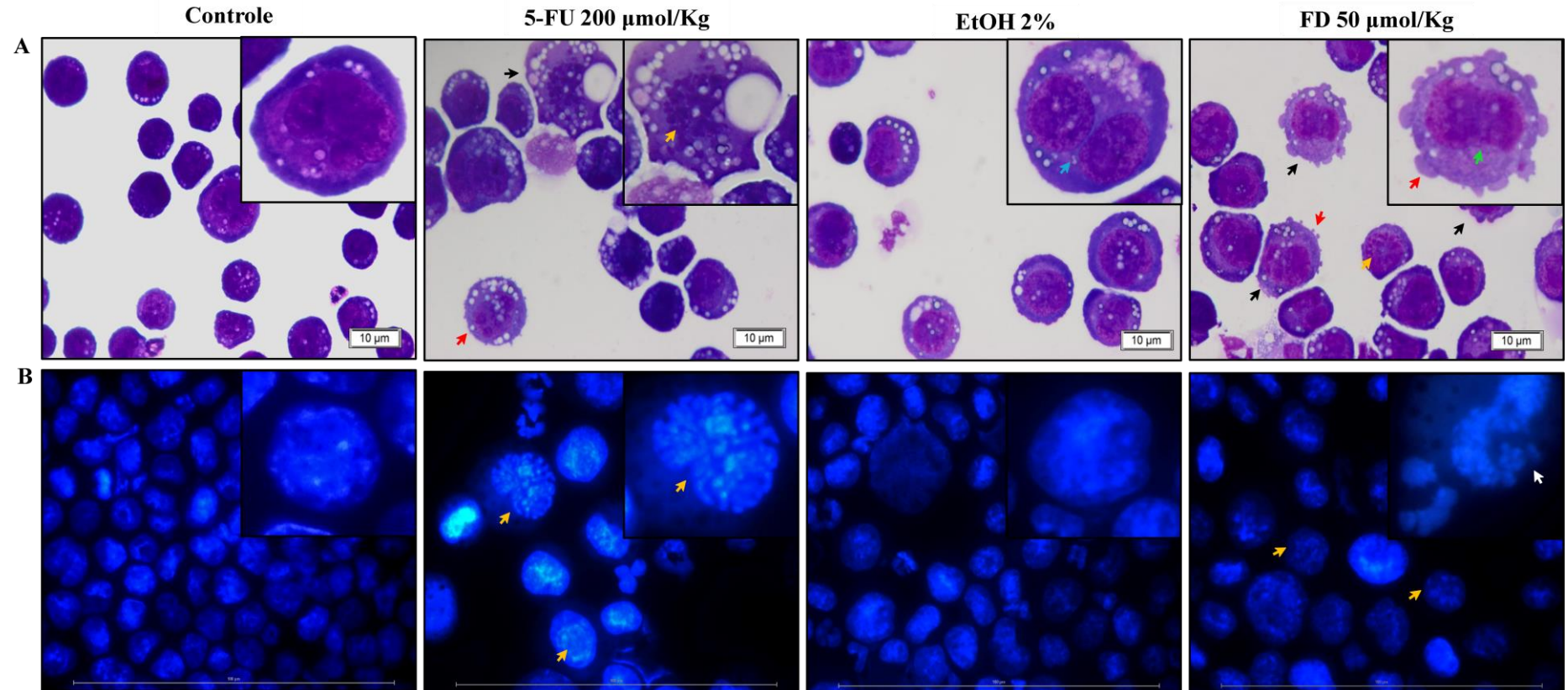


Em (A) viabilidade celular *ex vivo* por MTT e em (B), viabilidade celular por azul de Tripán. Os pontos e barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Newman-Keuls Student e Bonferroni, com $p < 0,05$, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; e *** $p < 0,0001$

em comparação aos animais do grupo controle tumoral. 5-FU: 5-fluorouracil, EtOH 2%: veículo etanol e FD: Friedelina. Células viáveis (--), em apoptose recente (+-), em apoptose tardia (++) e em necrose (-+).

Foi investigado o efeito da friedelina na morfologia de células tumorais no modelo de tEa. Avaliando a morfologia das células tumorais coradas com panótico rápido (Figura 21 A, p. 72) e com o marcador fluorescente DAPI (Figura 21 B, p. 72), foi observado que a friedelina induziu alterações na morfologia das células tumorais compatíveis com as que ocorrem no processo de apoptose celular, com a formação de *blebbing* na membrana, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Semelhantemente, o fármaco controle 5-fluorouracil induziu alterações na morfologia das células tumorais no modelo tumoral de Ehrlich ascítico.

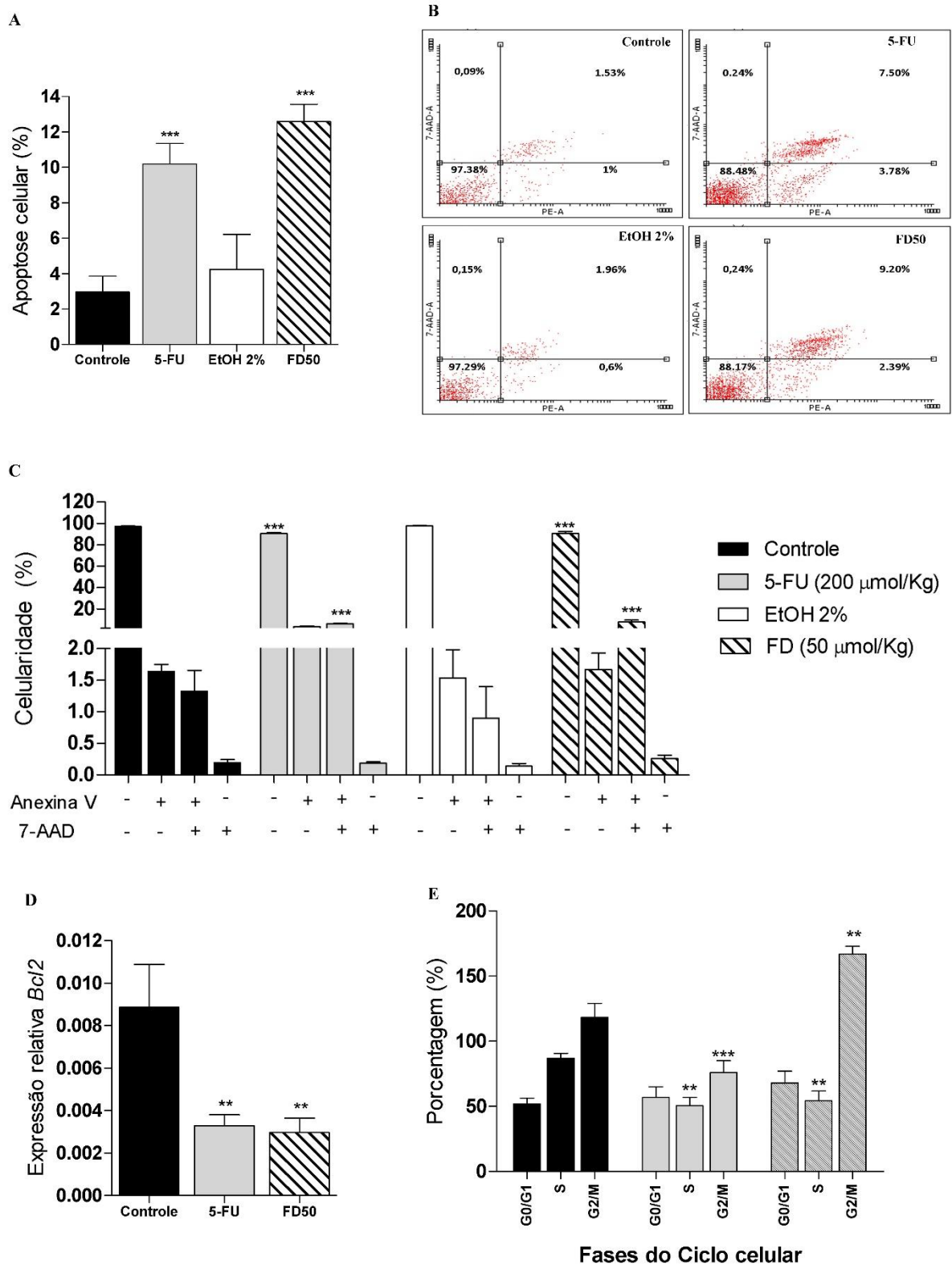
Figura 21 – Efeito da friedelina na morfologia de células tumorais do modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico.



Em (A) análise morfológica de células citocentrifugadas coradas com cristal violeta e (B) coloração com DAPI indicando alterações na morfologia nuclear. Morfologia apoptótica (seta preta), condensação da cromatina (seta verde), *blebbing* de membrana (seta vermelha) e fuso mitótico (seta azul), fragmentação nuclear (seta amarela), pleomorfismo nuclear (seta branca).

A apoptose é um tipo de morte celular altamente controlada que é caracterizada por alterações na morfologia celular, assim o perfil de morte celular foi avaliado por citometria de fluxo utilizando a dupla marcação com anexina V e 7 AAD. Foi observado um aumento expressivo de células em apoptose no grupo de animais tratados com friedelina em comparação ao grupo controle tumoral (Figura 22 A, p. 74), especificamente em apoptose tardia (Figura 22 B e C, p. 74). De maneira semelhante, o fármaco controle 5-FU 200 $\mu\text{mol/Kg}$ aumentou a população de células em apoptose. Foi observado ainda que a friedelina atenuou a expressão relativa de mRNA da proteína anti-apoptótica Bcl2 (Figura 22 D, p. 74) e induziu a parada do ciclo celular na fase G2/M evidenciada pela redução da fase de síntese (S) e acúmulo de células na fase final do ciclo celular (G2/M) (Figura 22 E, p. 74).

Figura 22 – Efeito da friedelina morte celular e na modulação do ciclo celular de células do tEa.



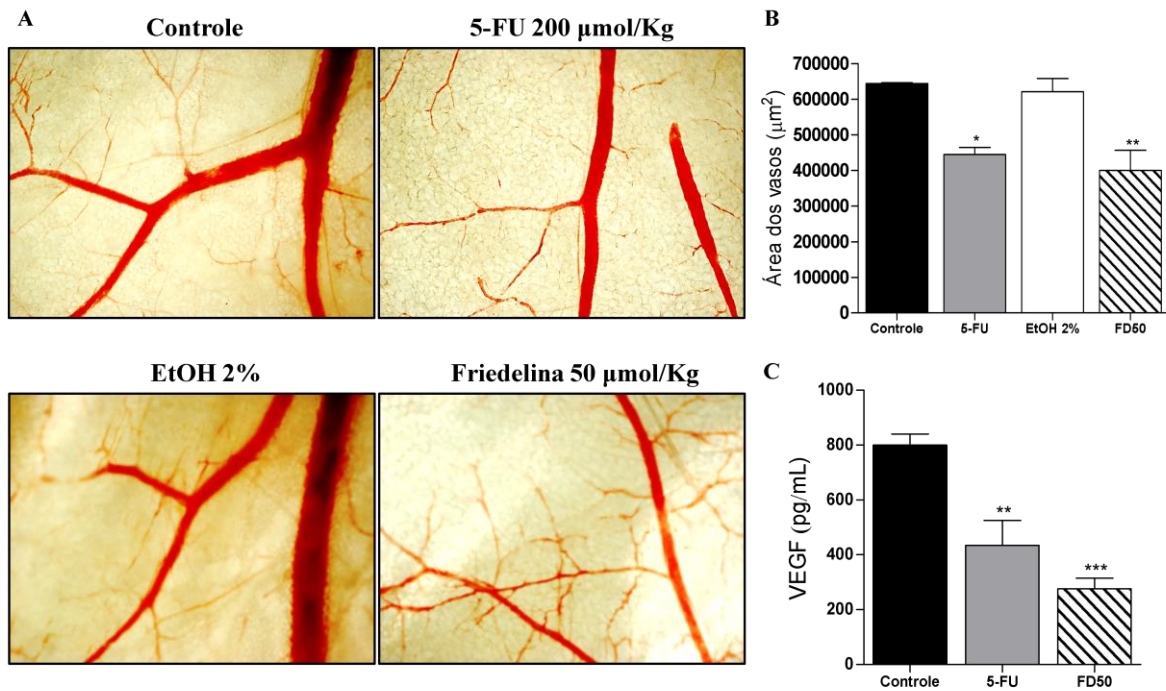
Em (A) apoptose celular total, (B) dotplots, (C) tipos de morte celular, (D) expressão relativa de *Bcl2* e (E) análise das fases do ciclo celular. Os pontos e barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Newman-Keuls Student e Bonferroni, com $p < 0,05$, onde $*p < 0,05$; $**p < 0,001$; e $***p < 0,0001$ em comparação aos animais do grupo controle tumoral. 5-FU:

5-fluorouracil, EtOH 2%: veículo etanol e FD: Friedelina. Células viáveis (--), em apoptose recente (+-), em apoptose tardia (++) e em necrose (-+).

5.2.6 A friedelina reduz a angiogênese tumoral associada a progressão do tEa

É conhecido que a angiogênese tumoral desempenha um importante papel na manutenção e na progressão da carcinogênese, uma vez que esta possibilita um maior aporte sanguíneo local, aumentando a chegada de componentes celulares ou não que são importantes para a carcinogênese, crescimento e metástase tumoral. Assim, avaliou-se a capacidade anti-angiogênica da friedelina sobre o modelo experimental de tEa. A área dos vasos sanguíneos que revestem o peritônio dos camundongos foi mensurada a partir da captura de microfotografias, e foi observado uma redução significativa (38%) na área dos vasos sanguíneos dos animais tratados com friedelina em comparação ao grupo controle tumoral (Figura 23 A e B, p. 76). Além disso, os níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) presentes no sobrenadante tumoral foi mensurado pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e foi observado uma redução de 66% dos níveis de VEGF no sobrenadante ascítico dos animais tratados com friedelina em relação ao grupo controle tumoral ($800,583 \pm 39,82$ controle tumoral para $276,093 \pm 38,42$ pg/mL de VEGF, FD 50 $\mu\text{mol/Kg}$) (Figura 23 C, p. 76). Enquanto o fármaco utilizado como controle reduziu 31% e 45%, respectivamente, da área dos vasos sanguíneos e da secreção de VEGF no microambiente do tEa.

Figura 23 – Efeito da friedelina na angiogênese tumoral no modelo murino de tEa.



Em (A) microfotografias da vascularização da região abdominal de camundongos portadores do tEa, (B) quantificação da área dos vasos sanguíneos e (C) níveis de secreção do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) no sobrenadante tumoral. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Newman-Keuls Student e Bonferroni, com $p < 0,05$, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; e *** $p < 0,0001$ em comparação aos animais do grupo controle tumoral. 5-FU: 5-fluorouracil, EtOH 2%: veículo etanol e FD: Friedelina. Aumento 40x.

6 DISCUSSÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2022), o câncer é um conjunto de doenças que apresentam uma alta taxa de mortalidade em todo mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. Mediante ao exposto, as pesquisas para compreender o processo de formação e progressão dessas doenças cresceram em todo mundo, a fim de buscar novas terapias e o aperfeiçoamento de terapias já existentes para o tratamento de neoplasias malignas.

A quimioterapia é o tratamento com maior grau de eficiência no câncer e que na maioria das vezes é associada à outras terapias a fim de reduzir a recidiva da doença (WU *et al.*, 2017). Entretanto, os graves efeitos adversos apresentados na quimioterapia do câncer como a insuficiência cardíaca congestiva, a mielossupressão, a neurotoxicidade, a imunossupressão e os efeitos mutagênicos e carcinogênicos (GHONEUM, EL-DEIN, EL-DIN, 2023), respalda a importância de novas moléculas com atividade antitumoral no mercado, visando a eficácia terapêutica e a diminuição dos efeitos adversos (LUO *et al.*, 2020; GHONEUM, EL-DEIN, EL-DIN, 2023).

Diferentes modelos experimentais são utilizados para a avaliação da atividade de potenciais candidatos a fármacos antitumorais, que vão desde modelos *in vitro* a diferentes modelos *in vivo*. O modelo experimental murino de tumor de Ehrlich tem se destacado nas pesquisas pré-clínicas por se tratar de um modelo experimental agressivo, isento de regressão espontânea, com desenvolvimento rápido e progressivo, que se assemelha a tumores humanos, é altamente transplantável, de baixo custo e de fácil manipulação, além de possibilitar avaliações citológicas completas, com análises morfológicas, funcionais e moleculares (DAGLI, GUERRA, SALDIVA, 1992; SILVA, SANTOS, CASSALI, 2006). Apesar da alta utilização desse modelo experimental na pesquisa pré-clínica para avaliação da atividade antitumoral de diferentes substâncias, há uma variedade de parâmetros analisados e utilizados de forma heterogênea na literatura, como a idade dos animais, inóculo tumoral, tempos de tratamento e análise, bem como os parâmetros de avaliação do desenvolvimento tumoral. Assim, inicialmente, o presente trabalho buscou padronizar na UFAL um protocolo para avaliação do desenvolvimento e progressão tumoral no modelo experimental de tumor de Ehrlich na sua forma ascítica.

O desenvolvimento e a agressividade tumoral do modelo de Ehrlich pode ser controlado a partir do quantitativo do inóculo tumoral bem como no tempo de crescimento tumoral (HOSSNE, 2002). Com isso, após uma revisão na literatura científica e testes iniciais no laboratório, o presente estudo utilizou o inóculo de 5×10^6 células para a indução tumoral.

Para investigar a influência da idade dos animais no desenvolvimento e progressão tumoral, foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas de 5-20 semanas de idade agrupados em diferentes faixas etárias. Foi possível verificar um aumento progressivo do desenvolvimento tumoral com a idade dos animais, em que os animais mais velhos se apresentaram mais permissíveis ao desenvolvimento tumoral em relação aos animais mais jovens, com aumento no ganho de peso, volume tumoral bem como o quantitativo de células totais (Figura 10, p. 56). Esses achados estão em concordância com a literatura na qual já é descrito que a idade avançada favorece diretamente o desenvolvimento e agressividade tumoral podendo ser explicado pelo declínio das funções imunológicas de indivíduos mais velhos (THOMAS, HEMPEL, 1976). Com isso, foi selecionada uma faixa de idade dos animais para indução tumoral de 10-14 semanas.

Em seguida, para investigar a cinética da progressão tumoral no modelo experimental estudado, camundongos tumorizados foram avaliados nos dias 1, 6, 11 e 21 do protocolo experimental. Os animais apresentaram um desenvolvimento tumoral gradativo com o tempo de análise, com aumento do ganho de peso, das medidas abdominais, do volume tumoral e da celularidade presente no líquido ascítico, sendo esses resultados refletidos no acompanhamento por imagens fotográficas e radiográficas, em que se observou que quanto maior o tempo da tumorigênese, maior o diâmetro abdominal e maior a área peritoneal dos animais (Figura 11, p. 58). Cabe destacar que, até o momento, não se tem relatos na literatura científica do acompanhamento macroscópico por imagens de raio-X como parâmetro de medida do desenvolvimento tumoral no modelo experimental estudado, sendo esta uma ferramenta não invasiva, mensurável e alinhada a outros parâmetros no acompanhamento da progressão tumoral. Em outros protocolos experimentais na literatura científica, é descrito que a taxa de crescimento tumoral está relacionada com o tempo de análise, sendo os parâmetros analisados neste trabalho importantes métodos para o acompanhamento da progressão tumoral (VINCENT, NICHOLLS, 1967; SARASWATI, AGRAWAL, ALHAIDER, 2013; EL-MAGD *et al.*, 2017). Esta análise permitiu ainda um melhor conhecimento do modelo, contribuindo para desenhos experimentais futuros, como esquemas de tratamento e análise de sobrevivência. A morfologia das células tumorais recuperada da cavidade peritoneal de camundongos tumorizados está em sintonia com a descrição morfológica das células do tumor de Ehrlich presente na literatura (Figura 12, p. 59), sendo essas células caracterizadas como células grandes, pleomórficas, com morfologia arredondada, presença de vacúolos citoplasmáticos e baixa razão núcleo/citoplasma (DAGLI, GUERRA, SALDIVA, 1992).

Sabe-se que devido à alta demanda energética requerida pelas células tumorais pelo seu perfil proliferativo, há um aumento na taxa metabólica, o que resulta em uma elevação da atividade mitocondrial e conseqüentemente uma elevada produção e acúmulo de seus subprodutos, dentre eles os radicais livres. A produção de espécies reativas de oxigênio está relacionada com a promoção de vias de proliferação e mutagênese do DNA, além de promover um microambiente inflamatório, favorecendo o desenvolvimento e a progressão de neoplasias malignas (GORRINI, HARRIS, MAK, 2013). Com isso, analisando a produção de EROs intracelular por citometria de fluxo, foi observado um aumento expressivo nos níveis de EROs nas células coletadas de animais tumorizados em comparação às células residentes da cavidade peritoneal de animais saudáveis. Entretanto, não houve diferença significativa entre os tempos avaliados (Figura 11 H, p. 58), podendo estar relacionado com a estabilização do microambiente oxidativo visto que, em níveis elevados, as EROs podem promover danos nas células tumorais aumentando a sensibilidade aos quimioterápicos, além da ativação de vias que promovem a morte celular (APPIERTO *et al.*, 2009). Diante do exposto, a fim de definir um protocolo experimental para avaliação da atividade antitumoral de substâncias, garantindo o bem-estar animal, bem como uma resposta de substâncias ao tumor de Ehrlich ascítico e a manutenção da agressividade tumoral, foi selecionado o protocolo de 11 dias de avaliação, visto que o desenvolvimento tumoral se deu de maneira semelhante ao protocolo de análise de 16 dias, com alta agressividade mas sem alterações comportamentais debilitantes dos animais observadas a partir do 18º dia de análise.

Como já mencionado, o câncer é uma doença complexa que apesar dos esforços nos estudos relacionados a profilaxia, carcinogênese, progressão e tratamento, é a segunda maior causa de mortes em todo mundo. As estatísticas de incidência dessas doenças para os próximos anos é preocupante, destacando ainda mais a necessidade de pesquisas de terapias para o tratamento dessas doenças.

Os produtos naturais têm se mostrado como importantes fontes de bioativos para o tratamento de diferentes doenças há milênios (HARDY *et al.*, 2012; OLAS, 2022). Diversas substâncias isoladas de plantas medicinais têm sido identificadas e estudadas para o tratamento de doenças de grande impacto no sistema de saúde, dentre elas o câncer (WANG *et al.*, 2021).

Dentre os metabólitos presentes em diferentes espécies vegetais, os terpenos se destacam por apresentarem diferentes propriedades biológicas como as atividades antimicrobiana, antinociceptiva, cicatrizante, anti-inflamatória e antitumoral (PATERAKI, HESKES, HAMBERGER, 2015). Essa diversidade de atividades biológicas se dá, pois, os

terpenos apresentam uma estrutura química variada, possibilitando uma diversidade de efeitos biológicos (JANOCHA, SCHIMITZ, BERNAHARDT, 2015).

A friedelina é um triterpeno pentacíclico presente em diferentes espécies vegetais com importantes atividades biológicas descritas, incluindo a atividade antitumoral *in vitro* (SUBASH-BABU, Li, ALSHATWI, 2017; CHANG, WANG, XIAO, 2020). Entretanto, o efeito antitumoral *in vivo* desse triterpeno ainda é desconhecido. Neste estudo, buscou-se investigar o potencial efeito antitumoral do triterpeno pentacíclico friedelina frente ao modelo experimental murino de tumor de Ehrlich ascítico.

Para investigar o efeito da friedelina em células tumorais de Ehrlich ascítico, células provenientes de um animal doador foram expostas, *in vitro*, à friedelina. A friedelina foi capaz de reduzir de forma expressiva a viabilidade das células EAC a partir de 48 horas de exposição (Figura 13, p. 60). Assim, deu-se prosseguimento na avaliação da atividade antitumoral da friedelina *in vivo*.

Camundongos *Swiss* tumorizados tratados com friedelina, apresentaram uma redução da progressão tumoral no modelo de Ehrlich ascítico, com redução da ascite tumoral associada a diminuição da proliferação celular observada pelo menor número de células totais presentes no tumor (Figura 14, p. 62). Alinhados a esses resultados, foi visto que o ganho de peso e o aumento da circunferência abdominal bem como da área peritoneal dos animais encontra-se diretamente associada ao acompanhamento da progressão tumoral, sendo esses parâmetros reduzidos em animais tratados com a friedelina de forma semelhante aos animais tratados com o controle quimioterápico 5-Fluorouracil, um fármaco amplamente utilizado para o tratamento de várias neoplasias que tem por mecanismo de ação a inibição da timidilato sintase, prejudicando as funções de síntese de DNA em células tumorais (LONGLEY, HARKIN, JOHNSTON, 2013). Além disso, os seus subprodutos podem ser incorporados erroneamente ao RNA e causar danos, levando à fragmentação do DNA e consequente ativação da maquinaria de apoptose celular (LONGLEY, HARKIN, JOHNSTON, 2013). Os parâmetros de redução tumoral avaliados são bem explorados em diferentes protocolos experimentais, em que diferentes substâncias com propriedades antitumorais, incluindo moléculas de origem natural, foram capazes de reduzir tais parâmetros, sendo importantes indicadores da atividade antiproliferativa de substâncias no modelo experimental avaliado (AGRAWAL *et al.*, 2011; SARASWATI, AGRAWAL, ALHAIDER, 2013; EL-MAGD *et al.*, 2017; HARSHA *et al.*, 2017; GHONEUM *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; SRINIVAS, SHIVAMADHU, JAYARAMA, 2021; MORSI, 2022).

A análise macroscópicas por imagens fotográficas e radiográficas realizadas neste trabalho, possibilitou o acompanhamento do desenvolvimento tumoral e ainda observar a redução da progressão tumoral em animais tratados com a substância teste, em que animais tratados com friedelina apresentaram uma diminuição da área peritoneal calculada a partir das imagens de raio-X em relação ao grupo controle tumoral, estando essa diminuição associada a outros parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral avaliados neste trabalho (Figura 15, p. 63), sendo, portanto, uma importante ferramenta para o acompanhamento do desenvolvimento tumoral e que pode auxiliar como parâmetro de medida não invasivo para a avaliação da atividade antitumoral de substâncias.

Outro parâmetro utilizado na avaliação da atividade antitumoral de substâncias é o efeito no tempo de sobrevida como resultado da atenuação da progressão tumoral alinhado a possíveis efeitos tóxicos de substâncias. Neste trabalho foi observado que a friedelina inibe a progressão tumoral aumentando o tempo médio de sobrevida dos animais, com incremento da taxa de expectativa de vida de até 2,3 vezes maior que os animais tratados com o fármaco quimioterápico controle (Tabela 6, p. 67), o que pode ser explicado pelos graves efeitos tóxicos observados no tratamento com o 5-fluorouracil nos sistemas hematológico, neural, cardíaco, gastrointestinal e renal, além da farmacoresistência, o que pode influenciar na sobrevida dos animais (DIASIO, HARRIS, 1989; REFAIE *et al.*, 2021; ELGHAREEB *et al.*, 2021).

O tumor de Ehrlich é um modelo experimental com alta agressividade e isento de regressão espontânea devido a sua baixa imunogenicidade, e isso se dá devido a não expressão de moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II (MHC II), o que leva ao escape dessas células tumorais das células do sistema imunológico importantes na resposta imune antitumoral (CHEN, WATKINS, 1970). É descrito na literatura que substâncias com atividade antitumoral podem modular a resposta inflamatória pró-carcinogênica a fim de promover uma desregulação do microambiente tumoral, podendo levar à morte celular (GANDHI *et al.*, 2022). Devido a isso, avaliou-se o efeito da friedelina frente ao perfil de células imunes presentes no microambiente do tEa. Foi observado que a friedelina reduziu o número de células tumorais, com inibição do crescimento tumoral de maneira semelhante ao fármaco utilizado como controle. Foi observado ainda uma redução do conteúdo leucocitário total, associado a redução do infiltrado de neutrófilos e de macrófagos no microambiente tumoral, sem alterar, contudo, o quantitativo de linfócitos (Figura 16, p. 65). A modulação da resposta inflamatória observada pode ser explicada pela atividade anti-inflamatória da friedelina em diferentes modelos experimentais, em que foi observado que a friedelina reduziu o infiltrado de neutrófilos, macrófagos e citocinas pró-inflamatórias modulando a resposta

inflamatória local. (FERRO, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2019; SANDHU *et al.*, 2022; JIANG *et al.*, 2022).

É conhecido que o perfil inflamatório desempenha papel crucial em todas as etapas da carcinogênese, incluindo a iniciação, a promoção, a angiogênese e a metástase (BAUMGARTEN, FRASOR, 2012), sendo a inflamação crônica um importante aliado no desenvolvimento de neoplasias maligna. Sendo assim, moléculas capazes de modular a resposta inflamatória no microambiente tumoral são importantes aliados no desenvolvimento de terapias imunomoduladoras no câncer (GANDHI *et al.*, 2022).

Selecionando a menor dose de friedelina para continuidade das investigações dos mecanismos relacionados à atividade antitumoral desta molécula, foi investigado a influência da friedelina na modulação da resposta inflamatória frente a mediadores importantes no processo inflamatório. O tratamento com FD atenuou os níveis de TNF- α presente no sobrenadante tumoral (Figura 18, p. 68) sendo esta uma importante citocina pró-inflamatória que no microambiente tumoral é secretado por células estromais, principalmente macrófagos associados ao tumor, e pelas próprias células tumorais, favorecendo o desenvolvimento tumoral pela ativação de vias importantes para a progressão da carcinogênese e metástase tumoral, além do recrutamento de células inflamatórias potencializando a inflamação tumoral (CRUCERIU *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo está bem relacionado com a promoção da carcinogênese e da progressão tumoral em diferentes tipos de cânceres, sendo as espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o superóxido, importantes moléculas envolvidas nesse processo, uma vez que são moléculas instáveis que danificam macromoléculas celulares, como o DNA por exemplo, causando instabilidade genômica, sendo este um fator que contribui para a carcinogênese (CHEUNG, VOUSDEN, 2022). Tem sido descrito o papel das EROs em todas as etapas dessas doenças, desde a carcinogênese à metástase celular, uma vez que as EROs podem funcionar como moléculas sinalizadoras para conduzir a proliferação, a migração, a invasão, a transição epitelial mesenquimal (TEM) e a adesão às células endoteliais, sendo esses mecanismos fundamentais na progressão do câncer (CHEUNG, VOUSDEN, 2022). Além disso, as EROs também estão relacionadas com a inflamação, uma vez que essas moléculas podem oxidar biomoléculas levando a ativação de sinais inflamatórios como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (LIU *et al.*, 2017). Sabe-se ainda que altos níveis de EROs pode levar a um desequilíbrio da resposta imune, que no microambiente tumoral agrava a inflamação levando a progressão da doença, sendo a manutenção da inflamação um dos mecanismos utilizados pelas células tumorais que pode culminar na quimiorresistência (WU *et al.*, 2014).

Por outro lado, as EROs podem causar danos celulares importantes, podendo culminar na morte das células cancerígenas (CHEUNG, VOUSDEN, 2022). Com isso, modular a produção de EROs no microambiente tumoral bem como outros mediadores inflamatórios tornou-se uma importante via terapêutica no tratamento do câncer (APPIERTO *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2022).

Os resultados apresentados neste trabalho indicaram que a friedelina pode exercer atividade antioxidante no microambiente do tumor de Ehrlich ascítico, atenuando os níveis de EROs intracelulares e aumentando a defesa antioxidante com um aumento na expressão gênica das enzimas catalase e superóxido dismutase (Figura 19, p. 69), que catalisam peróxido de hidrogênio à oxigênio e água, e superóxido à peróxido de hidrogênio, respectivamente (FORMAN, ZHANG, 2021). Os nossos achados corroboram com a literatura, em que já é descrito o efeito antioxidante da friedelina em diferentes modelos experimentais. Sunil e colaboradores (2013) observaram um importante efeito da friedelina na redução do estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono por atenuar os níveis de EROs e elevar a atividade das enzimas antioxidante SOD, CAT e GPx no fígado de camundongos de forma semelhante ao fármaco silimarina, além de possuir efeito redutor análogo à vitamina C e hidroxitolueno butilado. No modelo murino de asma, a friedelina aumentou a atividade da enzima catalase reduzindo os danos no parênquima pulmonar de camundongos desafiados com ovalbumina, sendo seu efeito antioxidante combinado ao efeito anti-inflamatório nesse modelo experimental (FERRO, 2016). Já no modelo de neurodegeneração induzido por escopolamina em camundongos, a friedelina restaurou a atividade enzimática das enzimas antioxidantes SOD, CAT, POD, GSH e atenuou a atividade de TBARS (SANDHU *et al.*, 2022).

É descrito na literatura que as vias mais comuns relacionadas com a atividade antitumoral de substâncias de origem natural, incluem a inibição da proliferação de células tumorais, a parada do ciclo celular, danos ao DNA, distúrbios metabólicos e indução da morte celular por necrose ou apoptose (CHINEMBIRI *et al.*, 2014). Com isso, investigou-se outras possíveis vias de ação da friedelina para o seu efeito antitumoral no modelo de Ehrlich ascítico.

Os resultados indicaram que a friedelina interferiu nas fases do ciclo celular induzindo a parada do ciclo nas fases G2/M (Figura 22 E, p. 74) e reduziu a viabilidade de células EAC (Figura 20, p. 70) por indução da morte celular por apoptose no estágio de proliferação celular (Figura 22 A, p. 74). A apoptose é um processo de morte celular programada responsável pela eliminação de células defeituosas, sendo a disfunção da maquinaria apoptótica um dos alvos na terapêutica do câncer (MORANA *et al.*, 2022) e, por isso, substâncias capazes de induzir a apoptose têm sido amplamente estudadas, incluindo derivados naturais a exemplo o resveratrol,

(YANG *et al.*, 2022). A apoptose é iniciada por mecanismos moleculares na cascata de sinalização das caspases e disfunção mitocondrial, podendo então mediar os níveis de expressão das principais proteínas envolvidas na apoptose, incluindo os membros da família Bcl-2 que interagem para regular a apoptose, sendo o equilíbrio entre os níveis desses membros essenciais para a iniciação ou não do processo apoptótico (KUMAR, 2007; GHONEUM *et al.*, 2023). Na tentativa de investigar as vias responsáveis pelo efeito apoptótico da friedelina, avaliou-se os níveis de expressão de mRNA da proteína anti-apoptótica Bcl2. Neste estudo, verificou-se que a friedelina atenuou a expressão relativa de mRNA de Bcl2 (Figura 22 D, p. 74). Esses achados estão em concordância com os dados presentes na literatura em que foi observado a redução da expressão gênica, bem como de proteínas fosforiladas de moléculas envolvidas na cascata de sinalização da apoptose, incluindo a proteína Bcl2, de células tumorais *in vitro* (SUBASH-BABU; LI; ALSHATWI, 2017; CHANG; WANG; XIAO, 2020), sugerindo que a friedelina possa estar ativando a cascata de sinalização mitocondrial e regulando positivamente as vias de sinalização a jusante que levam a ativação das caspases, culminando na apoptose celular.

A indução da morte celular e a inibição da proliferação celular estão intimamente relacionadas à ativação de uma variedade de vias de sinalização intracelular. É descrito na literatura que a friedelina modula vias importantes em diferentes modelos experimentais. Na diabetes de mellitus a friedelina ativou a via PI3K/AKT promovendo uma redução da patogênese da doença (SUNIL *et al.*, 2021), e no modelo de neurodegeneração a friedelina inibiu a fosforilação da via JNK, importante por promover neuroinflamação (SANDHU *et al.*, 2022). Já no modelo de colite ulcerativa a friedelina modulou a via AMPK-mTOR promovendo a autofagia (SHI *et al.*, 2021) e em células de leucemia humana inibiu o crescimento e metástase celular pela indução da apoptose celular via ativação da cascata de sinalização pró-apoptótica, além de bloquear as vias de sinalização PI3K/AKT e MERK/ERK, que são vias que encontram-se desreguladas em células neoplásicas e que quando ativadas, podem promover a manutenção e a sobrevivência celular (CHANG; WANG; XIAO, 2020).

A angiogênese é um processo fisiológico complexo envolvido na patogênese de diferentes patologias, dentre elas o câncer, estando relacionada nas diferentes etapas da carcinogênese, promovendo a manutenção, a progressão e a metástase tumoral (FOLKMAN, 2007). Com isso, compreender as vias de sinalização que controlam a angiogênese tumoral é um importante objetivo na terapia do câncer para o desenvolvimento de fármacos eficazes (BEECKEN *et al.*, 2001; HUSSEN *et al.*, 2022). Alguns fármacos com ação antitumoral foram desenvolvidos para inibir fatores angiogênicos, como é o caso do Bevacizumab (Avastin) que tem por alvo a inibição da ligação do VEGF ao seu receptor inibindo a angiogênese tumoral.

Esse fármaco foi aprovado pelo FDA em 2004 e atualmente é utilizado no tratamento de diversas neoplasias malignas, como o câncer cervical, câncer colorretal, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais, câncer epitelial ovariano, câncer nas trompas de falópio ou peritoneal primário, câncer de pulmão, dentre outras neoplasias (COHEN *et al.*, 2009; FDA, 2018).

É descrito na literatura que o desenvolvimento do tEa é dependente da angiogênese tumoral, uma vez que as células do carcinoma de Ehrlich ascítico secretam VEGF, um importante fator angiogênico que aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos locais e potencializa a formação da ascite tumoral, levando a progressão da tumorigênese (LUO *et al.*, 1998). Os resultados deste trabalho sugerem que a friedelina reduz a angiogênese tumoral no modelo murino de tumor de Ehrlich ascítico inibindo a secreção de VEGF pelas células tumorais (Figura 23. p. 76). Os resultados obtidos corroboram com dados na literatura em que foi relatado que substâncias naturais com atividade antitumoral como a lectina ligadora de manose isolada do pseudocaule de *Musa acuminata* foi capaz de reduzir a angiogênese tumoral no modelo experimental de Ehrlich *in vivo* e no modelo CAM (membrana corioalantóide) *in ovo*, modulando a secreção de VEGF, sendo, portanto, uma importante via de ação de moléculas com atividade antitumoral (SRINIVAS, SHIVAMADHU, JAYARAMA, 2021).

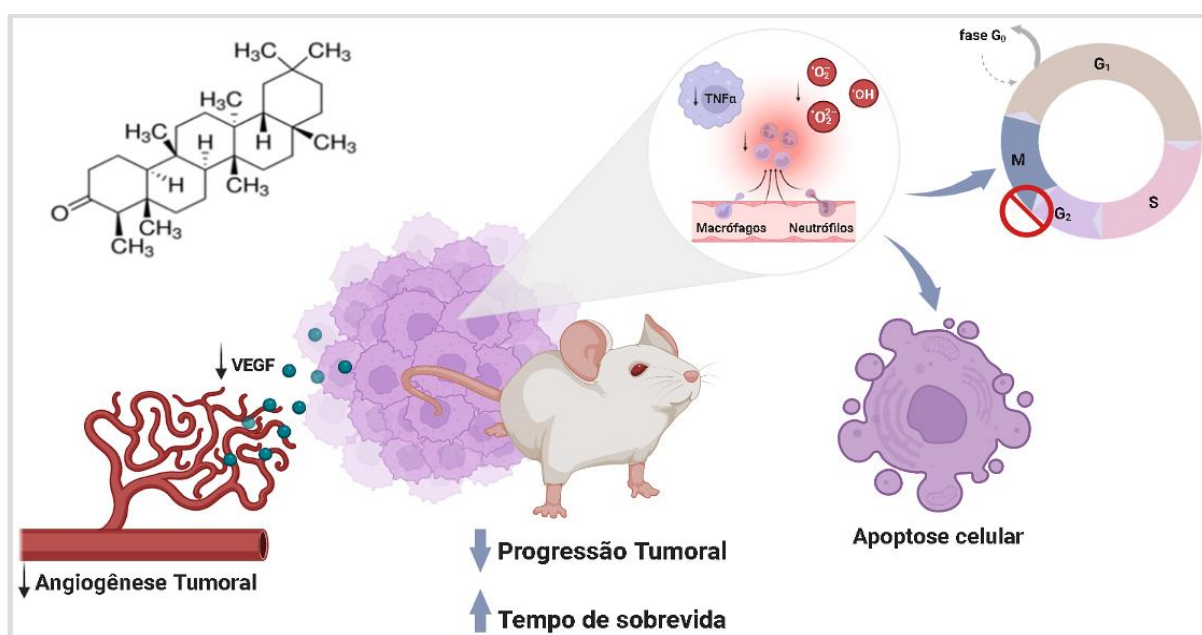
Por fim, pode-se concluir que os efeitos moduladores do microambiente tumoral evidenciados pelo tratamento da friedelina no modelo tumoral de Ehrlich ascítico favoreceram a diminuição da progressão tumoral, sendo, portanto, a friedelina um produto natural com ação antitumoral *in vivo* no modelo experimental avaliado. Entretanto, mais esclarecimentos são necessários sobre os efeitos envolvidos na atividade farmacológica da friedelina no modelo de tumor de Ehrlich ascítico.

7 CONCLUSÃO

O modelo tumoral de Ehrlich na sua forma ascítica foi padronizado no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, seguindo um padrão semelhante ao descrito na literatura, com sua fase exponencial de crescimento celular a partir do 6º dia após a inoculação das células na cavidade peritoneal de camundongos, podendo o desenvolvimento tumoral ser acompanhado a partir de imagens radiográficas, caracterizando-se como um método não invasivo no acompanhamento do desenvolvimento tumoral, sendo ainda passível de quantificação.

Além disso, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a friedelina é um triperpeno natural com potencial antitumoral no modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico, por ser capaz de reduzir de forma significativa os parâmetros do desenvolvimento e progressão tumoral avaliados de maneira semelhante ao fármaco quimioterápico utilizado como controle, sem interferência solvente utilizado, levando a um aumento no tempo de sobrevivência de camundongos portadores do tEa. Os resultados indicam que a friedelina inibe a progressão tumoral reduzindo a angiogênese associada ao tumor pela supressão da liberação de VEGF pelas células tumorais e modulando a inflamação tumoral pela inibição do infiltrado de neutrófilos e macrófagos, e por atenuar os níveis de TNF- α e dos radicais livres no microambiente do tEa, além de diminuir a viabilidade celular por induzir a morte celular por apoptose e a parada do ciclo celular na fase de proliferação celular (G2/M) (Figura 24).

Figura 24 – Resumo gráfico dos efeitos da friedelina frente ao tEa.



Fonte: Autor, 2022.

Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho evidenciam o potencial farmacológico da friedelina no câncer, especialmente em modelar o microambiente tumoral do modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos celulares, bioquímicos e moleculares envolvidos na resposta da friedelina frente ao modelo murino de tumor de Ehrlich ascítico.

PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectiva avaliar a expressão gênica de outros marcadores envolvidos na cascata de sinalização de morte celular, avaliar o perfil de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante tumoral de animais tratados com friedelina, avaliar o efeito da friedelina na modulação da resposta imune do hospedeiro, realizar ensaios de toxicidade e investigar as possíveis vias de sinalização envolvidas no efeito antitumoral desse triterpeno no modelo experimental de Ehrlich ascítico.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). About Basal and Squamous Cell Skin Cancer. Atlanta, 2016.p. 9. Disponível em: <
<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8818.00.pdf> > Acesso em: 15 maio de 2022.
- ADDEO, A.; FRIEDLAENDER, A. Cancer and COVID-19: Unmasking their ties. **Cancer treatment reviews**, v. 88, p. 102041, 2020.
- AGRA, L. C.; LINS, M.P.; MARQUES, P. S.; SMANIOTTO, S; MELO, C. B.; LAGENT, V.; BARRETO, E. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. **European Journal of Pharmacology**, 780 (6), 232-242, 2016.
- AGRAWAL, S. S.; SARASWATI, S.; MATHUR, R.; PANDEY, M. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life sciences**, v. 89, n. 5-6, p. 147-158, 2011.
- APPIERTO, V.; TIBERIO, P.; VILLANI, M. G.; CAVADINI, E.; FORMELLI, F. PLAB induction in fenretinide-induced apoptosis of ovarian cancer cells occurs via a ROS-dependent mechanism involving ER stress and JNK activation. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 5, p. 824–831, 2009.
- ARAÚJO, C. R. R.; SILVA, T. M.; SANTOS, M. G.; OTTONI, M. H. F.; FAGUNDES, E. M. S.; FONTOURA, H. S.; MELO, G. E. B. A.; ALCÂNTARA, A. F. C. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of the extracts, fractions, and chemical constituents isolated from *Luehea ochrophylla* Mart. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 19(1). 2019.
- AYDINER, A.; RIDVANOGULLARI, M.; ANIL, D.; TOPUZ, E.; NURTEN, R.; DISCI, R. Combined effects of epirubicin and tamoxifen on the cell-cycle phases in estrogen-receptor-negative Ehrlich ascites tumor cells. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 123, n. 2, p. 113-117, 1997.
- BAHCECIOGLU. G.; BASARA, G.; ELLIS, B.W.; REN, X.; ZORLUTUNA, P. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. **Acta Biomater**, 1;106:1-21, 2020.
- BAKSHI, H. A.; QUINN, G. A.; NASEF, M. M.; MISHRA, V.; ALJABALI, A. A.; EL-TANANI, M.; ... TAMB UWALA; M. M. Crocin Inhibits Angiogenesis and Metastasis in Colon Cancer via TNF- α /NF-kB/VEGF Pathways. **Cells**, v. 11, n. 9, p. 1502, 2022.
- BAUMGARTEN, S. C.; FRASOR, J. Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. **Molecular Endocrinology, Chevy Chase**, v. 26, no. 3, p. 360–371. 2012.
- BEECKEN, W.-D. C.; FERNANDEZ, A.; JOUSSEN, A. M.; ACHILLES, E.-G.; FLYNN, E.; LO, K.-M.; GILLIES, S. D.; JAVAHERIAN, K.; FOLKMAN, J.; SHING, Y. Effect of Antiangiogenic Therapy on Slowly Growing, Poorly Vascularized Tumors in Mice. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, 93(5), 382–387. 2001.

BENAVENTE, S.; SÁNCHEZ-GARCÍA, A.; NACHES, S.; LLEONART, M. E.; LORENTE, J. Therapy-Induced modulation of the tumor microenvironment: new opportunities for cancer therapies. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 582884, 2020.

BRABLETZ, T.; JUNG, A.; SPADERNA, S.; HLUBEK, F.; KIRCHNER, T. Migração de células-tronco cancerígenas - um conceito integrado de progressão tumoral maligna. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 9, pág. 744-749, 2005.

BERGAMI-SANTOS, P. C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J. A. M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.

BREASTED, J. H. The Edwin Smith Surgical Papyrus Vol. 3, 405 (The University of Chicago Press, 1930).

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BURKHOLDER, B.; HUANG, R. Y.; BURGESS, R.; LUO, S.; JONES, V. S.; ZHANG, W.; ZHI-QIANG, L. V.; GAO, C.; WANG, B.; ZHANG, Y.; HUANG, R. P. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 2, p. 182-201, 2014.

CHANG, W.; WANG, J.; XIAO, Y. Friedelin inhibits the growth and metastasis of human leukemia cells via modulation of MEK/ERK and PI3K/AKT signalling pathways. **JBUON**. 25(3): 1594-1599, 2020.

CHEON, D.; ORSULIC, S. Mouse models of cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 95-119, 2011.

CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. **Nature**, 225(5234):734-5, 1970.

CHEUNG, E. C.; VOUSDEN, K. H. The role of ROS in tumour development and progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 5, p. 280-297, 2022.

CHINEMBIRI, T. N.; PLESSIS, L.H.; GERBER, M.; HAMMAN, J. H.; PLESSIS, J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. **Molecules**, 19 (8), p. 11679-11721, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. Suppl. 2, p. 41-59, 2016.

COHEN, M. H.; SHEN, Y. L.; KEEGAN, P.; PAZDUR, R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin®) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. **The oncologist**, v. 14, n. 11, p. 1131-1138, 2009.

CRUCERIU, D.; BALDASICI, O.; BALACESCU, O.; BERINDAN-NEOGOE, I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. **Cellular Oncology**. 43, pages1–18. 2020.

DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. An Experimental Study on the Lymphatic Dissemination of the Soud Ehruch Tumor in Mice. **Braz. J. vet Res. anim. Sci**, v. 29, n. 1, p. 97–103, 1992.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 1, p. 24-37, 2006.
DIASIO, R. B.; HARRIS, B. E. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clinical Pharmacokinetics** 16, 215–237, 1989.

DEVITA JR, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer research**, v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 2008.

DOBOSZ, P.; DZIECIĄTKOWSKI, T. The intriguing history of cancer immunotherapy. **Frontiers in immunology**, p. 2965, 2019.

DONG, S.; LIANG, S.; CHENG, Z.; ZHANG, X.; LUO, L.; LI, L.; ... HU, S. ROS/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signalings activate HIF-1 α -induced metabolic reprogramming to impart 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, p. 1-27, 2022.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. v. 12, p. 4-29. 2016.

ELGHAREEB, M. M.; ELSHOPAKEY, G. E.; HENDAM, B. M.; REZK, S.; LASHEN, S. Synergistic effects of Ficus Carica extract and extra virgin olive oil against oxidative injury, cytokine liberation, and inflammation mediated by 5-Fluorouracil in cardiac and renal tissues of male albino rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 4, p. 4558-4572, 2021.

EL-MAGD, M. A.; KHAMIS, A.; NASR ELDEEN, S. K.; IBRAHIM, W. M.; SALAMA, A. F. Trehalose enhances the antitumor potential of methotrexate against mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 92, 870–878, 2017.

EULBERG, D., FRÖMMING, A., LAPID, K., MANGASARIAN, A., & BARAK, A. The prospect of tumor microenvironment-modulating therapeutical strategies. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022.

FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. **Frontiers in pharmacology**, p. 1300, 2018.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83-89, 2019.

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.

FERRO, J. N. S. **Efeito farmacológico da friedelina livre e complexada em hidroxipropil- β -ciclodextrina em modelos de inflamação em roedores**. Tese (Doutorado em Ciências da saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Maceió, p. 141. 2016.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 6, n. 4, p. 273-286, 2007.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 442-447, 1987.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) USA, 2018. Disponível em: <
<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-bevacizumab-combination-chemotherapy-ovarian-cancer> > Acesso em: 07 de dezembro de 2022.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689-709, 2021.

FRANKEN, N. A.; RODERMOND, H. M.; STAP, J., HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

GABAI, V. L.; ZAMULAEVA, I. V.; MOSIN, A. F.; MAKAROVA, Y. M.; MOSINA, V. A.; BUDAGOVA, K. R.; ... & KABAKOV, A. E. Resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due to accumulation of heat shock proteins. **FEBS letters**, v. 375, n. 1-2, p. 21-26, 1995.

GANDHI, G. R.; ANTONY P, P. J.; LANA, S.; OLIVEIRA, R. V., JOTHI, G.; HARIHARAN, G.; MOHANA, T.; GAN, R.; GURGEL, R. Q.; CIPOLOTTI, R.; JÚNIOR, L. J. Q. Natural products modulating interleukins and other inflammatory mediators in tumor-bearing animals: A systematic review. **Phytomedicine**. 100:154038. 2022.

GHONEUM, M.; EL-DEIN, M. A.; EL-DIN, N. K. B. Anticancer potential of Marina Crystal Minerals (MCM) against the growth of murine mammary adenocarcinoma cells in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 157, p. 113975, 2023.

GHONEUM, M.; EL-DIN, N. K. B.; MAHMOUD, A. Z.; TOLENTINO, L.; PAN, D.; HASSAN, T. A. Dietary baker's yeast sensitizes Ehrlich mammary adenocarcinoma to paclitaxel in mice bearing tumor. **Oncology Reports**, 2019.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-47, 2013.

GUO, C.; BURANYCH, A.; SARKAR, D.; FISHER, P. B.; WANG, X. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. **Vascular Cell**, 5(1), 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARDY, K.; BUCKLEY S.; COLLINS, M. J.; ESTALRRICH, A.; BROTHWELL, D.; COPELAND, L.; GARCIA-TABERNERO, A.; GARCIA-VARGAS, S.; DE LA RASILLA M.; LALUEZA-FOX, C.; HUGUET R, B. M.; SANTAMARIA, D.; MADELLA, M.; WILSON, J.; CORTES, A. F.; ROSAS, A. Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften* 99(8):617–626, 2012.

HAMASATO, E. K.; DE LIMA, A. P. N.; DE OLIVEIRA, A. P. L.; SANTOS F. A. L.; LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick partner increases allergic lung inflammatory response in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 42, p. 109-117, 2014.

HARSHA, R. M.; GHOSH, D.; BANERJEE R.; SALIMATH, B. P. Suppression of VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by *Eugenia jambolana*, *Musa paradisiaca*, and *Coccinia indica* extracts. *Pharmaceutical Biology*. 55(1); 2017.

HE, W.; ZHU, H.; CHEN, Z. Plant sterols: chemical and enzymatic structural modifications and effects on their cholesterol-lowering activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 12, p. 3047-3062, 2018.

HERBERT, L. A.; BRUGUIÈRE, A.; DERBRÉ, S.; RICHOMME, P.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. 13C NMR dereplication-assisted isolation of bioactive polyphenolic metabolites from *Chusia flava* Jacq. *Natural Product Research*, p. 1-10, 2022.

HOSSNE, R. S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho. Implantação do modelo no Brasil. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 17, n. 4, p. 208–210, 2002.

HUANG, G.; LIU, L.; PAN, H.; CAI, L. Biomimetic Active Materials Guided Immunogenic Cell Death for Enhanced Cancer Immunotherapy. *Small methods*, 2201412, 2022.

HUSSEN, B. M.; SALIHI, A.; ABDULLAH, S. T.; RASUL, M. F.; HIDAYAT, H. J.; HAJIESMAEILI, M.; GHAFOURI-FARD, S. Signaling pathways modulated by miRNAs in breast cancer angiogenesis and new therapeutics. *Pathology-Research and Practice*, p. 153764, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSE DE ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer/> > Acesso em: 20 de dezembro de 2022.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Lyon: IARC, 2022. Disponível em < <https://www.iarc.who.int/cancer-topics/> > Acesso em: 20 dezembro 2022.

JANOCHA, S.; SCHIMITZ, D.; BERNHARDT, R. Terpene hydroxylation with microbial cytochrome P450 monooxygenases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 148, 215-250, 2015.

JIANG, H.; LIN, X.; LIANG, W.; LI, Y.; YU, X. Friedelin Alleviates the Pathogenesis of Collagenase-Induced Tendinopathy in Mice by Promoting the Selective Autophagic Degradation of p65. **Nutrients**, v. 14, n. 8, p. 1673, 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.

JIANG, Y.; ZHANG, H.; WANG, J.; LIU, Y.; LUO, T.; HUA, H. Targeting extracellular matrix stiffness and mechanotransducers to improve cancer therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2022.

JONES, D.; NEAL, R. D.; DUFFY, S. R.; SCOTT, S. E.; WHITAKER, K. L.; BRAIN, K. Impact of the COVID-19 pandemic on the symptomatic diagnosis of cancer: the view from primary care. **The Lancet. Oncology**, 21(6), 748, 2020.

JOSHI, B. P.; BHANDARE, V. V.; VANKAWALA, M.; PATEL, P.; PATEL, R.; VYAS, B.; KRISHNAMURTY, R. Friedelin, a novel inhibitor of CYP17A1 in prostate cancer from *Cassia tora*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-26, 2022.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, 2006.

KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K. J.; DENNERY, P. A.; FORMAN, H. J.; GRISHAM, M. B.; MANN, G. E.; MOORE, K.; ROBERTS, L. J.; ISCHIROPOULOS, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free radical biology and medicine**, v. 52, n. 1, p. 1-6, 2012.

KANG, M.; LONG, T.; CHANG, C.; MENG, T.; MA, H.; LI, Z.; ... CHEN, Y. A Review of the Ethical Use of Animals in Functional Experimental Research in China Based on the "Four R" Principles of Reduction, Replacement, Refinement, and Responsibility. **Medical Science Monitor**, v. 28, 2022.

KATO-NOGUCHI, H.; KATO, M. Allelopathy and Allelochemicals of *Solidago canadensis* L. and *S. altissima* L. for Their Naturalization. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3235, 2022.

KUMAR, S. Caspase function in programmed cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 1, p. 32-43, 2007.

KUNNUMAKKARA, A. B.; BORDOLOI, D.; SAILO, B. L.; ROY, N. K.; THAKUR, K. K.; BANIK, K., ... AGGARWAL, B. B. Cancer drug development: The missing links. **Experimental Biology and Medicine**, v. 244, n. 8, p. 663-689, 2019.

KURNICK, N. B.; KLEIN, G.; KLEIN, E. Effect of stilbamidine on ascites tumor of mice. **Experientia**, v. 6, n. 4, p. 152-153, 1950.

KVASNICA, M.; URBAN, M.; DICKINSON, N. J.; SAREK, J. Pentacyclic triterpenoids with nitrogen- and sulfur-containing heterocycles: synthesis and medicinal significance. **Natural product reports**, v. 32, n. 9, p. 1303-1330, 2015.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, Chern Ein. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. **European journal of pharmacology**, v. 834, p. 188-196, 2018.

LI, Y.; WANG, J.; WANG, H.; ZHANG, S.; WEI, Y.; LIU, S. The Interplay Between Inflammation and Stromal Components in Pancreatic Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 850093-850093, 2022.

LINGARAJU, G. S.; BALAJI, K. S.; JAYARAMA, S.; ANIL, S. M.; KIRAN, K. R.; SADASHIVA, M. P. Synthesis of new coumarin tethered isoxazolines as potential anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 23-24, p. 3606-3612, 2018.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**. 330–338, 2013.

LUGANO, R.; RAMACHANDRAN, M.; DIMBERG, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 9, p. 1745-1770, 2020.

LUO, J. C.; S. YAMAGUCHI, A.; SHINKAI, K.; SHITARA, M.; SHIBUYA. Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors, **Cancer Res.** 58, 2652. 1998.

LUO, L.; ZHANG, J.; TANG, H.; ZHAI, D.; HUANG, D.; LING, L.; WANG, X.; LIU, T.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; HE, Z.; ZHENG, G. LncRNA SNORD3A specifically sensitizes breast cancer cells to 5-FU by sponging miR-185-5p to enhance UMPS expression. **Cell death & disease**, v. 11, n. 5, p. 1-12, 2020.

MA, Y.; ADJEMIAN, S.; MATTAROLLO, S. R.; YAMAZAKI, T.; AYMERIC, L.; YANG, H.; ... & KROEMER, G. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 729-741, 2013.

MATSUZAKI, C. I. A. Avaliação dos efeitos do extrato etanólico , resíduo butanólico e resíduo aquoso de *Pfaffia paniculata* sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em suas formas ascítica e sólida. **Patologia**, 2004.

MEHTA, T.; MEENA, M.; NAGDA, A. Bioactive compounds of *Curvularia* species as a source of various biological activities and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

MORSI, D. S.; EL-NABI, S. H.; ELMAGHRABY, M. A.; ABU ALI, O. A.; FAYAD, E.; KHALIFA, S. A.; EL-SEEDI, H. R.; EL-GARAWANI, I. M. Anti-proliferative and immunomodulatory potencies of cinnamon oil on Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2022.

MORZYCKI, Jacek W. Recent advances in cholesterol chemistry. **Steroids**, v. 83, p. 62-79, 2014.

MORANA, O.; WOOD, W.; GREGORY, C. D. The Apoptosis Paradox in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1328, 2022.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NICOL, B. M.; PRASAD, S. B. The effects of cyclophosphamide alone and in combination with ascorbic acid against murine ascites Dalton's lymphoma. **Indian journal of pharmacology**, v. 38, n. 4, p. 260, 2006.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991.

OLAS, B. Bee Products as Interesting Natural Agents for the Prevention and Treatment of Common Cardiovascular Diseases. **Nutrients**, v. 14, n. 11, p. 2267, 2022.

OLDFIELD, E.; LIN, F. Terpene biosynthesis: modularity rules. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 5, p. 1124-1137, 2012.

OVERALL, Christopher M.; KLEIFELD, Oded. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 3, p. 227-239, 2006.

PATERAKI, I.; HESKES, A. M.; HAMBERGER, B. Cytochromes P450 for terpenes Functionalisation and Metabolic Engineering. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 148, 107-139, 2015.

PANDA, S. S.; THANGARAJU, M.; LOKESHWAR, B. L. Ursolic Acid Analogs as Potential Therapeutics for Cancer. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8981, 2022.

PIKARSKY, E.; PORAT, R. M.; STEIN, I.; ABRAMOVITCH, R.; AMIT, S.; KASEM, S.; GUTKOVICH-PYEST, E.; URIELI-SHOVAL, S.; GALUN, E.; BEN-NERIAH, Y. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 461-466, 2004.

RANGARAJAN, A.; WEINBERG, R. A. Comparative biology of mouse versus human cells: Modelling human cancer in mice Nature Reviews Cancer. **European Association for Cardio-Thoracic Surgery**, 2003.

REFAIE, M. M.; SHEHATA, S.; BAYOUMI, A.; EL-TAHAWY, N. F. G.; ABDELZAHER, W. Y. The IL-6/STAT signaling pathway and PPAR α are involved in mediating the dose-dependent cardioprotective effects of fenofibrate in 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 36, n. 5, p. 817-827, 2022.

RIBEIRO, P. R.; FERRAZ, C. G.; GUEDES, M. L.; MARTINS, D.; CRUZ, F. G. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burllemarxii*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1237-1240, 2011.

RITTER, B.; GRETEN, F. R. Modulating inflammation for cancer therapy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 6, p. 1234-1243, 2019.

SAHU, P.; BHOWMICK, A. K.; KALI, G. Terpene based elastomers: Synthesis, properties, and applications. **Processes**, v. 8, n. 5, p. 553, 2020.

SANDHU, M.; IRFAN, H. M.; SHAH, S. A.; AHMED, M.; NAZ, I.; AKRAM, M.; FATIMA, H.; FAROOQ, A. S. Friedelin Attenuates Neuronal Dysfunction and Memory Impairment by Inhibition of the Activated JNK/NF- κ B Signalling Pathway in Scopolamine-Induced Mice Model of Neurodegeneration. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 4513, 2022.

SANTOS, J.; BRITO, M.; FERREIRA, R.; MOURA, A.; SOUSA, T.; BATISTA, T.; MANGUEIRA, V.; LEITE, F.; CRUZ R.; VIEIRA G.; LIRA B.; ATHAYDE-FILHO P.; SOUZA H.; COSTA, N.; VERAS, R.; BARBOSA-FILHO J.; MAGALHÃES H.; SOBRAL, M. Th1-biased immunomodulation and in vivo antitumoral effect of a novel piperine analogue. **International Journal of Molecular Sciences**. v.19, p. 2594, 2018.

SARASWATI, S.; AGRAWAL, S.S.; ALHAIDER, A. A. Ursolic acid inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in Ehrlich ascites carcinoma tumor. **Chemico-Biological Interactions**, 206(2), 153–165, 2013.

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. **Immunology letters**, v. 74, n. 2, p. 111-115, 2000.

SHACTER, E.; WEITZMAN, S. A. Chronic inflammation and cancer. **Oncology (Williston Park, NY)**, v. 16, n. 2, p. 217-26, 229; discussion 230, 2002.

SHI, B.; LIU, S.; HUANG, A.; ZHOU, M.; SUN, B.; CAO, H.; SHAN, J.; SUN, B.; LIN, J. Revealing the mechanism of friedelin in the treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology and experimental verification. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D. Cell proliferation markers for evaluating the growth of solid and ascitic forms of Ehrlich tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 658-661, 2006.

SILVA, D.K.F.; DUARTE, S.S.; LISBOA, T.M.H.; FERREIRA, R.C.; LOPES, A.L.O.; CARVALHO, D.C.M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; SILVA, P.M., SEGUNDO, M.A.S.P.; MOURA, R.O.; MEDEIROS, K.C.P.; SOBRAL, M.V. Antitumor Effect of a Novel Spiro-Acridine Compound is Associated with UpRegulation of Th1-Type Responses and Antiangiogenic Action. **Molecules**. 20;25. 2019.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Artmed Editora, 2016.

SKIRYCH, A.; KIERSZNIOWSKA, S.; MÉRET, M.; WILLMITZER, L.; TZOTZOS, G. Medicinal bioprospecting of the Amazon rainforest: a modern Eldorado?. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 781-790, 2016.

SOMWONG, K.; LERTPATIPANPONG, P.; NIMLAMMOOL, W.; PANYA, A.; TRAGOOLPUA, Y.; YONGSAWAS, R., ... & BAEK; S. J. Effect of *Holoptelea integrifolia*

(Roxb.) Planch. n-Hexane Extract and Its Bioactive Compounds on Wound Healing and Anti-Inflammatory Activity. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8540, 2022.

SRINIVAS, B. K.; SHIVAMADHU, M. C.; JAYARAMA, S. *Musa acuminata* lectin exerts anti-cancer effects on HeLa and EAC cells via activation of caspase and inhibitions of Akt, Erk, and Jnk pathway expression and suppresses the neoangiogenesis in in-vivo models. **International Journal of Biological Macromolecules**. 1173-1187. 2021.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.

SUBASH-BABU, P.; LI, D. K.; ALSHATWI, A. A. In vitro cytotoxic potential of friedelin in human MCF-7 breast cancer cell: Regulate early expression of Cdkn2a and pRb1, neutralize mdm2-p53 amalgamation and functional stabilization of p53. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 69(8), 630–636. 2017.

SUNIL, C.; DURAI PANDIVAN, V.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. leaves. **Food chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 860-865, 2013.

SUNIL, C.; STEPHEN IRUDAYARAJ, S.; DURAI PANDIYAN, V.; TALRASHOOD, S.; ALHARBI, S. A.; IGNACIMUTHU, A. Friedelin exhibits antidiabetic effect in diabetic rats via modulation of glucose metabolism in liver and muscle. **J Ethnopharmacol**. 25;268: 113659. 2021.

TAMOKOU, J. D. D.; TALA, M. F.; WABO, H. K.; KUIATE, J. R.; TANE, P. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 571-575, 2009.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309-324, 2018.

THOMAS, G.; HEMPEL, K. Correlation between histone phosphorylation and tumor ageing in Ehrlich ascites tumor cells. *Exp Cell Research*, 100(2):309-12, 1976.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. **Nature reviews cancer**, v. 12, n. 4, p. 237-251, 2012.

VINCENT, P. C.; NICHOLLS, A. Comparison of the Growth of the Ehrlich Ascites Tumor in Male and Female Mice. **Cancer Research**, v. 27, n. June, p. 1058–1065, 1967.

VISSER, K. DE; JONKERS, J. Towards Understanding the Role of Cancer-Associated Inflammation in Chemoresistance. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 16, p. 1844–1853, 30 maio 2009.

WANG, S.; FU, J. L.; HAO, H. F.; JIAO, Y. N.; LI, P. P.; HAN, S. Y. Metabolic reprogramming by traditional Chinese medicine and its role in effective cancer therapy. **Pharmacol. Res.** 170, 105728, 2021.

WANG, Y., XU, J., ZHANG, X., WANG, C., HUANG, Y., DAI, K., & ZHANG, X. TNF- α -

induced LRG1 promotes angiogenesis and mesenchymal stem cell migration in the subchondral bone during osteoarthritis. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 3, p. e2715-e2715, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Model List of Essential Medicines – 22nd List**, 2021. Geneva: World Health Organization; 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The Impact of the COVID-19 Pandemic on Noncommunicable Disease Resources and Services: Results of a Rapid Assessment**. Geneva, Switzerland, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics. **Breast cancer: prevention and control**. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> > Acesso em: agosto de 2022.

WU, J. B.; SHAO, C.; LI, X.; LI, Q.; HU, P.; SHI, C.; LI, Y.; CHEN, Y.; YIN, F.; LIAO, C.; STILES, B. L.; ZHAU, H. E.; SHIH, J. C.; CHUNG, L. W. K. Monoamine oxidase A mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis. **J. Clin. Invest.** 124, 2891–2908, 2014.

WU, X.; WU, M. Y.; JIANG, M.; ZHI, Q.; BIAN, X.; XU, M. D.; GON, F.R.; HOU, J.; TAO, M.; SHOU, L. M.; DUAN, W.; CHEN, K.; SHEN, M.; LI, W. TNF- α sensitizes chemotherapy and radiotherapy against breast cancer cells. **Cancer cell international**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2017.

WYLD, L.; AUDISIO, R. A.; POSTON, G. J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 12, n. 2, p. 115-124, 2015.

YANG, R.; DONG, H.; JIA, S.; YANG, Z. Resveratrol as a modulatory of apoptosis and autophagy in cancer therapy. **Clinical and Translational Oncology**, p. 1-12, 2022.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEUA



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Alagoas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

*4ª Via

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação do efeito antitumoral de triterpenos pentacíclicos em modelo de tumor de Ehrlich em camundongos”, registrada com o nº 15/2019, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Jamylle Nunes de Souza Ferro**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 18 de outubro de 2021.

Vigência da autorização	09.09.2019 a 31.12.2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	350
Peso/idade	25-35 g / 8-12 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS
Colaboradores	Tayhana Souza, Julianderson Carmo, Maria Eduarda Santos, Liliane Tenório, Everlaine Silva, Jennifer Souza, Rafael Calado, Felipe Porto, James Almeida; Débora dos Santos; Marvin Lins, Maria Cleidiane dos Santos, Fernanda Silva, Ellen Lourenço e Cecília Figueiredo

Maceió, 18 de outubro de 2021.

Documento assinado digitalmente
 Elvan Nascimento dos Santos Filho
 Data: 18/10/2021 12:22:53-0300
 Verifique em <https://verificador.iti.br>

Elvan Nascimento dos Santos Filho
 Coordenador da CEUA
 SIAPE 1756479

Revogada 3ª via do parecer emitido em 24/08/2021 e aprovada na reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais em 20/08/2021.