

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAYHANA PRISCILA MEDEIROS SOUZA

**EFEITOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DO ISOFLAVONOIDE TRIFOLIRIZINA SOBRE O  
TUMOR DE EHRLICH NA SUA FORMA ASCÍTICA**

MACEIÓ  
2022

TAYHANA PRISCILA MEDEIROS SOUZA

**EFEITOS IN VIVO E IN VITRO DO ISOFLAVONOIDE TRIFOLIRIZINA SOBRE O  
TUMOR DE EHRLICH NA SUA FORMA ASCÍTICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito final para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Emiliano de Oliveira Barreto

Co-orientador: Prof. Renato Santos Rodarte

MACEIÓ  
2022

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

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

S729c Souza, Tayhana Priscila Medeiros.  
Efeitos *in vivo* e *in vitro* do isoflavonoide trifolirizina sobre o tumor de Ehrlich na sua forma ascítica / Tayhana Priscila Medeiros Souza. – 2022.  
75 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.  
Co-orientador: Renato Santos Rodarte.  
Tese (doutorado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 68-75.

1. Neoplasias. 2. Trifolirizina. 3. Carcinoma de Ehrlich. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Leucócitos. I. Título.

CDU: 599.323:616-006

Dedico este trabalho à minha família  
por todo amor, carinho, dedicação e pelo apoio  
incondicional em todos os momentos da minha  
vida e ao meu avô **José Pereira dos Santos**  
(*in memoriam*) que foi meu segundo pai, sempre  
me acolheu e foi um exemplo para mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo. Por todas as bênçãos concedidas, por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida, por ter tido a oportunidade de estudar, ter me consolado nos momentos difíceis, ter iluminado meu caminho e guiado meus passos;

À minha mãe por todo o amor, incentivo, esforço, educação e por ser meu exemplo de força e determinação. Sem ela, eu nada seria. Quero agradecer-los por todo o esforço, pela educação e por serem para mim uma base sólida;

Ao meu esposo Jorge Lucas pelo amor, pelo companheirismo, pelos conselhos, por ter acreditado muito em mim e, principalmente, pela paciência e compreensão. Ele mais do que ninguém sabe quantos obstáculos tive que vencer para estar aqui hoje. Inúmeras vezes ele foi colo, ombro amigo, meu chão, minha força e minha esperança de que dias melhores sempre virão. Eu não consigo mensurar e nem descrever o quanto sou grata a Deus pela sua vida e pelo presente lindo que Ele nos deu, nosso pequeno Arthur;

Aos meus amigos que sempre se fizeram presentes na minha vida e tornaram essa jornada mais fácil, em especial agradeço a Helô, Laís, Bruna, Wanessa, Delma e Myka. Vocês são exemplos de mulher, força, coragem e determinação para mim;

Agradeço aos meus orientadores Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Emiliano Barreto e Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Renato Rodarte pela oportunidade, pelos ensinamentos, paciência e pela confiança;

Agradeço às professoras Janylle e Danielma pelo carinho e amizade. Eu tive muita sorte em poder ter contado com vocês durante quase toda minha trajetória acadêmica. Obrigada por todo ensinamento, conselho, confiança e por todas as palavras que eram abraços quando eu mais precisei;

Aos meus companheiros de laboratório que se tornaram amigos: Marcus, Camila, Everlaine, Monaly e Simone por terem tornado o dia a dia de trabalho mais leve e proveitoso, por toda ajuda dada, principalmente nos momentos finais e por terem dividido comigo momentos e experimentos com mais de 17 horas de duração;

Ao Laboratório de Biologia Celular e ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular, onde por tantos anos foram quase a minha segunda casa;

À família LBC por ter me acolhido tão bem e ter me proporcionado experiências que levarei por toda vida;

À técnica Juliane Pereira, por todo suporte e carinho que ultrapassaram os muros da universidade;

Ao corpo docente do curso de Farmácia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que contribuíram para a minha formação;

Ao CNPq, a Fapeal e a UFAL, pelo apoio financeiro e suporte científico importantes no desenvolvimento dos trabalhos do LBCM, assim como para produção dessa tese.

**“É justo que muito custe o que muito vale.”**

Santa Teresa D'Ávila

## RESUMO

Este trabalho avaliou o efeito do isoflavonoide natural trifolirizina sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos. O modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich (taE) foi estabelecido pela injeção intraperitoneal de  $5 \times 10^6$  células tumorais no peritônio de camundongo Swiss. Em seguida, o efeito do tratamento com trifolirizina (TRIFO) *in vivo*, e também *in vitro* sobre células tumorais e macrófagos foi avaliado. Após 10 dias da inoculação do tumor as análises foram realizadas, e identificadas como o momento em que os animais com taE exibiram um acúmulo de líquido ascítico, culminando ainda com o aumento no número de células tumorais e aumento do número de leucócitos no sangue e na medula óssea. O perfil do ciclo celular avaliado por citometria de fluxo em células do fluido ascítico revelou um aumento de células na fase S do ciclo celular. Além disso, foi observado que estas células produzem elevados níveis de ROS. Em outro grupo de experimentos, do 5º ao 9º dia após a inoculação das células tumorais, os animais receberam uma injeção diária de TRIFO (22,4 µM/kg/dia), e após 24h do último tratamento observou-se que a TRIFO não alterou o peso dos animais, o volume da ascite, nem a área abdominal. No total de células peritoneais de animais com taE houve um aumento na contagem de células mononucleares, neutrófilos e também de células tumorais no fluido peritoneal, sem afetar a contagem de células no sangue ou medula óssea de animais com taE. Além disso, a TRIFO não modificou as fases do ciclo celular de células tumorais. Os níveis intracelulares de ROS em células da ascite foram reduzidos após tratamento com TRIFO. *In vitro*, as células tumorais expostas à TRIFO não alteraram os níveis basais de NO ou IL-8. Macrófagos tratados com TRIFO aumentaram a produção de NO, mas sem afetar a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e Arg-1. Portanto, conclui-se que o modelo experimental de taE em camundongos é exequível e reflete parâmetros macro e microscópicos associados à doença em humanos. Constatamos, pela primeira vez, que a TRIFO possui efeitos que favorecem a resposta inflamatória por induzir leucocitose no líquido ascítico ao mesmo tempo em que reduz a produção de ROS nestas células e aumenta a geração de NO em macrófagos. Tomados em conjunto, estes resultados indicam um potencial do isoflavonoide trifolirizina em atuar como modulador da função de células inflamatórias no ambiente tumoral.

Palavras-chave: câncer; trifolirizina; tumor de Ehrlich; espécies reativas de oxigênio; leucócitos.

## ABSTRACT

This work evaluated the effect of the natural isoflavonoid trifolirhizin on the development of Ehrlich ascitic tumor in mice. The experimental model of Ehrlich ascites tumor (taE) was established by intraperitoneal injection of  $5 \times 10^6$  tumor cells into the peritoneum of Swiss mice. Then, the effect of treatment with trifolirhizin (TRIFO) in vivo, and also in vitro on tumor cells and macrophages was evaluated. After 10 days of tumor inoculation, the analyzes were performed, and identified as the moment when the animals with taE exhibited an accumulation of ascitic fluid, culminating in an increase in the number of tumor cells and an increase in the number of leukocytes in the blood and in the bone marrow. The cell cycle profile evaluated by flow cytometry in ascitic fluid cells revealed an increase in cells in the S phase of the cell cycle. Furthermore, these cells were observed to produce high levels of ROS. In another group of experiments, from the 5th to the 9th day after the inoculation of the tumor cells, the animals received a daily injection of TRIFO (22.4  $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{day}$ ), and after 24h of the last treatment it was observed that the TRIFO did not change the weight of the animals, the volume of ascites, or the abdominal area. In the total of peritoneal cells of animals with taE there was an increase in the count of mononuclear cells, neutrophils and also of tumor cells in the peritoneal fluid, without affecting the count of cells in the blood or bone marrow of animals with taE. Furthermore, TRIFO did not modify the cell cycle phases of tumor cells. Intracellular levels of ROS in ascites cells were reduced after treatment with TRIFO. In vitro, tumor cells exposed to TRIFO did not change baseline levels of NO or IL-8. Macrophages treated with TRIFO increased NO production, but without affecting the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and Arg-1. Therefore, it is concluded that the experimental model of taE in mice is feasible and reflects macro and microscopic parameters associated with the disease in humans. We found, for the first time, that TRIFO has effects that favor the inflammatory response by inducing leukocytosis in the ascitic fluid at the same time that it reduces the production of ROS in these cells and increases the generation of NO in macrophages. Taken together, these results indicate a potential for the isoflavonoid trifolirhizin to act as a modulator of inflammatory cell function in the tumor environment.

Keywords: cancer; trifolirhizin; Ehrlich's tumor; Reactive Oxygen Species; Leukocytes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química da trifolirizina.	22
<b>Figura 2</b> - Quantidade de células totais no líquido ascítico tumoral após 10 dias de inoculação das células do tumor de Ehrlich.	33
<b>Figura 3</b> – Aspectos macroscópicos da região abdominal de portadores do tumor ascítico de Ehrlich após inoculação de células tumorais.	34
<b>Figura 4</b> – Avaliação do volume do líquido ascítico e do peso dos animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.	35
<b>Figura 5</b> – Perfil morfológico das células obtidas do fluido ascítico de Ehrlich.	36
<b>Figura 6</b> – Contagem de células totais e perfil das populações celulares na cavidade peritoneal de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.	36
<b>Figura 7</b> – Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.	39
<b>Figura 8</b> - Quantidade total e diferencial de leucócitos na medula óssea de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.	40
<b>Figura 9</b> – Fases do ciclo celular em células obtidas do tumor ascítico de Ehrlich.	42
<b>Figura 10</b> – Espécies reativas de oxigênio intracelular de células do tumor ascítico de Ehrlich.	43
<b>Figura 11</b> – Efeito do tratamento com trifolirizina e 5-FU sobre o peso e volume ascítico dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.	45
<b>Figura 12</b> – Avaliação da celularidade presente no líquido ascítico dos animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (taE) tratados com trifolirizina.	47
<b>Figura 13</b> – Células presentes no fluido ascítico tumoral.	48
<b>Figura 14</b> – Contagem total e diferencial de leucócitos obtidos do sangue periférico dos animais portadores do taE tratados com trifolirizina.	49
<b>Figura 15</b> - Contagem total e diferencial de leucócitos obtidos da medula óssea dos animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (taE) tratados com trifolirizina.	50
<b>Figura 16</b> – Ciclo celular das células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com trifolirizina.	51
<b>Figura 17</b> – Espécies reativas de oxigênio intracelular de células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com trifolirizina.	52
<b>Figura 18</b> – Efeito da trifolirizina sobre a produção de NO em células do taE.	53
<b>Figura 19</b> – Efeito da trifolirizina sobre a expressão gênica de mRNA para IL-8.	54
<b>Figura 20</b> – Efeito da trifolirizina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos in vitro.	55
<b>Figura 21</b> – Efeito da trifolirizina sobre a polarização fenotípica de macrófagos para o perfil M1 e M2.	56
<b>Figura 22</b> – Efeito da trifolirizina sobre a expressão gênica de marcadores funcionais de macrófagos M1 e M2.	57

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Lista de genes-alvo utilizados.

30

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
2.1 Câncer	15
2.2. Tratamento do câncer	17
2.3. Modelos experimentais no estudo do câncer	18
2.3.1 Tumor de Ehrlich	19
2.4 Produtos naturais e câncer	20
2.5 Trifolirizina	21
<b>3 OBJETIVOS</b>	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos	24
<b>4 METODOLOGIA</b>	25
4.1 Animais	25
4.2 Reagentes e preparação da trifolirizina	25
4.3 Obtenção e manutenção do tumor de Ehrlich	25
4.4 Linhagem celular	26
4.5 Desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich	26
4.5.1 Indução e padronização do modelo	26
4.6 Tratamento com trifolirizina <i>in vivo</i>	27
4.7 Perfil das células do fluido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich	27
4.8 Análise do ciclo celular	28
4.9 Análise de espécies reativas de oxigênio	28
4.10 Quantificação de óxido nítrico	29
4.11 Análise da morfologia de macrófagos tratados com trifolirizina	29
4.12 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	30
4.13 Análises estatísticas	30
<b>5 RESULTADOS</b>	32
5.1 Caracterização do modelo experimental do tumor ascítico de Ehrlich	32
5.1.1 Perfil de células do líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich	36
5.1.2 Perfil de células no sangue periférico e na medula óssea de animais portadores do tumor de Ehrlich	38
5.1.3 Análise do ciclo celular de células obtidas do fluido ascítico de Ehrlich	41

5.1.4	Quantificação das espécies reativas de oxigênio em células obtidas do líquido ascítico tumoral	42
5.2	Efeito da trifolirizina sobre o tumor ascítico de Ehrlich <i>in vivo</i>	43
5.2.1	Efeito do tratamento com trifolirizina sobre as células do sangue periférico e medula óssea de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich	48
5.2.2	Análise do ciclo celular de células do tumor de Ehrlich obtidas de animais tratados com trifolirizina	51
5.2.3	Quantificação das espécies reativas de oxigênio (ROS) em células obtidas do líquido ascítico tumoral de animais com taE	52
5.3	Efeito <i>in vitro</i> da trifolirizina sobre as células do taE	53
5.3.1	Efeito da trifolirizina sobre a produção de óxido nítrico	53
5.3.2	Efeito da trifolirizina sobre a expressão de mRNA para IL-8 em células do taE	54
5.4	Efeito da trifolirizina sobre o perfil funcional de macrófagos <i>in vitro</i>	54
5.4.1	Efeito da trifolirizina sobre a produção <i>in vitro</i> de NO por macrófagos	54
5.4.2	Efeito da trifolirizina sobre a alteração morfológica induzida pela polarização funcional de macrófagos	55
5.4.3	Efeito da trifolirizina sobre a expressão de marcadores funcionais de macrófagos	57
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama permanece como a neoplasia mais comum entre as mulheres em todo o mundo. Com prevalência estimada em torno de 24% e com acesso ao tratamento ainda se mostra como um desafio, visto que a cada 4 casos diagnosticados apenas 1 avança para um tratamento satisfatório, o que mantém esta patologia como um sério problema de saúde pública mundial nos dias atuais. Segundo estimativas do Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN), dos 185 países cadastrados em 2018 na Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer, em 154 países (cerca de 83%) o câncer de mama se mostra como o tipo mais comum de lesão nas mulheres, sendo ainda a principal causa de morte (aproximadamente 15%) nesta população (GLOBOCAN, 2018).

No Brasil, a prevalência do câncer de mama é de 29%, apresentando elevadas taxas de mortalidade e prevalência, quando comparado com outros tipos de cânceres, e com maior tendência de aumento em países não desenvolvidos e em desenvolvimento (INCA, 2018). Diversos fatores estão envolvidos na susceptibilidade ao carcinoma mamário, tais como uso prolongado de alguns anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal, exposição à radiação ionizante, consumo de bebidas alcoólicas, dietas hipercalóricas, sedentarismo, e predisposição genética, como mutações nos genes BRCA1 e/ou BRCA2 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

A perspectiva de tratamento, com maior grau de eficiência, continua sendo a quimioterapia. O principal entrave é que a maioria dos fármacos utilizados atingem também as células não tumorais gerando toxicidade e comprometendo o quadro clínico do paciente (ZANDI, 2010). Neste aspecto, a busca utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo* por compostos potencialmente úteis para o tratamento do câncer que sejam tóxicos para células tumorais e com baixos efeitos colaterais impulsiona as pesquisas a partir de fontes naturais, como plantas, fungos e organismos marinhos (MARY, 2012).

Muitos conceitos aplicados à carcinogênese em humanos são resultados de estudos com camundongos, o que reforça a importância do uso de modelos animais de experimentação como uma etapa crucial para o entendimento sobre a carcinogênese, fisiopatologia e terapêutica do câncer (MATSUZAKI, 2004). Dentre os modelos animais que mimetizam o tumor mama, o tumor de Ehrlich, descrito inicialmente por Paul Ehrlich (1896) como sendo um adenocarcinoma mamário espontâneo em camundongo fêmea (EHRlich, 1906), além de reproduzir os aspectos da doença em humanos, é um modelo muito utilizado devido ao seu

baixo custo e pela facilidade de padronização e de manipulação em diferentes linhagens de camundongos (SIGIURA, 1965). Esse tumor pode crescer na sua forma ascítica, quando as células são implantadas na cavidade intraperitoneal (LOEWENTHAL & JAHN, 1932), e também sua forma sólida quando as células são inoculadas no tecido subcutâneo ou por via intramuscular (GUERRA, 1983). Dessa forma, o tumor de Ehrlich permanece como um modelo animal de experimentação relevante para estudos de fase pré-clínica.

Considerando a importância do modelo de experimentação animal para estudo do câncer aliado aos interesses do nosso grupo de pesquisa em atuação na Universidade Federal de Alagoas, que busca identificar e caracterizar os efeitos farmacológicos de compostos ativos de origem natural ou sintética com ação antitumoral, buscamos neste estudo realizar inicialmente a padronização de um modelo animal para o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich. Neste modelo experimental foram avaliados os potenciais efeitos do isoflavonoide natural trifolirizina tanto sobre o desenvolvimento do tumor ascítico *in vivo*, quanto das células tumorais obtidas do líquido ascítico de camundongos portadores do tumor de Ehrlich. A escolha deste isoflavonoide teve por base suas relevantes atividades farmacológicas incluindo ações anti-inflamatórias, antiproliferativas e antitumorais contra algumas linhagens tumorais em estudos prévios *in vitro* (JUCK et al., 2006). Porém, até o momento, mesmo com a descrição destes efeitos biológicos, não foram encontrados registros de estudos utilizando a trifolirizina para verificar seus potenciais efeitos antitumorais *in vivo*.

Sabe-se que os efeitos de substâncias em estudos *in vitro* pode ser diferente do comportamento dessa substância em um organismo vivo. Apesar dos modelos *in vitro* serem de extrema importância nas pesquisas e que nos aproxima da realidade metabólica das células, é necessário investigar, sempre que possível, as atividades biológicas em modelos vivos para tentar recriar o ambiente fisiológico, e também para entender o processo patológico associado ao caso. Nesse contexto, o presente estudo objetivou, inicialmente, padronizar na Universidade Federal de Alagoas (UFAL) um modelo experimental de tumor de Ehrlich na sua forma ascítica em camundongos Swiss - uma vez que não há protocolos de modelos tumorais *in vivo* padronizados na Instituição, permitindo a avaliação de candidatos a agentes antitumorais - e avaliar os efeitos da trifolirizina sobre as células tumorais. Assim, o trabalho é de suma importância à UFAL.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, câncer é o conjunto de doenças onde há o crescimento celular desordenado que, quando agrupadas, dão origem aos tumores que podem ser classificados como benignos ou malignos (OMS, 2020). Em termos clínicos, quando estas células possuem a capacidade de invadir tecidos e órgãos subjacentes ou migrar para outras regiões do corpo, são considerados malignos, enquanto os tumores benignos possuem um crescimento lento e limitado (KASSI et al., 2019).

Com base na Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), a incidência de novos casos de câncer deve aumentar cerca de 63% nos próximos 20 anos, principalmente em países emergentes. Em 2010, a OMS estimou que, no mundo, o custo anual total da doença foi de aproximadamente US\$ 1,16 trilhão (WHO, 2018). No mundo, o câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente entre mulheres, tanto que em 2018 ocorreram 2,1 milhões de novos casos, o que corresponde a 11,6% de todos os cânceres estimados no ano (BRAY et al., 2018). Os fatores de risco que estão associados ao desenvolvimento desse tipo de tumor incluem idade acima de 50 anos, fatores genéticos (mutações nos genes BRCA1 e BRCA2) e hereditários, menopausa tardia, obesidade, sedentarismo e exposição à radiação (BRAY et al., 2018; INCA, 2020). No Brasil, a estimativa é que ocorra um aumento de 78% de novos casos e um aumento de 95% do número de mortes em 2040, o que repercutirá de forma negativa sobre a saúde e economia do país (GLOBOCAN, 2018).

O processo de formação de uma célula normal em célula tumoral geralmente é resultado de fatores genéticos e ambientais, ou da combinação destes. Este processo definido como carcinogênese ocorre a partir de mutações genéticas em células normais que levam a ativação de alvos gênicos denominados proto-oncogenes (genes que garantem funcionamento celular dentro dos limites da fisiologia) em oncogenes (genes que ao se tornarem ativos transformam células normais em neoplasias) (INCA, 2020). O processo de carcinogênese pode ser organizado em três fases distintas que são interligadas entre si, sendo chamadas de iniciação, promoção e progressão (INCA, 2020). A fase de iniciação é desencadeada por agentes que causam danos ao DNA. Uma vez estes danos ao DNA sendo irreversíveis, a célula mutante gera células filhas com mutações iniciais que levam a promoção tumoral, fenômeno típico da segunda fase da carcinogênese. Nesta etapa de promoção, havendo ação de agentes que levem a proliferação das células fora dos limites fisiológicos, as células avançam para a terceira fase

da carcinogênese com aspectos de expansão clonal das células iniciadas e malignidade (INCA, 2020).

Dentre as características das células tumorais, a principal é seu crescimento/proliferação desordenada que está associada às alterações em diversas vias de sinalização intracelular, tais como fatores de crescimento, mecanismo de morte celular (apoptose) e formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Todas estas alterações são capazes de interferir de forma direta e/ou indireta com a divisão das células, o que resulta em alterações no ciclo celular (RANG et al., 2012). Cabe destacar ainda que a diversidade genética e o processo inflamatório associados aos tumores são fatores capazes de favorecer o desenvolvimento das células neoplásicas por estimular a proliferação celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, as mutações podem originar células resistentes aos mecanismos intrínsecos de morte celular (OKADA; MAK, 2004; WARD, 2002). Como consequência das mutações, as células tumorais passam a apresentar características morfológicas peculiares que as distingue das células normais, que inclui núcleos volumosos e múltiplos, aumento da relação citoplasma-núcleo, perda da inibição por contato, modificação dos antígenos de superfície, dentre outros (ZÖRNIG et al., 2001).

Dentre os fatores responsáveis por contribuir para o surgimento das neoplasias estão os radicais livres. Os efeitos deletérios associados aos radicais livres só se tornaram conhecidos quando Denham Harman descreveu sua teoria sobre o envolvimento desses radicais em processos de envelhecimento, mutagênese e câncer em 1992 (HARMAN, 1992). Os radicais livres (principalmente as espécies reativas de oxigênio) são produtos do metabolismo mitocondrial das células eucarióticas, necessário para a produção de ATP (SOSA et al., 2013). Quando há um desequilíbrio envolvendo a produção e eliminação de radicais livres ocasionando um excesso de espécies reativas gera-se o estresse oxidativo (DURACKOVÁ, 2010). Sabe-se que o estresse oxidativo associado ao processo inflamatório pode resultar no desenvolvimento de um câncer, visto que danos significativos na estrutura e nas funções celulares podem ocorrer e induzir mutações e transformação neoplásica (FANG, SEKI e MAEDA, 2009).

Estudos já publicados sugerem que células tumorais apresentam um aumento intrínseco da produção basal de ROS devido ao seu metabolismo mitocondrial elevado para manter sua alta taxa de proliferação. Mas a produção de radicais livres não ocorre apenas nas mitocôndrias. Células inflamatórias como os neutrófilos e macrófagos produzem ROS com a finalidade de eliminar bactérias (SZATROWSKI e NATHAN, 1991). A relação entre câncer e inflamação foi sugerida por dados experimentais e epidemiológicos e teve sua confirmação por meio da eficácia de terapias anti-inflamatórias, que mostraram bons resultados tanto na prevenção

quanto no tratamento do câncer (GONDA, TU e WANG, 2009; GRIVENNIKOV, GRETEN e KARIN, 2010; GRIVENNIKOV e KARIN, 2010).

## 2.2. Tratamento do câncer

Geralmente, uma terapia combinada é a melhor opção para a maior parte dos casos. Dentre os diferentes alvos terapêuticos, destacam-se os de controle do ciclo celular e da angiogênese e inibidores de ciclo-oxigenases e lipooxigenases (SINGH et al., 2018). Bleomicina, cisplatina e vincristina foram fármacos usados na quimioterapia no final da década de 1970, mas caíram em desuso por induzirem graves efeitos colaterais (MUKHERJEE, 2020). Dados publicados pela OMS sobre a incidência e mortalidade por câncer em 2012 indicaram que as terapias disponíveis à época não eram capazes de controlar completamente o câncer. A Sociedade Americana de Câncer em 2018 relatou que houve uma diminuição de 1,7% da mortalidade por câncer (SCHIRRMACHER, 2019), o que pode ser devido ao diagnóstico precoce e a melhoria da qualidade de vida da população com uma redução dos fatores de risco como tabagismo.

O desenvolvimento da terapêutica do câncer tem sido um desafio, dada as características distintas dos tumores e dos indivíduos. Outro fator importante é a quimiorresistência associada aos casos de insucesso terapêutico (VISSER E JONKERS, 2009). Diversos mecanismos são propostos para explicar possíveis vias envolvidas na resistência apresentada pelas células tumorais, como por exemplo a resistência à apoptose (que pode ser resultante do estresse oxidativo) e a superexpressão de proteínas transportadoras (como a glicoproteína P) de medicamentos (BORST, JONKERS e ROTTENBERG, 2007).

Alternativas que visam minimizar esses efeitos adversos da quimioterapia tem sido amplamente estudada e incluem estratégias para aumentar a sensibilidade e seletividade dos medicamentos, além da busca por novas moléculas bioativas. Tendo em vista que muitos medicamentos utilizados para o tratamento do câncer, como doxorrubicina e paclitaxel, são derivados de moléculas isoladas de plantas e microorganismos, os produtos naturais apresentam um alto potencial para diferentes alvos biológicos.

### 2.3. Modelos experimentais no estudo do câncer

Os tratamentos disponíveis para os pacientes oncológicos contam com intervenções capazes de causar sérios efeitos colaterais que desencadeiam eventos de resistência ao agente usado no tratamento, ou ainda, são ineficazes em estender a vida do paciente. Seja qual for o caso, as projeções crescentes de incidência e prevalência do câncer na população também estimulam a busca por novos fármacos e condutas terapêuticas inovadoras para o tratamento desta patologia.

Modelos experimentais utilizando testes *in vitro* e *in vivo* são amplamente empregados para identificar candidatos a agentes antitumorais (BRUYÈRE e NOËL, 2010). Dentre os testes *in vitro*, a avaliação do potencial citotóxico utilizando técnicas colorimétricas, como o MTT, vem sendo difundido como uma das primeiras metodologias na seleção de agentes antitumorais. Isso se deve por ser uma técnica de fácil execução, barata, reproduzível, e que permite avaliar um grande número de substâncias simultaneamente (ROOMI et al., 2014). Entretanto, os modelos *in vitro* são limitados em refletir as condições no organismo impostas pela patologia. Por conta de toda complexidade do sistema vivo, algumas substâncias que exibem efeitos citotóxicos *in vitro*, não necessariamente mostram-se como bons agentes antitumorais (BAHCECIOGLU et al., 2020). Logo, modelos animais empregados no estudo do câncer tem desempenhado papel importante nas descobertas de fármacos antineoplásicos por permitir uma ampla análise como estudos sobre a farmacodinâmica e farmacocinética do candidato a agente antitumoral.

A utilização de camundongos nas pesquisas em câncer é favorecida pelo fato das linhagens serem padronizadas, possuírem características conhecidas e monitoradas após várias gerações, além de compartilharem certas similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos (BALMAIN, 2001). Existem critérios capazes de sustentar o uso de um modelo tumoral murino na busca de agentes antitumorais, sendo eles: permitir a identificação da origem e progressão clonal do tumor, ter conhecimento da progressão tumoral, das características fisiopatológicas e histológicas do tumor de modo semelhantes à doença em humanos, possibilidade de estudar aspectos de invasão tecidual e o papel da resposta imunoinflamatória contra as células tumorais (JONG e MAINA, 2010).

Há vários modelos animais utilizados no estudo do câncer, todos buscam mimetizar os aspectos fisiopatológicos da doença em humanos, o que contribui para suas aplicações nos testes de eficácia de novas terapias anticâncer. Dentre os modelos animais amplamente

empregados nas análises pré-clínicas na busca de agentes anticâncer destacam-se os modelos transplantáveis como o tumor ascítico de Ehrlich e o Sarcoma 180.

### 2.3.1 Tumor de Ehrlich

Considerando as sérias implicações envolvidas no desenvolvimento do câncer, a necessidade de estudar novas moléculas com efeitos antitumorais para serem mais efetivas no tratamento e minimizar os efeitos deletérios associados ao câncer, a utilização de modelos experimentais é crucial. Nesse contexto, diversos tumores transplantáveis foram desenvolvidos na tentativa de se obter um modelo experimental que possibilitasse o estudo da tumorigênese, permitindo uma melhor compreensão da biologia tumoral, imunologia e sua fisiopatologia. Esses modelos fornecem informações sobre as características relacionadas ao crescimento neoplásico, mecanismos de disseminação e interação entre o tumor e seu hospedeiro (RIZZO, 2000). Muito do que se tem conhecimento atualmente é devido aos estudos realizados em camundongos (RANGARAJAN E WEINBERG, 2003). Embora haja diferenças entre a fisiologia dos camundongos e humanos, o modelo animal é uma ferramenta para o entendimento de diversas patologias e para o teste de novos fármacos.

Dentre os modelos tumorais, destaca-se o tumor de Ehrlich (tE) descrito inicialmente em 1896 como adenocarcinoma mamário espontâneo em camundongos por Paul Ehrlich de origem epitelial maligna (MATSUZAKI, 2004). Esse tumor pode se desenvolver na sua forma ascítica (taE) quando as células tumorais são inoculadas no camundongo pela via intraperitoneal, ou na forma sólida (tsE) por meio da inoculação pela via subcutânea ou intramuscular (DAGLI, GUERRA E SALDIVA, 1992). Pode-se afirmar que o tE é o modelo experimental mais utilizado, e uma das suas vantagens é o conhecimento prévio da quantidade de células e suas características iniciais, desenvolvimento rápido da neoplasia possibilitando um tempo restrito de estudo, fácil execução e baixo custo (SILVA, SANTOS E CASSALI, 2006). Em relação ao seu crescimento, é menos agressivo e controlado pela concentração de células inoculadas. Desenvolve-se em cavidades serosas, como a pleural e abdominal, e em músculos, mas o crescimento em vísceras (como fígado) não foi observado (HOSSNE, 2002).

Outra vantagem para a utilização do tumor de Ehrlich é o fato de que ele se desenvolve em qualquer linhagem de camundongo, o que pode ser associado ao fato da perda da expressão de moléculas de MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal), excluindo a principal função do linfócito T citotóxico durante o desenvolvimento tumoral. Na sua forma sólida, o tumor de Ehrlich apresenta, em sete dias, uma massa palpável e firme. Histologicamente, é

caracterizado por um estroma delicado e parênquima indiferenciado, células tumorais arredondadas e com as mesmas características morfológicas das células tumorais presentes no fluido ascítico (MATSUZAKI, 2004). Camundongos portadores do tsE mostraram uma maior tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (VIOLATO et al., 2014). O tumor de Ehrlich na sua forma ascítica atinge sua maior taxa de proliferação em sete dias após o implante no peritônio e se caracteriza macroscopicamente pela formação de um fluido ascítico viscoso e de aspecto leitoso, por isso recebe o nome de ascite (DAGLI, GUERRA E SALDIVA, 1992). Após a inoculação intraperitoneal de células do tumor de Ehrlich em camundongos, o volume do fluido ascítico e o número de células tumorais aumentam com o tempo, o que leva ao agravamento da lesão e a morte dos animais. Esse aumento de volume do líquido ascítico gera uma pressão mecânica intraperitoneal que parece contribuir com a hemorragia local, que associada a liberação de substâncias tóxicas pelas células tumorais degeneradas contribui para a menor sobrevivência dos animais em comparação a aqueles com desenvolvimento do tumor na forma sólida (HARTVEIT, 1962).

Morfologicamente, as células do tumor de Ehrlich caracterizam-se por serem arredondadas, com citoplasma escasso, núcleo denso redondo ou ovóide, apresentando diâmetro cerca de 2 a 3 vezes maior que o das hemácias. A proliferação celular acelerada e agressividade, características desejáveis pela perspectiva experimental, decorre da não expressão de MHC classe II o que reflete na baixa imunogenicidade observada nesse tipo de tumor (CHEN e WATKINS, 1970).

## 2.4 Produtos naturais e câncer

Estudos recentes reafirmam a relevância dos produtos naturais como fontes de metabólitos secundários candidatos a fármacos antitumorais. Estima-se que nas últimas décadas mais de 70% dos produtos anticâncer aprovados pelas agências reguladoras em todo mundo são derivados de fontes naturais, ou inspirados em moléculas obtidas da natureza, num mercado que movimentava cerca de 60 bilhões de dólares por ano. Como exemplo deste cenário pode ser mencionado os agentes vimblastina, vincristina, paclitaxel, dentre outros.

Neste contexto, a pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas medicinais ganha importante respaldo o que incentiva cada vez mais a pesquisa por medicamentos que possam contribuir no tratamento das enfermidades que acometem a população, em especial o câncer.

Dentre os metabólitos secundários vegetais, as isoflavonas são os principais flavonóides presentes em leguminosas e com atividades estrogênicas e antiestrogênicas já conhecidas

(SAHIN et al., 2019). Sabe-se que, dentre os fatores de risco de desenvolvimento do câncer, estão o histórico reprodutivo e endócrino associado, principalmente, ao aumento de estrogênio (WHO, 2018; IARC, 2021). Logo, diversos estudos publicados apontam que isoflavonas possuem efeitos sobre o câncer, no que diz respeito à prevenção, controle e eliminação de células cancerígenas.

A genisteína é um exemplo de isoflavonas presente na soja capaz de modular vias biológicas associadas ao estrogênio, inibindo o processo de angiogênese, inflamação e metástase (SAKAR, 2003), além de poder ser utilizada como coadjuvante no tratamento do câncer pelo seu sinergismo com quimioterápicos utilizados na prática clínica, como a doxorrubicina, docetaxel e tamoxifeno (SPAGNUOLO et al., 2015). Zhang e colaboradores (2013) demonstraram que isoflavonas atuam inibindo o crescimento celular em células de câncer de cólon humano através da parada do ciclo celular e ativação da apoptose. Dados da literatura também associam o consumo de alimentos ricos em isoflavonas com efeitos benéficos sobre cânceres de cólon, próstata e mama (GESCHER et al., 1998).

Estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando um modelo de sarcoma osteogênico (câncer ósseo primário) mostraram que camundongos portadores do tumor e tratados com a formononetina, uma isoflavona muito utilizada como estimulante biológico com grande potencial de uso na agricultura, apresentaram uma redução significativa da massa tumoral (WEI et al., 2019). Outro trabalho publicado na literatura mostrou que a isoflavona Biochanina A, quando testada em camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich, sinergiza o efeito anticâncer do quimioterápico 5-fluorouracila (MAHMOUD et al., 2022). Até o momento, não há dados na literatura que avalie o efeito do isoflavonóide trifolirizina no modelo tumoral de Ehrlich.

## 2.5 Trifolirizina

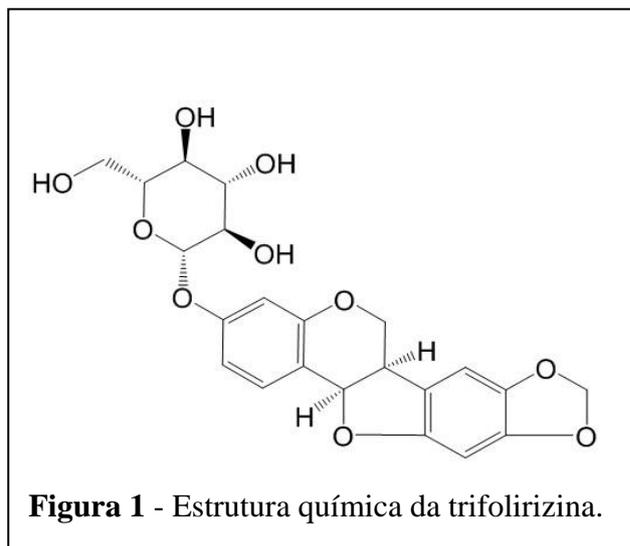
A família Fabaceae é a segunda maior família de plantas (cerca de 19.000 espécies catalogadas), onde mais de 490 espécies vegetais são utilizadas para fins terapêuticos já reportados pela medicina tradicional, bem como uma importante família vegetal fornecedora de componentes úteis para a indústria farmacêutica. Cerca de 31 espécies de 20 gêneros dessa família já foram descritas tanto na Farmacopéia Chinesa quanto na Japonesa (GAO et al., 2010). A trifolirizina (Figura 1), possui fórmula molecular  $C_{22}H_{22}O_{10}$  e peso molecular de 446,9 g/mol, é um pterocarpano pertencente aos isoflavonóides que foi identificada na espécie *Sophora flavescens*, espécie pertencente à família Fabaceae, em 1989 (ZHOU et al., 2009). Em estudos experimentais, os isoflavonóides são conhecidos por provocar efeitos benéficos no tratamento

de doenças crônicas como câncer, diabetes e osteoporose. Tais efeitos, decorrem de seus mecanismos de ação genômicos e não genômicos, dentro os quais são capazes de modular a expressão de proteínas que regulam o ciclo celular, bem como exercer funções antioxidantes (ESTEVES E MONTEIRO, 2001).

Investigações do efeito sobre o músculo liso revelaram que a trifolirizina mostrou-se capaz de inibir a contração do músculo liso induzida por acetilcolina independente de receptores adrenérgicos do tipo  $\beta_2$ , indicando o potencial deste isoflavonoide no tratamento da asma (YANG et al., 2013). Estudos prévios reportaram ainda que a trifolirizina possui um potencial anti-inflamatório por inibir tanto a expressão de citocinas pró-inflamatórias quanto a expressão de ciclo-oxigenase (COX-2) em macrófagos murinos (J774.A1) estimulados por lipopolissacarídeos (LPS).

Estudos anteriores descreveram que a trifolirizina obtida das raízes secas de *Sophora flavescens* apresentou atividade contra bactérias *Helicobacter pylori*, mostrando-se efetiva numa concentração equivalente a ampicilina (100  $\mu\text{g/mL}$ ). Agregando valor a este efeito antimicrobiano, a trifolirizina também foi capaz de reduzir a superprodução de ácido pela mucosa gástrica ao mesmo tempo em que eliminou radicais livres, resultados que, em conjunto, revelam o potencial da trifolirizina em atuar como agente anti-úlceras por proteger a mucosa gástrica (ESPINOSA, HINOJOSA E ROMERO, 2011).

A trifolirizina mostrou ainda um potencial antitumoral sobre células de leucemia promielótica humana (HL-60) por indução da apoptose (ARATANECEMUGE et al., 2004). Devido aos seus efeitos inibitórios da ação da enzima tirosinase, envolvida na síntese de melanina por células de melanoma B16 cultivadas *in vitro*, este isoflavonoide tem sido apontado como um candidato a agente clareador da pele (HYUN et al., 2008; DONIDA et al., 2009), sendo esta enzima o alvo de alguns quimioterápicos. Adicionalmente, foi reportado ainda que a trifolirizina mostra-se capaz de inibir o crescimento de células tumorais humanas de pulmão (NCI-H23) e de ovário (A2780), indicando o potencial de trifolirizina em exibir atividade anticâncer (ZHOU et al., 2009).



Apesar de alguns estudos avaliando as diferentes atividades biológicas da trifolirizina *in vitro* terem sido realizados, poucas evidências em estudos *in vivo* foram publicadas. Até o presente dia, apenas um trabalho utilizando um modelo *in vivo* de xenoinxerto de câncer gástrico (MKN45) demonstrou que a trifolirizina inibiu de forma significativa a proliferação dessas células tumorais, sugerindo que essa inibição decorra da ativação das vias de sinalização EGFR-MAPK (LU et al., 2016).

Um dos maiores questionamentos quando se utiliza um modelo animal é sobre a farmacocinética e estabilidade do composto em questão. Em relação a trifolirizina, estudos utilizando métodos cromatográficos para o estudo farmacocinético demonstrou que a trifolirizina se mantém estável sob condições de armazenamento, sendo encontrada no plasma em concentrações constantes mesmo quando administrada por via oral (NI et al., 2015). Esse resultado é de suma importância pois permite a realização mais segura de novos estudos utilizando modelos experimentais *in vivo*, o que é imprescindível para o desenvolvimento de novos fármacos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da trifolirizina sobre a forma ascítica do tumor de Ehrlich em camundongos Swiss.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL o modelo ascítico de tumor de Ehrlich em camundongos;
- Caracterizar o efeito da trifolirizina nos animais portadores do tumor de Ehrlich, tendo como parâmetros principais: a presença de ascite, perfil de celularidade na cavidade peritoneal, sangue periférico e medula óssea;
- Avaliar a atividade da trifolirizina sobre a viabilidade, metabolismo oxidativo e ciclo celular de células obtidas do líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich;
- Avaliar o efeito da trifolirizina sobre a diferenciação funcional e fenotípica de macrófagos através da expressão gênica de marcadores característicos dos perfis M1 e M2.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, entre 8-12 semanas de idade, pesando entre 28-32 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (Biocen – UFAL) e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS). Os animais foram mantidos em gaiolas (produzida em polipropileno) nas medidas (L×C×A) de 45×60×25 cm, em grupos de 6 animais por caixa, temperatura de  $21 \pm 1$  °C, ciclo claro-escuro de 12-12 horas e com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UFAL (CEUA nº 01/2017).

### 4.2 Reagentes e preparação da trifolirizina

A trifolirizina (TRIFO) foi obtida de Wuhan ChemFaces Biochemical Co., Ltd. Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MQ, USA). A trifolirizina foi diluída em solução salina (20 mg/ mL) para administração nos animais, enquanto que seu uso em sistema de cultivo de células, a trifolirizina foi diluída em meio de cultura.

### 4.3 Obtenção e manutenção do tumor de Ehrlich

As células do tumor de Ehrlich utilizadas foram cedidas gentilmente pela professora Dr<sup>a</sup> 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, sendo realizados repiques a cada 10 dias, nos quais uma alíquota de células (500 µL de  $5 \times 10^6$  células) suspensas em solução tampão salina-fosfato estéril (PBS) + gentamicina (40 mg/Kg) foi transferida de um animal portador do tumor para um animal receptor (DAGLI, GUERRA e SALDIVA, 1992). O crescimento tumoral foi observado dentro de 4-6 dias após o transplante (CHAKRABORTY et al., 2007). Também foi utilizada cultura primária de células de Ehrlich obtidas de camundongos portadores do tumor ascítico no 10º dia de desenvolvimento tumoral. Estas células foram cultivadas em meio de cultura RPMI, suplementado com SBF a 10%,

penicilina/estreptomicina (1%), L-glutamina (2 mM) e mantidas em estufa por 1 hora antes de serem utilizadas.

#### 4.4 Linhagem celular

Em outro conjunto de experimentos foram utilizados macrófagos murinos J774.A1 obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), cultivadas em meio de cultura DMEM e suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina/estreptomicina (1%), L-glutamina (2 mM) e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.5 Desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich

##### 4.5.1 Indução e padronização do modelo

Os animais doadores foram mantidos com a forma ascítica do tumor de Ehrlich por 10 dias após a inoculação intraperitoneal. Após este tempo, os animais doadores foram eutanasiados por injeção intravenosa (i.v.) de tiopental (200 mg/kg). Em seguida, foi realizada assepsia da região abdominal utilizando álcool iodado (0,1%), sendo as células coletadas por punção visando a contagem e avaliação da viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de Tripán. A transferência das células tumorais de Ehrlich para um animal recebedor foi feita por meio de inoculação intraperitoneal (i.p.) com  $5 \times 10^6$  células dispersas em 0,5 mL de PBS. O dia de inoculação de células do tumor de Ehrlich foi considerado como o dia zero (0) do estudo. Para os animais induzidos utilizados para o experimento, foi utilizado apenas 1 animal doador.

Para a caracterização do perfil de crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (taE), os animais foram avaliados ao longo de 5, 10, 15 e 20 dias após a inoculação (i.p.) das células de Ehrlich. Todos os animais foram previamente pesados e tiveram suas circunferências abdominais (cm) e volume de fluido ascítico (mL) medidos ao longo do seu respectivo tempo de análise. Ao longo do experimento foram realizadas observações macroscópicas como a ocorrência de morte, prurido, perda de apetite e alopecia. Cabe registrar que os animais foram anestesiados com isoflurano (1-3%) por via inalatória, visando a realização do registro fotográfico ao longo do tempo para acompanhar o crescimento do tumor.

#### 4.6 Tratamento com trifolirizina *in vivo*

Para avaliar o efeito da trifolirizina sobre tumor ascítico de Ehrlich foram utilizados animais mantidos com tumor por 10 dias. A dose de TRIFO utilizada foi definida tendo como base um estudo anterior, onde o isoflavonóide foi testado em roedores em 10 mg/kg – o equivalente a 22,4  $\mu$ M/kg (KONG-HAI et al., 2015). Como fármaco referência, foi utilizado 5-fluorouracila (5-FU) na mesma dose de 10 mg/kg/dia (192,2  $\mu$ M/kg/dia) (MOHAMED, MOHAMED e FIKRY, 2003). Neste conjunto de experimentos, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais com 5 animais ( $n = 5$ ) por grupo, sendo eles: controle (animais que receberam apenas solução salina estéril - veículo, NaCl 0,9%); controle tumoral (animais com tumor ascítico de Ehrlich injetados com solução salina estéril); grupo 5-FU (animais com tumor ascítico de Ehrlich tratados com 5-FU 192,2  $\mu$ M/kg/dia, quimioterápico referência); grupo TRIFO (animais com tumor ascítico de Ehrlich tratados com trifolirizina - 22,4  $\mu$ M/kg/dia). Os animais foram tratados diariamente entre os dias 5<sup>o</sup> e o 9<sup>o</sup> com uma (01) injeção ao dia de solução salina, 5-FU ou trifolirizina. As injeções foram feitas no mesmo horário e pelo mesmo pesquisador. Após 24h do último tratamento (no 10<sup>o</sup> dia), os animais foram eutanasiados sendo coletadas amostras de medula óssea, sangue periférico e fluido ascítico para o processamento e análises. Todos os tratamentos foram realizados via intraperitoneal (i.p.).

#### 4.7 Perfil das células do fluido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich

A obtenção do líquido ascítico dos animais com tumor de Ehrlich permitiu a contagem total e diferencial de células recuperadas por lavagem peritoneal nos dias 5, 10, 15 e 20 após a indução do tumor. Adicionalmente, nestes mesmos intervalos de tempo, foi realizada a coleta de amostras do sangue periférico e da medula óssea para acompanhamento das repercussões sistêmicas causadas pela condição patológica. Em outro conjunto experimental, animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados com trifolirizina também tiveram amostras do fluido ascítico, do sangue periférico e da medula óssea obtidos para análise após 10 dias da inoculação.

O sangue periférico foi obtido por meio de punção da veia caudal, onde 3  $\mu$ L foram coletados para contagem dos leucócitos totais utilizando o corante de Turk (diluição de 1:60),

em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial dos leucócitos, foram confeccionadas lâminas de esfregaço, coradas com kit panótico (Panótico Rápido – Laborclin). As amostras de medula óssea foram obtidas através do lavado do fêmur com 1 mL de solução anticoagulante (PBS 1X/EDTA 20 mM). O fluido peritoneal dos animais controle foi obtido por meio do lavado peritoneal com PBS 1X estéril. Já o fluido peritoneal dos animais com tumor de Ehrlich foram obtidos através da punção de todo o volume acumulado na cavidade peritoneal. A contagem total de células da medula óssea e do fluido ascítico foi realizada pelo método de exclusão com azul de Tripán em câmara de Neubauer em microscópio óptico Olympus CH30, com aumento final de 100X. Para a contagem diferencial das células, lâminas para análise microscópica foram confeccionadas por meio de citocentrifugado de amostras em citocentrífuga (Cytocentrifuge – Cytopro™ 7620) a 350 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, as células foram coradas com o kit panótico rápido (Panótico Rápido – Laborclin) e avaliadas em microscópio óptico Olympus CH30, com aumento final de 1000X (objetiva de imersão – neste caso foi utilizado óleo de imersão para a visualização), para análise de 100 células de cada citocentrifugado.

#### 4.8 Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular das células obtidas do líquido ascítico induzidos pelo tumor de Ehrlich foi realizada utilizando o agente fluorescente iodeto de propídio. Este agente intercala-se ao DNA e permite por fluorescência quantificar diretamente a que fase do ciclo a célula se encontra. Para esta avaliação, seguiu-se o protocolo descrito por Nicoletti et al., (1991) com adaptações, onde  $1 \times 10^5$  células do fluido ascítico foram fixadas com 200  $\mu$ L de etanol 90% (em PBS 1X) por 30 minutos a 18°C. Decorrido esse tempo, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100  $\mu$ L de solução de marcação contendo RNase (1 mg/mL), iodeto de propídio (1 mg/mL) e PBS (1X, q.s.p.), incubando-se por 30 minutos ao abrigo da luz. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II™ (BD Biosciences) adquirindo-se 20.000 eventos/amostra. Os dados foram apresentados em porcentagem.

#### 4.9 Análise de espécies reativas de oxigênio

Para a quantificação das espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*, ROS) nas células obtidas do fluido ascítico, utilizou-se o método do 2',7'-diacetato

diclorofluoresceína (H2DCFH-DA). Este agente ao permear na célula e na presença de ROS no ambiente intracelular, sofre oxidação à sua forma fluorescente DCF (2',7'-diclorofluoresceína). Para a quantificação, as células ( $10^5$ ) foram marcadas com H2DCFH-DA ( $5 \mu\text{M}/\text{mL}$ ) em tubos de citometria por 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado PBS (1X) para leitura em citômetro de fluxo FACSCanto II <sup>TM</sup> (BD Biosciences).

#### 4.10 Quantificação de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (Nitric Oxide, NO) foi avaliada através do método indireto de Griess (GREEN et al., 1982), onde a concentração de nitrito presente no sobrenadante das amostras é mensurada. Para isto, 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada poço de células (J774.A1 ou taE) foram transferidos para uma placa de 96 poços. As células tumorais ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com 0,22  $\mu\text{M}$ , 2,24  $\mu\text{M}$  e 22,4  $\mu\text{M}$  de trifolirizina por 24 horas. Após este intervalo de tempo, o sobrenadante das células foi coletado e centrifugado para quantificação do NO.

Em outro conjunto experimental, as células J774.A1 ( $3 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com trifolirizina [22,4  $\mu\text{M}$ ]. Após 24 h de tratamento com trifolirizina as células tiveram o sobrenadante coletado para quantificação do NO. As concentrações de nitrito foram obtidas por meio de regressão linear a partir da curva padrão, utilizando diluições duplas seriadas. O reagente de Griess foi adicionado nas amostras e a absorbância foi calculada utilizando espectrofotômetro, com comprimento de onda de 540nm e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$  (nitrito).

#### 4.11 Análise da morfologia de macrófagos tratados com trifolirizina

Para avaliação qualitativa das alterações morfológicas das células J774.A1, as células foram fixadas com metanol PA (300  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ), após 10 minutos, foi feita a coloração com cristal violeta a 2% por 2 minutos. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS 1X e as microfotografias foram adquiridas utilizando o programa BSW com o microscópio óptico, (InfoWay Satelite Int (Nikon).

#### 4.12 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para análise da expressão gênica, as células taE foram tratadas *in vitro* com trifolirizina nas concentrações de 0,22  $\mu\text{M}$ , 2,24  $\mu\text{M}$  e 22,4  $\mu\text{M}$  por 24 horas. As células J774.A1, foram tratadas ou não com trifolirizina [22,4  $\mu\text{M}$ ] e estimuladas ou não com LPS [100 ng/mL] + IFN- $\gamma$  [30 ng/mL] ou IL-4 [100 ng/mL] por 24 horas. Após o tratamento, foi realizada a extração de RNA utilizando o Kit de Extração PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi quantificado com auxílio do NanoDrop One, tratado com DNase e, em seguida, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA). O gene de referência utilizado foi o *Mus musculus actin beta (Actb)*. A reação de PCRq foi realizada através do equipamento QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Tabela 1 - Lista de genes-alvo utilizados.

Gene-alvo (símbolo)	Sequência Forward	Sequência Reverse
Tumoral necrosis factor alpha ( <i>Tnf-<math>\alpha</math></i> )	CCGATGGGTTGTACCTTGTC	AGATAGCAAATCGGCTGACG
Interleucina 6 ( <i>IL-6</i> )	AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGA	GGAAATTGGGGTAGGAAGGA
Interleucina 8 ( <i>IL-8</i> )	CCATGGGTGAAGGCTACTGT	CCGGTGGAAATTCCTTTTGT
Interleucina 10 ( <i>IL-10</i> )	AGGACCAGCTGGACAACATA	GAGAAATCGATGACAGCGCC
Arginase ( <i>Arg-1</i> )	AGAAACAGAGTATGACGTGAG	GACCGTGGGTTCTTCACAAT
<i>Mus musculus actin beta (Actb)</i>	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	AGCCATGTACGTAGCCATCC

Fonte: Autor, 2022.

#### 4.13 Análises estatísticas

Os resultados estão representados como média e erro padrão da média (EPM) e foram avaliados estatisticamente através da análise de variância pelo teste One-Way ANOVA seguido

do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls com um nível de significância selecionado para  $p < 0,05$ . As análises dos resultados de ciclo celular foram realizadas pelo teste de variância Two-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, com nível de significância selecionado para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

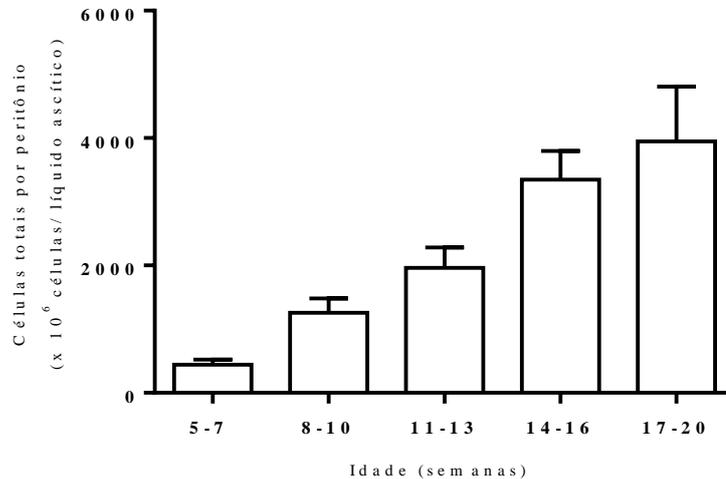
### 5.1 Caracterização do modelo experimental do tumor ascítico de Ehrlich

A padronização do tumor ascítico de Ehrlich foi realizada a partir da injeção de  $5 \times 10^6$  células na cavidade peritoneal de camundongos Swiss fêmeas com idade entre 8-12 semanas. Todos os animais foram monitorados diariamente a fim de registrar qualquer alteração em seus hábitos e diminuir qualquer estresse externo. Ao longo desta etapa foram registrados os aspectos gerais dos animais, como peso, comportamento e volume do líquido ascítico.

Uma das primeiras constatações de nosso estudo foi a identificação de que a idade do animal receptor influencia diretamente no estabelecimento do tumor. Como demonstrado na Figura 2, animais receptores mais velhos foram mais permissíveis para o desenvolvimento tumoral quando comparados a animais receptores mais jovens. Animais receptores com idade entre 8-10 semanas exibiram após 10 dias da inoculação do tumor duas vezes ( $2 \times$ ) mais células tumorais no líquido ascítico quando comparado aos animais receptores com idade entre 5-7 semanas. Este aumento no número de células tumorais no líquido ascítico foi incrementado para quatro vezes ( $4 \times$ ) quando os animais receptores tinham de 11-13 semanas de idade, e para cerca de sete vezes ( $7 \times$ ) quando tinham entre 14-16 semanas, e para cerca de nove vezes ( $9 \times$ ) quando tinham entre 17-20 semanas.

Ao analisar o peso dos animais foi constatado que a perda de peso, de pelo, e a atrofia de órgãos e debilidade motora passou a ser significativa apenas nos animais com mais de 20 dias de desenvolvimento tumoral. Todos os animais foram mantidos até o 30º dia após inoculação das células tumorais, pois nesse tempo foi observado uma diminuição significativa da movimentação e, conseqüentemente, alimentação dos animais e a presença de fluido ascítico hemorrágico.

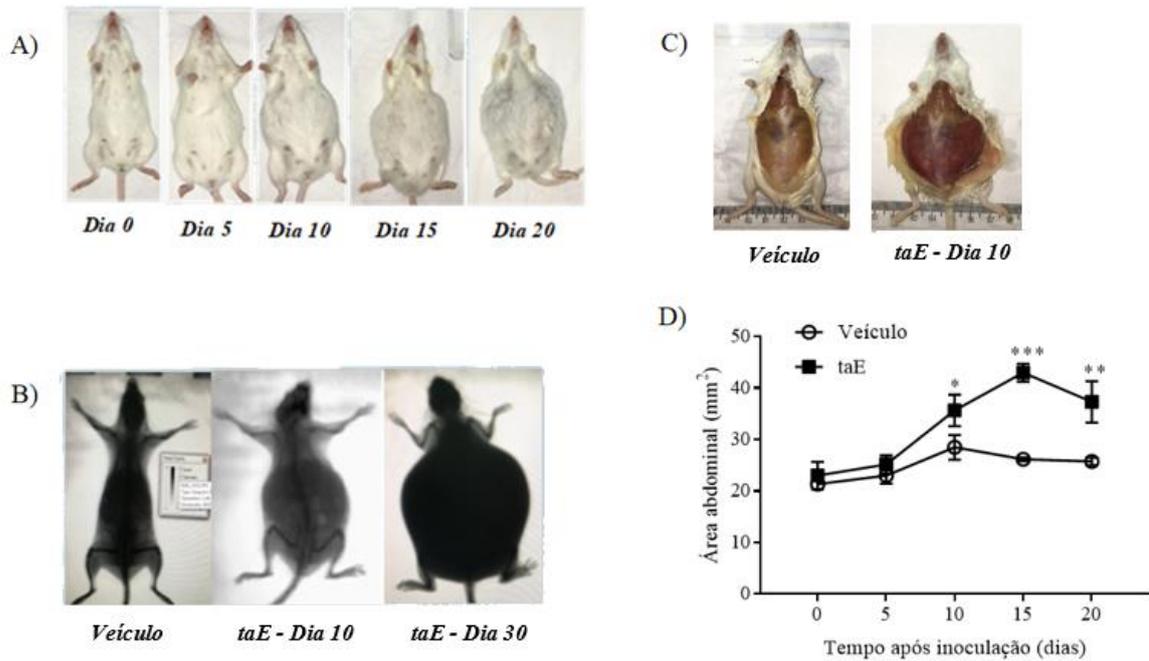
**Figura 2** - Quantidade de células totais a cada mL de líquido ascítico tumoral após 10 dias de inoculação das células do tumor de Ehrlich.



As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) da quantidade de células totais presentes no líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich após 10 dias da indução do tumor.

Ao longo dos dias após a inoculação do tumor de Ehrlich (taE) foi observado uma evidente distensão na região abdominal dos animais, esta característica intensificou após 10 dias da inoculação (Figura 3A e 3B). Ao observar a parede abdominal dos animais que receberam inoculação de células tumorais constatou-se um grande volume de líquido na cavidade peritoneal após 10 dias da inoculação (Figura 3C). Além do registro fotográfico foram realizadas medidas da área abdominal. Como observado na Figura 3D, animais inoculados com células do tumor de Ehrlich exibiram um aumento significativo na área abdominal a partir do 10º dia, que se manteve elevado até o 20º dia após a indução.

**Figura 3** – Aspectos macroscópicos da região abdominal de portadores do tumor ascítico de Ehrlich após inoculação de células tumorais.

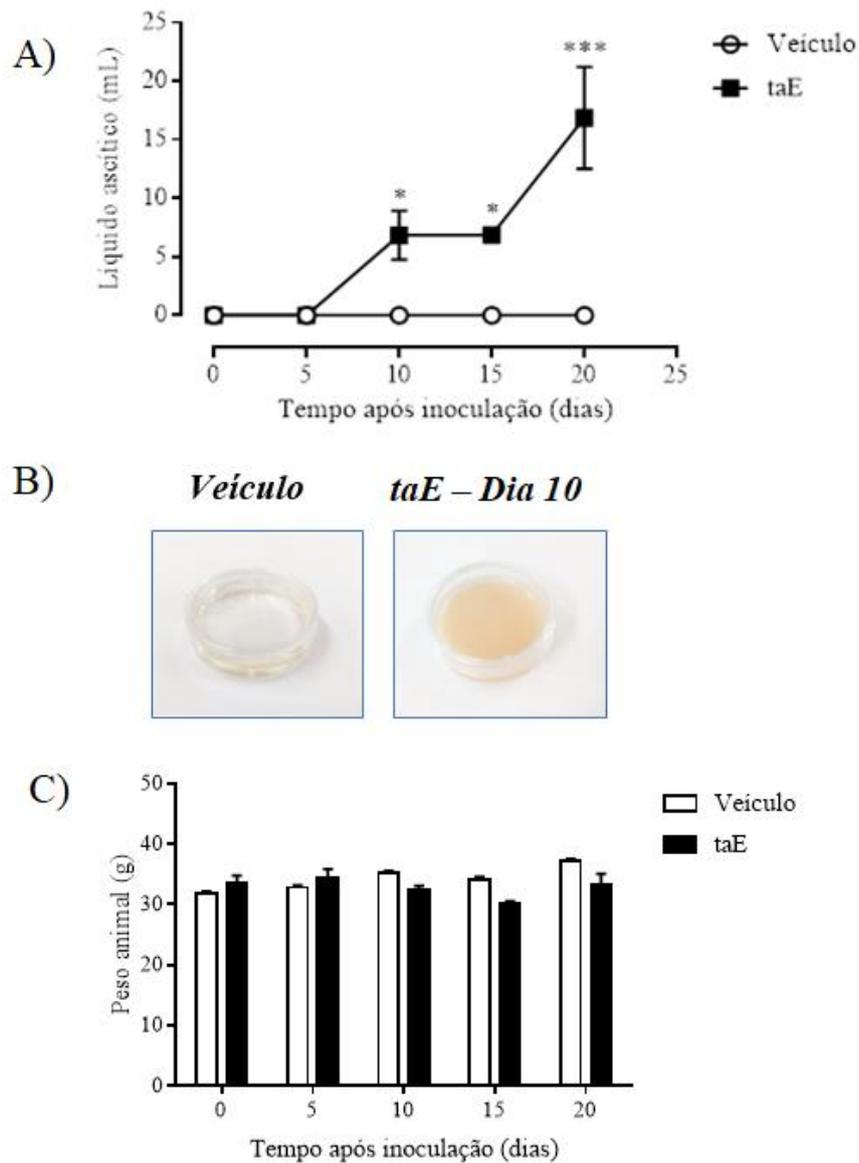


Em (A) estão os registros fotográficos dos animais com tumor ascítico de Ehrlich. Em (B) estão as imagens de raio-X representativas de animais controle e com tumor ascítico nos dias 10 e 30 após a injeção intraperitoneal de células tumorais. Em (C) estão os registros fotográficos da região abdominal expondo a parede abdominal de um animal controle (sem injeção de células tumorais) e de um animal com tumor ascítico de Ehrlich após 10 dias da inoculação. Em (D) está o gráfico representando as medidas abdominais dos animais do grupo controle e portadores do tumor ascítico de Ehrlich (taE) ao longo do tempo. As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ), sendo análise estatística 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 veículo no respectivo tempo de análise.

A Figura 4 apresenta a evolução do acúmulo de líquido ascítico no peritônio dos animais com taE. Na Figura 4A, até o 5° após inoculação do tumor de Ehrlich não foi observada a presença de líquido ascítico no abdômen dos animais, sendo necessário a realização de lavado peritoneal com salina para a obtenção das células tumorais. Um significativo aumento no volume do líquido ascítico peritoneal foi observado no 10°, 15° e 20° dia após indução tumoral. O líquido ascítico de animais com taE apresentou após 10 dias da inoculação uma coloração amarelada e viscosa (característico do tumor de Ehrlich), enquanto o fluido obtido por lavagem dos animais controle apresentava apenas uma opacidade pela presença de células do lavado (Figura 4B). Apesar do grande volume de líquido ascítico tumoral, não houve diferenças significativas na média dos pesos dos animais portadores do tumor em comparação aos animais do grupo controle nos dias 0, 5 e 10 dias. Após o dia 15 da inoculação do tumor foi observada

uma discreta redução no peso dos animais em comparação aos animais controles que não apresentavam tumor (Figura 4C).

**Figura 4** – Avaliação do volume do líquido ascítico e do peso dos animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

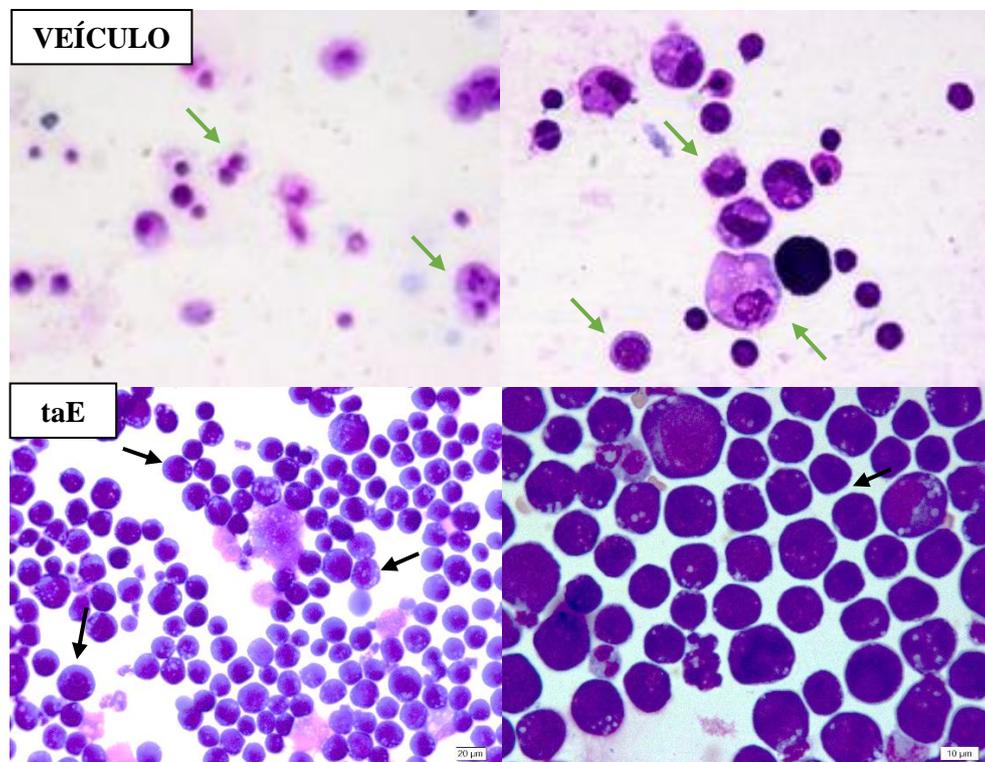


Em (A) está o gráfico representando o volume do líquido ascítico recuperado do peritônio de animais veículo (injetados com salina e sem tumor) e de animais que foram inoculados com tumor ascítico de Ehrlich (taE) em diferentes tempos. Em (B) está representado o aspecto do líquido obtido por lavagem peritoneal de animais veículo e inoculados com tumor. Em (C) está o gráfico representando os pesos dos animais do grupo veículo e dos animais com tumor ascítico de Ehrlich (taE) nos diferentes dias após a inoculação. As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) e análise estatística realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao respectivo tempo após inoculação.

### 5.1.1 Perfil de células do líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich

Após a realização da coleta de todo o líquido ascítico tumoral formado na cavidade peritoneal, as células totais foram coletadas para análise diferencial. Na Figura 5, pode-se observar os leucócitos (mononucleares – em sua maioria – e neutrófilos) presentes no lavado dos animais veículo e a morfologia apresentando volume variado das células tumorais de Ehrlich (taE) presentes no fluido ascítico.

**Figura 5** – Perfil morfológico das células obtidas do fluido ascítico de Ehrlich.

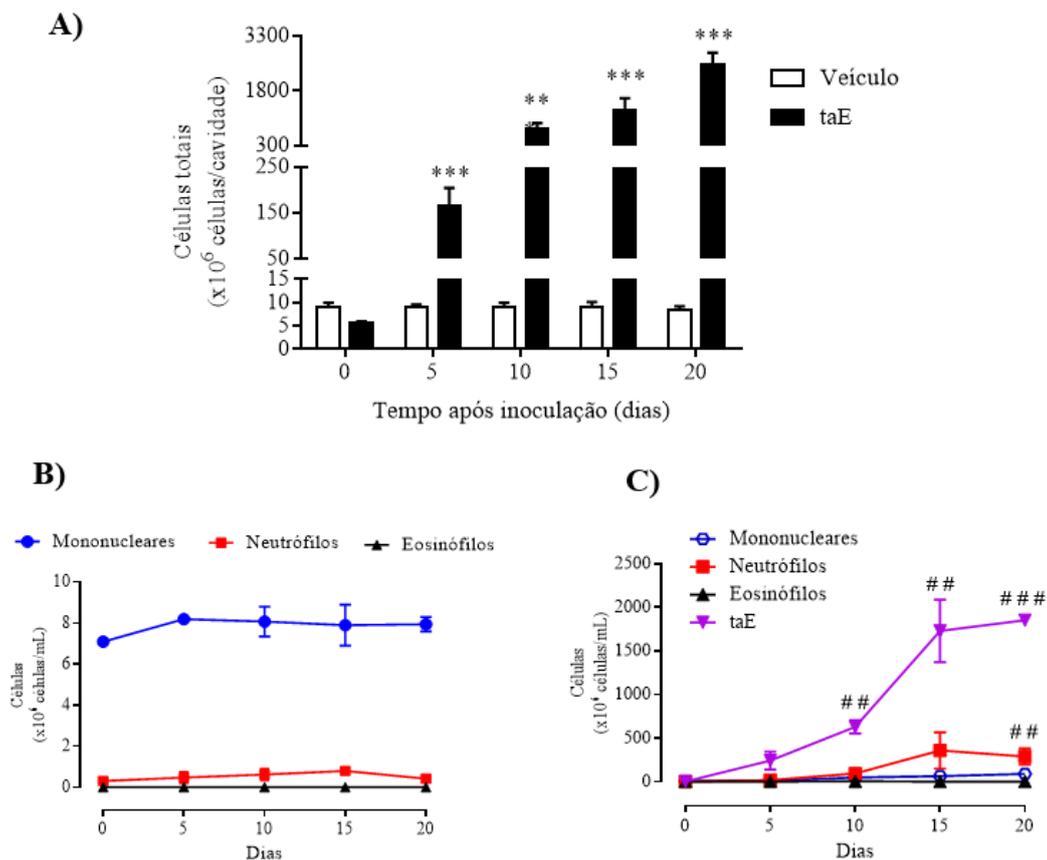


Fotomicrografias do citocentrifugado obtido do lavado peritoneal de animais sem tumor (veículo) e do fluido ascítico de camundongos Swiss fêmeas após 10 dias da inoculação do tumor. As setas em verde indicam leucócitos e as setas pretas indicam as células tumorais de Ehrlich. À esquerda: aumento de 400X; à direita: aumento de 1000X. Coloração realizada com kit panótico rápido.

A Figura 6 representa a contagem total e diferencial das células presentes no peritônio dos animais sem tumor (injetados apenas com veículo) e portadores do tumor de Ehrlich (taE). Na figura 6A, pode ser observado um aumento significativo na quantidade de células totais a partir do 5º dia de desenvolvimento tumoral, fenômeno que se manteve até o 20º dia pós-inoculação. Cabe destacar que a partir do 10º pós-inoculação a porcentagem de células tumorais passou a representar mais de 98% das células presentes na cavidade peritoneal. A quantidade

total de células presentes na cavidade peritoneal dos camundongos do grupo controle se manteve constante ao longo do tempo de análise como esperado. A contagem diferencial das células foi representada nas Figuras 6B e 6C. A Figura 6B representa o perfil diferencial de células obtidas por lavagem peritoneal de animais do grupo controle (injeção de veículo). Neste grupo experimental não foram observadas variações no número e perfil de células ao longo dos dias (de 0 a 20 dias). Ao avaliar o perfil das populações de células presentes na cavidade peritoneal dos animais com tumor de Ehrlich (Figura 6C), foi observado um aumento significativo no número de células tumorais (taE) a partir do 10º dia e um aumento da população de neutrófilos a partir do 15º dia.

**Figura 6** – Contagem de células totais e perfil das populações celulares na cavidade peritoneal de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.



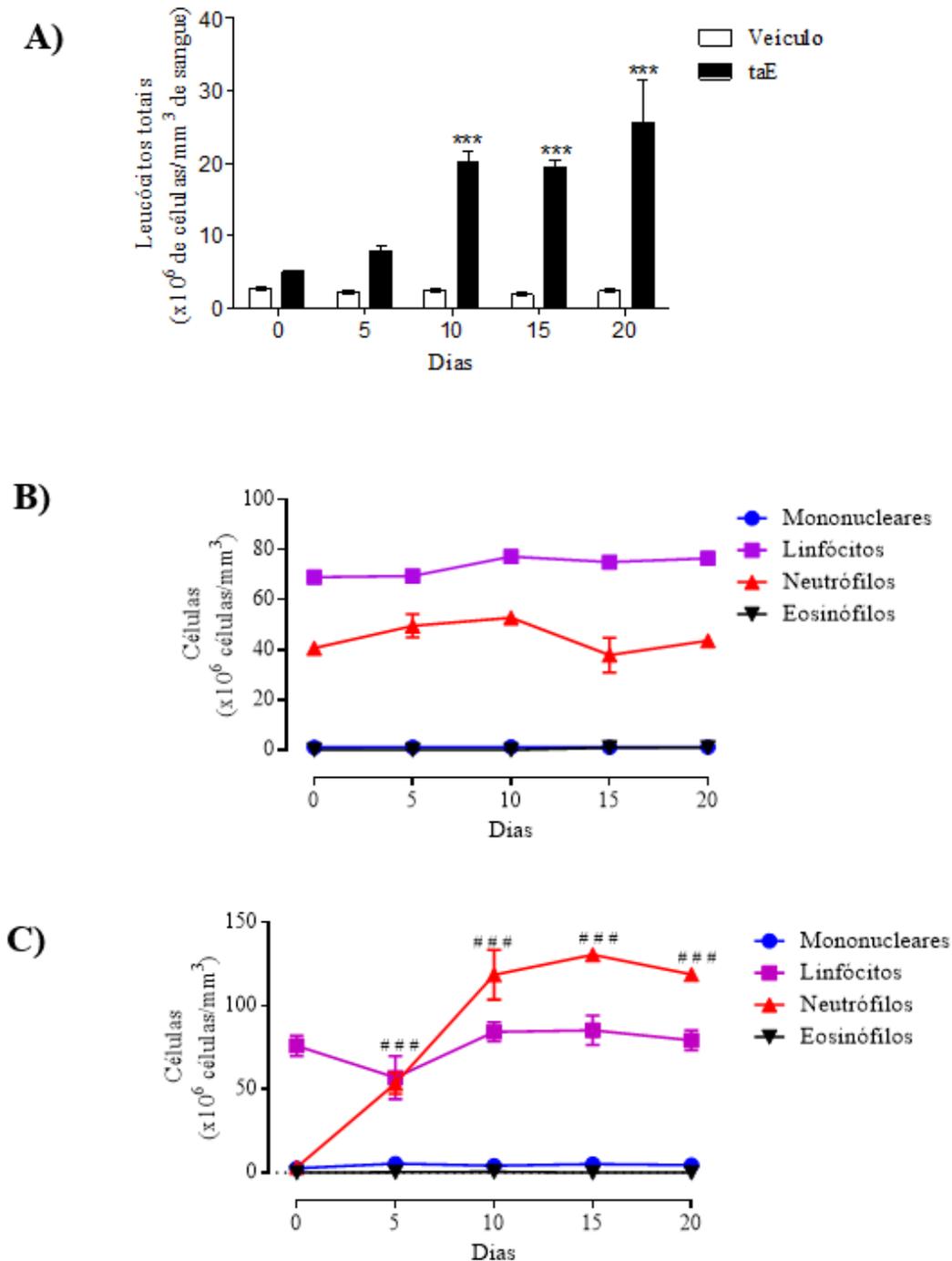
No gráfico (A) as barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) da quantidade de células totais obtidas do líquido ascítico por lavado peritoneal em animais dos grupos controle e portadores do tumor ascítico de Ehrlich (taE) no dia 0, 5, 10, 15 e 20 dias da indução do tumor. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância. Em (B) e (C) os gráficos representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) do perfil diferencial das células do peritônio de animais do grupo controle (B) e que recebeu tumor ascítico de Ehrlich (C) no dia 0, 5, 10, 15 e 20 dias da indução do tumor. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, com \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação aos animais do grupo controle no respectivo tempo de análise, #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  quando comparado ao respectivo tipo celular no tempo 0.

### 5.1.2 Perfil de células no sangue periférico e na medula óssea de animais portadores do tumor de Ehrlich

Com o intuito de avaliar possíveis efeitos do tumor ascítico de Ehrlich sobre a diferenciação de células no sangue periférico e na medula óssea, amostras foram coletadas dos animais de todos os grupos experimentais para a contagem de leucócitos totais. Na Figura 7A pode ser observado um aumento gradativo no número de células totais no sangue periférico ao longo dos dias. No 5º dia após a inoculação houve um aumento no número de células totais de aproximadamente 1,5× na contagem total de células em comparação com os animais com taE do dia 0. No 10º dia houve um aumento de aproximadamente 4× na contagem total de células, perfil que se manteve também no 15º dia pós-inoculação. Já no 20º pós-inoculação, a contagem total de células elevou para valores em torno de 5× quando comparado com as contagens de células totais dos animais no dia 0.

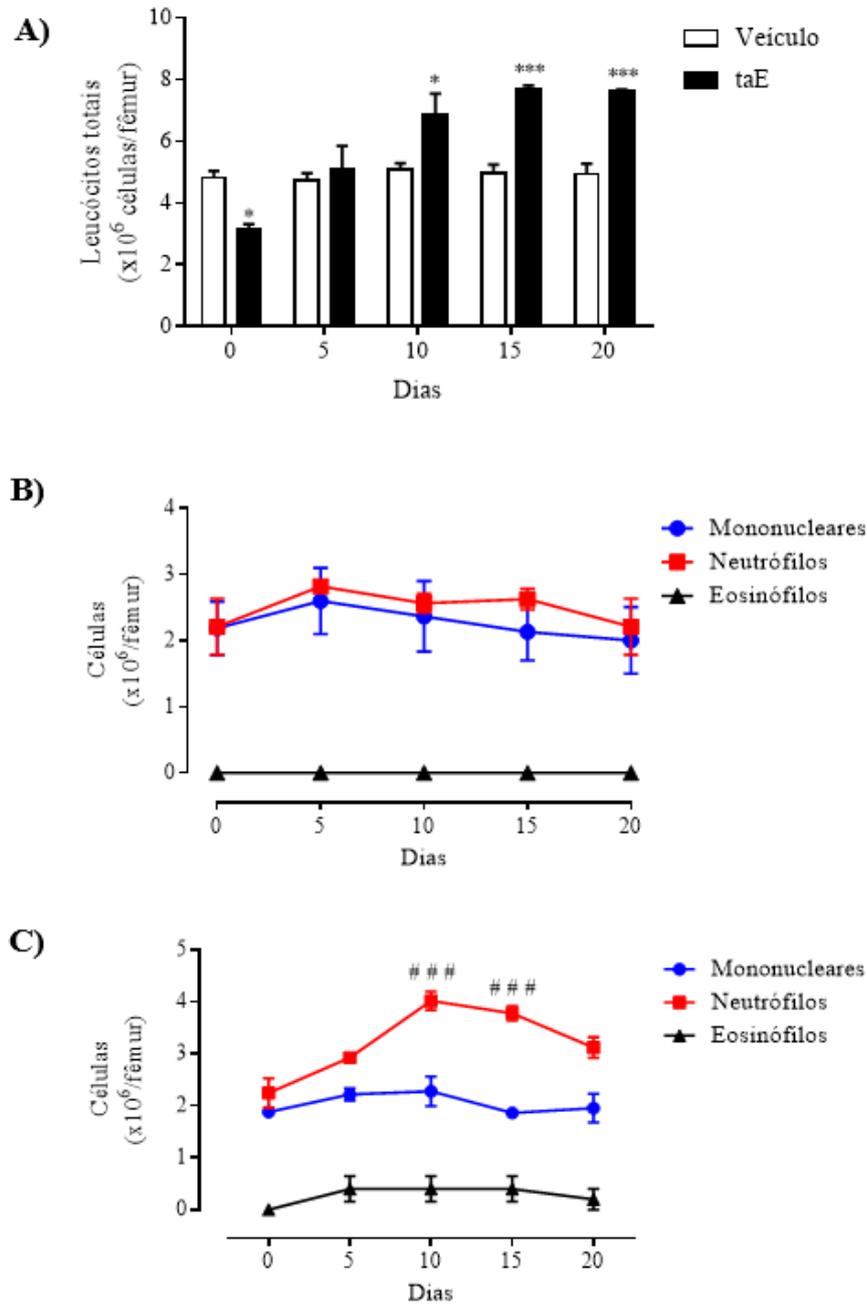
Ao ser avaliado o perfil diferencial das células dos animais do grupo veículo, notou-se que nas populações de leucócitos não houve variações numéricas ao longo das semanas (Figura 7B). Já na contagem diferencial das células obtidas do líquido peritoneal de animais com taE, já no 5º pós-inoculação houve um aumento significativo no número de neutrófilos, contagem que aumentou ainda mais no tempo de 10 dias e manteve-se elevado até o 20º dia. As demais populações de leucócitos não foram impactadas com alterações em suas respectivas contagens.

**Figura 7** – Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.



Em (A) as barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) da quantidade de leucócitos totais do sangue periférico dos animais dos grupos veículo e taE ao longo de 0, 5°, 10°, 15° e 20° dias da indução do tumor. As amostras foram obtidas por punção da veia caudal dos camundongos. (B) representa o perfil diferencial de células do sangue periférico dos animais veículo ao longo de 0, 5°, 10°, 15° e 20° dias pós indução do tumor. (C) representa o perfil diferencial de células de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich no dia 0, e após 5°, 10°, 15° e 20° dias da indução do tumor. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, com \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação aos animais do grupo controle no respectivo tempo de análise, ###  $p < 0,001$  quando comparado ao respectivo tipo celular no tempo 0.

**Figura 8** - Quantidade total e diferencial de leucócitos na medula óssea de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.



Em (A) as barras representam a média  $\pm$  EPM (n=5) da quantidade total de leucócitos presentes na medula óssea dos animais dos grupos veículo e portadores do taE nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 após a indução do tumor. As células da medula óssea foram obtidas por lavado femoral. (B) representa o perfil diferencial de células da medula óssea de animais veículo ao longo de 0, 5°, 10°, 15° e 20° dias. (C) representa o perfil diferencial de células de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich no dia 0, e após 5°, 10°, 15° e 20° dias da indução do tumor. As amostras foram obtidas por meio do lavado do fêmur dos camundongos e a análise foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, com \* p<0,05 e \*\*\* p<0,001 em comparação aos animais do grupo controle no respectivo tempo de análise, ### p<0,001 quando comparado ao respectivo tipo celular no tempo 0.

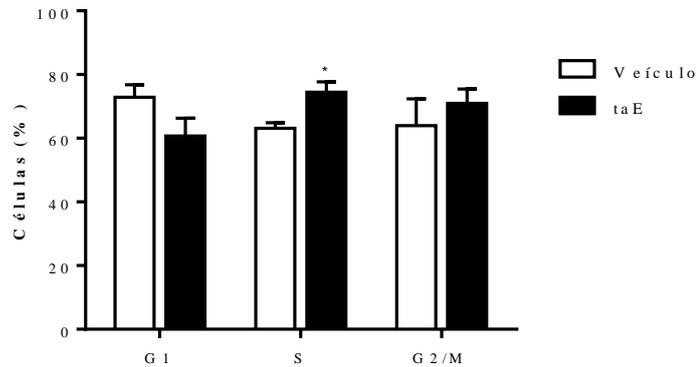
Ao ser analisada a quantidade de leucócitos totais presentes na medula óssea dos animais foi constatado um significativo aumento após o 10<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dia no grupo taE quando comparado ao grupo veículo (Figura 8A). Nestes mesmos grupos experimentais, a contagem diferencial de células da medula revelou que nos animais do grupo controle não houve alterações numéricas nas populações de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos ao longo dos dias de análise (Figura 8B). Porém, a contagem diferencial das células da medula óssea nos animais com taE revelou um aumento significativo da população de neutrófilos no 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia de desenvolvimento tumoral (Figura 8C).

Considerando o conjunto dos resultados obtidos até o momento, foi possível constatar que no tempo de 10 dias após a inoculação do tumor ocorreram significativas mudanças nos parâmetros avaliados, portanto, o 10<sup>o</sup> dia pós inoculação foi escolhido como o momento para realização das etapas seguintes do estudo. Por conta desta decisão todos os ensaios seguintes foram realizados até o 10<sup>o</sup> dia de desenvolvimento tumoral.

### 5.1.3 Análise do ciclo celular de células obtidas do fluido ascítico de Ehrlich

Com o objetivo de analisar as fases do ciclo celular em que se encontravam as células no tempo de 10 dias pós-indução do tumor, o líquido ascítico foi recuperado e as células coradas com iodeto de propídio e avaliadas por citometria de fluxo. Conforme apresentado na Figura 9, as células obtidas dos animais do grupo controle exibiram um perfil basal de manutenção celular com uma discreta redução em células na fase S quando comparado às células na fase G1. Já as células tumorais exibiram um aumento significativo na fase S do ciclo celular em comparação às células obtidas de animais do grupo controle.

**Figura 9** – Fases do ciclo celular em células obtidas do tumor ascítico de Ehrlich.



As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) das fases do ciclo celular de células obtidas do peritônio de animais dos grupos veículo (injetados com veículo, NaCl 0,9%) e portadores do tumor ascítico de Ehrlich (taE) após 10 dias da indução do tumor. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância Two-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, com \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 5.1.4 Quantificação das espécies reativas de oxigênio em células obtidas do líquido ascítico tumoral

Como apresentado na Figura 10, as células peritoneais totais obtidas dos animais do grupo veículo, injetados com solução salina (NaCl 0,9%), exibiram níveis basais de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que não se modificaram ao longo dos dias de análise. Porém, as células obtidas de animais com taE exibiram um significativo aumento na geração de ROS já no 10° dia após indução do tumor, níveis que se mantiveram elevados no 15° dia e retornaram a valores semelhantes aos observados no 5° pós-inoculação do tumor.

**Figura 10** – Espécies reativas de oxigênio intracelular de células do tumor ascítico de Ehrlich.

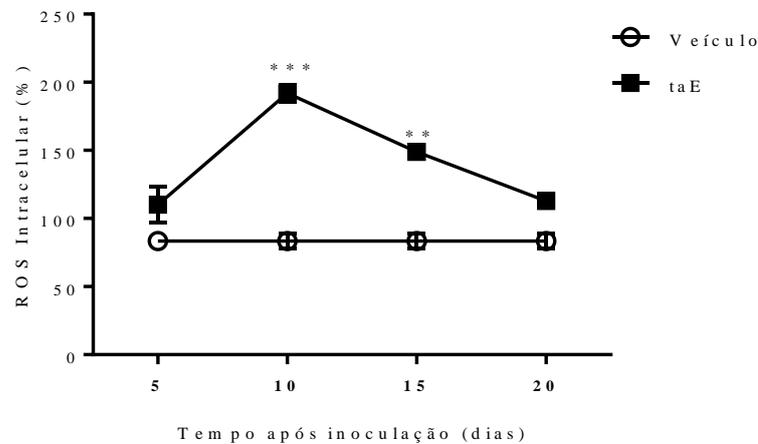


Gráfico representa a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células obtidas do peritônio dos animais do grupo veículo e tumor ascítico de Ehrlich (taE) nos tempos de 5, 10, 15 e 20 dias da indução do tumor. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, onde \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação aos animais do grupo controle no respectivo tempo de análise.

## 5.2 Efeito da trifolirizina sobre o tumor ascítico de Ehrlich *in vivo*

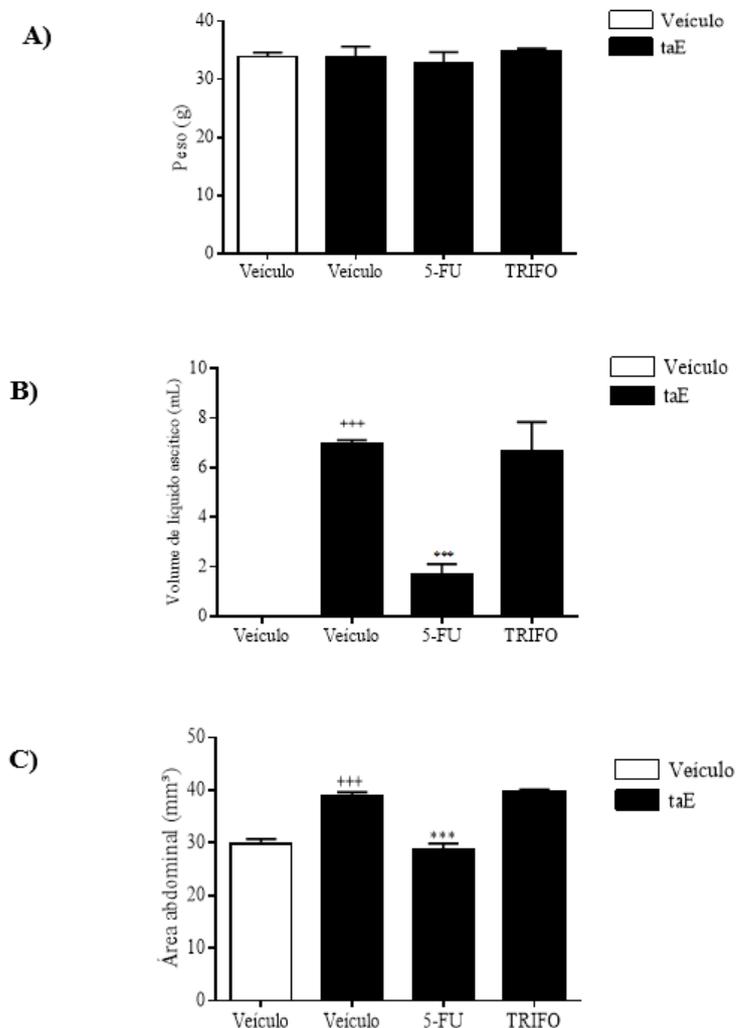
Uma vez estabelecido o modelo experimental, avançamos para avaliar os efeitos da trifolirizina (TRIFO) nas alterações induzidas pelo tumor ascítico de Ehrlich, realizando o tratamento por 5 dias com  $22,4 \mu\text{M/kg/dia}$ . Conforme apresentado na Figura 11A, os animais com taE tratados com uma injeção diária de TRIFO do 5º ao 9º dia após inoculação não apresentaram alterações significativas no peso corpóreo quando comparado aos animais do grupo controle. Animais que receberam o fármaco referência (5-FU, 5-fluorouracil) também não exibiram alterações significativas no peso corpóreo.

Ao avaliar o volume do líquido ascítico, notamos que animais com taE exibiram um significativo aumento no volume do líquido recuperado do peritônio, fenômeno que não foi alterado pelo tratamento com TRIFO. Já os animais tratados com o fármaco referência 5-FU exibiram uma drástica redução no volume do líquido ascítico nos animais com taE (Figura 11B).

Em paralelo a aferição do volume recuperado da cavidade peritoneal por lavagem realizamos também a medida da área abdominal nos animais. Como mostrado na Figura 11C, animais com taE apresentavam um significativo aumento na área abdominal quando comparado aos animais do grupo controle. Quando os animais portadores de taE foram tratados com TRIFO

nenhuma alteração significativa foi observada no aumento da área abdominal. Porém, ao ser avaliado a área abdominal nos animais portadores de taE e tratados com 5-FU, foi observado uma drástica redução no aumento da área abdominal.

**Figura 11** – Efeito do tratamento com trifolirizina e 5-FU sobre o peso e volume ascítico dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.



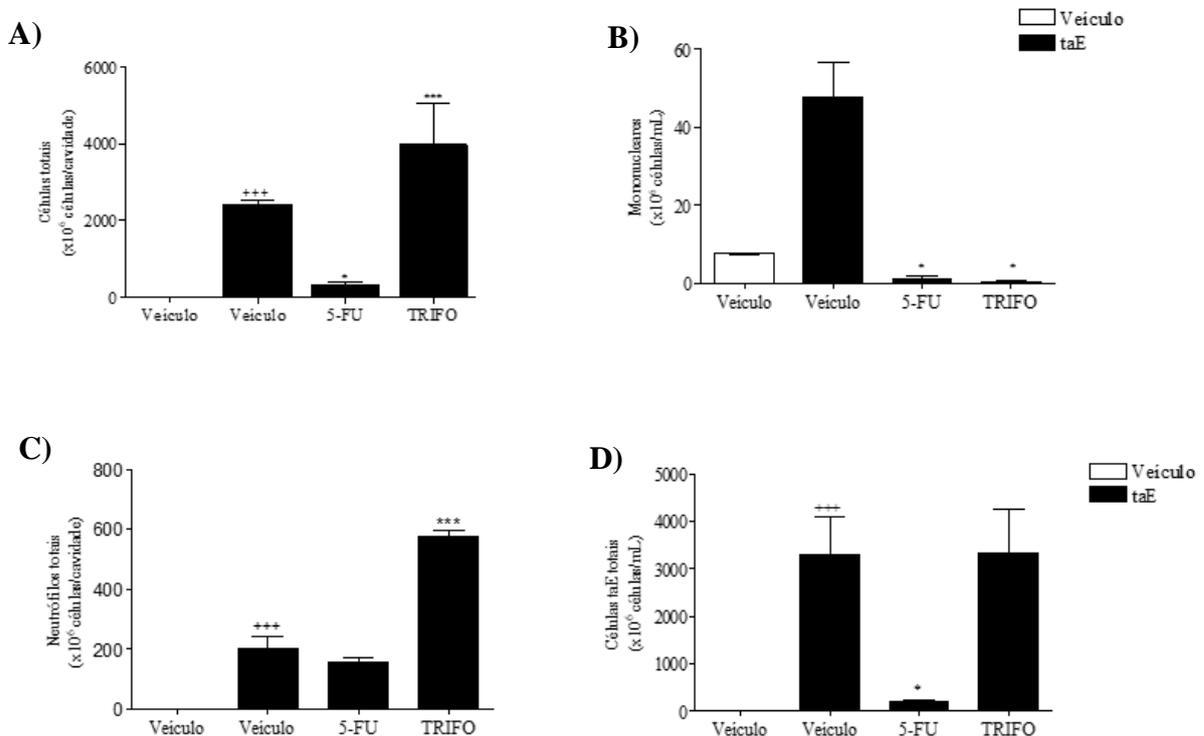
As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). As análises ocorreram 24 horas após o último tratamento. (A) apresenta o peso (gramas) dos animais no 10<sup>o</sup> pós-inoculação do taE. (B) apresenta o volume de líquido ascítico de animais do grupo veículo (sem tumor), veículo portadores de taE e de animais portadores de taE submetidos ao tratamento com 5-FU (119,2  $\mu$ M/kg/dia) ou TIFO (22,4  $\mu$ M/kg/dia) por 5 dias consecutivos. (C) representa a mensuração da área abdominal dos grupos veículo e portadores taE tratados por 5 dias com veículo (NaCl, 0,9%), 5-FU (119,2  $\mu$ M/kg/dia) ou trifolirizina (22,4  $\mu$ M/kg/dia). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA e pós teste de Tukey, onde +++  $p < 0,001$  comparado aos animais sem tumor ascítico de Ehrlich (controle) e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado aos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich tratados com veículo.

Ao ser avaliada a celularidade do líquido peritoneal dos animais, verificou-se nos animais que desenvolveram taE um aumento significativo no número de células totais em relação aos animais do grupo veículo. Quando os animais portadores do taE foram tratados com TRIFO não houve alteração significativa no aumento no número de células totais induzido pelo tumor na cavidade peritoneal. Porém, quando os animais portadores de taE receberam o

fármaco referência 5-FU foi observado uma redução significativa do número total de células presentes na cavidade peritoneal quando comparado aos animais com taE sem tratamento (Figura 12A).

A contagem diferencial das células coletadas no líquido ascítico mostrou que a presença do taE induziu um aumento na contagem de células mononucleares, fenômeno que foi inibido de forma significativa pelo tratamento com TRIFO e também pelo fármaco referência 5-FU (Figura 12B). De forma semelhante às células mononucleares, o taE induziu um aumento significativo na contagem de neutrófilos no líquido ascítico peritoneal. Porém, o tratamento com TRIFO elevou de forma significativa a quantidade de neutrófilos presentes no fluido ascítico de animais com taE. O tratamento com 5-FU não interferiu com o aumento de neutrófilos induzido pelo taE (Figura 12C). Ao ser realizada a contagem de células tumorais no líquido ascítico, como esperado, animais que desenvolveram o taE exibiram um elevado número de células tumorais no peritônio. O tratamento com TRIFO não foi capaz de interferir com este aumento na contagem de células tumorais, porém, o tratamento com 5-FU reduziu de forma significativa a contagem de células tumorais no fluido ascítico (Figura 12D).

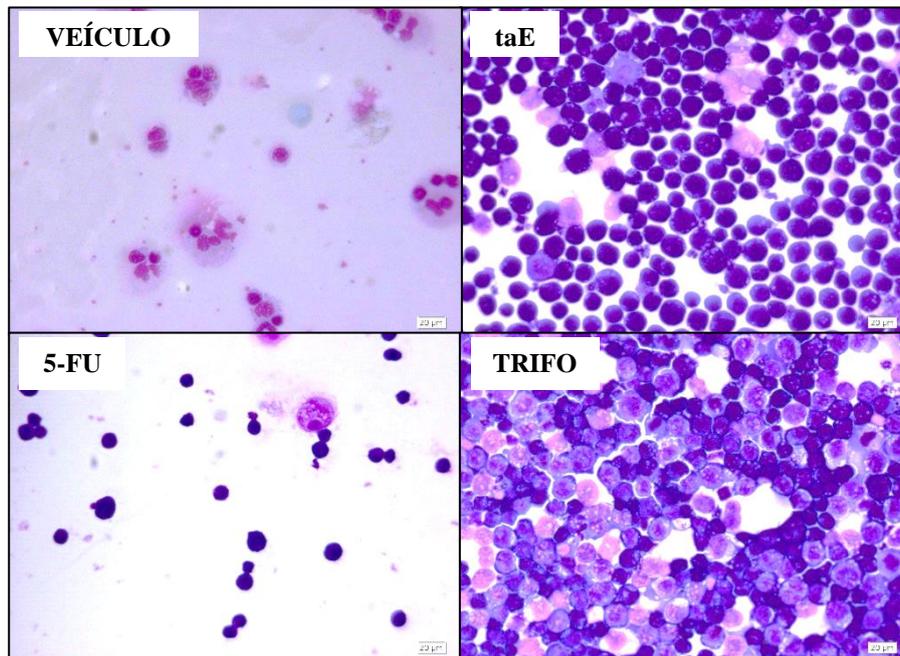
**Figura 12** – Avaliação da celularidade presente no líquido ascítico dos animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (taE) tratados com trifolirizina.



As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). As análises ocorreram 24 horas após o último tratamento. (A) representa a quantidade de células totais do líquido ascítico coletado do peritônio dos animais, (B) a contagem de células mononucleares, (C) neutrófilos, e (D) células tumorais. Animais portadores de taE foram tratados por 5 dias consecutivos com veículo (NaCl, 0,9%), 5-FU (119,2  $\mu$ M/kg/dia) ou trifolirizina (22,4  $\mu$ M/kg/dia). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA e pós teste de Newman Keuls, com  $p < 0,05$ , onde \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado aos animais portadores de taE tratados com veículo; e +++  $p < 0,001$  comparado aos animais sem taE (veículo).

A Figura 13 exibe o perfil de celularidade do líquido ascítico nos diferentes grupos experimentais após o tratamento com TRIFO e 5-FU. Nos animais com taE tratados com veículo (NaCl, 0,9%) pode ser observado células tumorais com morfologia característica, tais como células arredondadas e grandes, presença de alguns vacúolos citoplasmáticos, citoplasma escasso e núcleo volumoso. O tratamento com TRIFO causou um aumento no número de leucócitos no fluido ascítico, sem afetar o grande número de células tumorais que se mostraram ainda presentes no lavado peritoneal. Já nos animais tratados com 5-FU foi observado uma drástica alteração na morfologia das células, em particular identificado pela diminuição do tamanho das células tumorais.

**Figura 13** – Células presentes no fluido ascítico tumoral.



Imagens representativas do citocentrifugado do fluido ascítico coletado de camundongos portadores do taE após 10 dias da indução do tumor. Veículo: animais não portadores do tumor; taE: animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich sem tratamento; 5-FU: animais portadores do taE tratados por 5 dias com 119,2  $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{dia}$  de 5-fluorouracila, e TRIFO: animais portadores do taE tratados por 5 dias com 22,4  $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{dia}$  com trifolirizina. Aumento de 400x. Coloração realizada com kit panótico rápido.

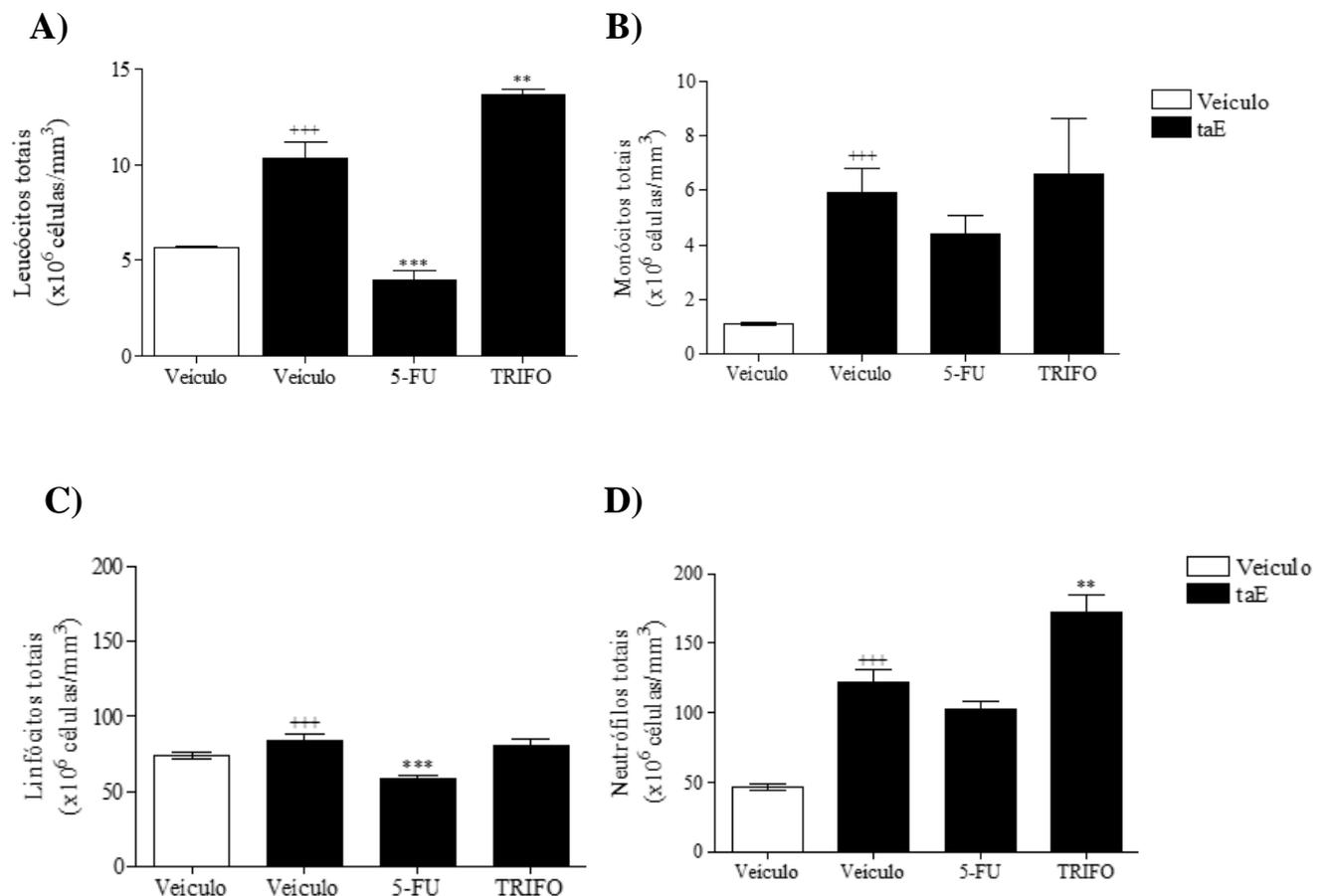
### 5.2.1 Efeito do tratamento com trifolirizina sobre as células do sangue periférico e medula óssea de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich

Como apresentado na Figura 14A, animais portadores do taE exibiram um aumento significativo nas contagens de leucócitos sanguíneos quando comparados aos animais do grupo controle (tratados apenas com veículo). Animais portadores de taE que foram submetidos ao tratamento com TRIFO apresentaram um aumento ainda maior no número de leucócitos totais no sangue periférico. Já os animais com taE tratados com o quimioterápico de referência, 5-FU, mostraram uma redução significativa no número de leucócitos totais no sangue periférico em comparação com os animais portadores de taE sem tratamento.

Ao ser analisado o perfil diferencial dos leucócitos foi observado que o taE induziu no sangue um aumento significativo na contagem de monócitos (Figura 14B), um discreto aumento, porém significativo, no número de linfócitos (Figura 14C), e um intenso aumento na quantidade de neutrófilos circulantes (Figura 14D). O tratamento de animais com taE com

TRIFO não interferiu de forma significativa com o aumento nas contagens de monócitos (Figura 14B) nem nas contagens de linfócitos (Figura 14C). Porém, o tratamento com TRIFO causou um aumento ainda maior nas contagens de neutrófilos nos animais portadores de taE (Figura 14D). Já os animais com taE tratados com 5-FU exibiram no sangue periférico uma significativa redução nas contagens de linfócitos (Figura 14C) e neutrófilos (Figura 14D). Apenas o número de monócitos não foi afetado de forma significativa pelo tratamento com 5-FU (Figura 14B).

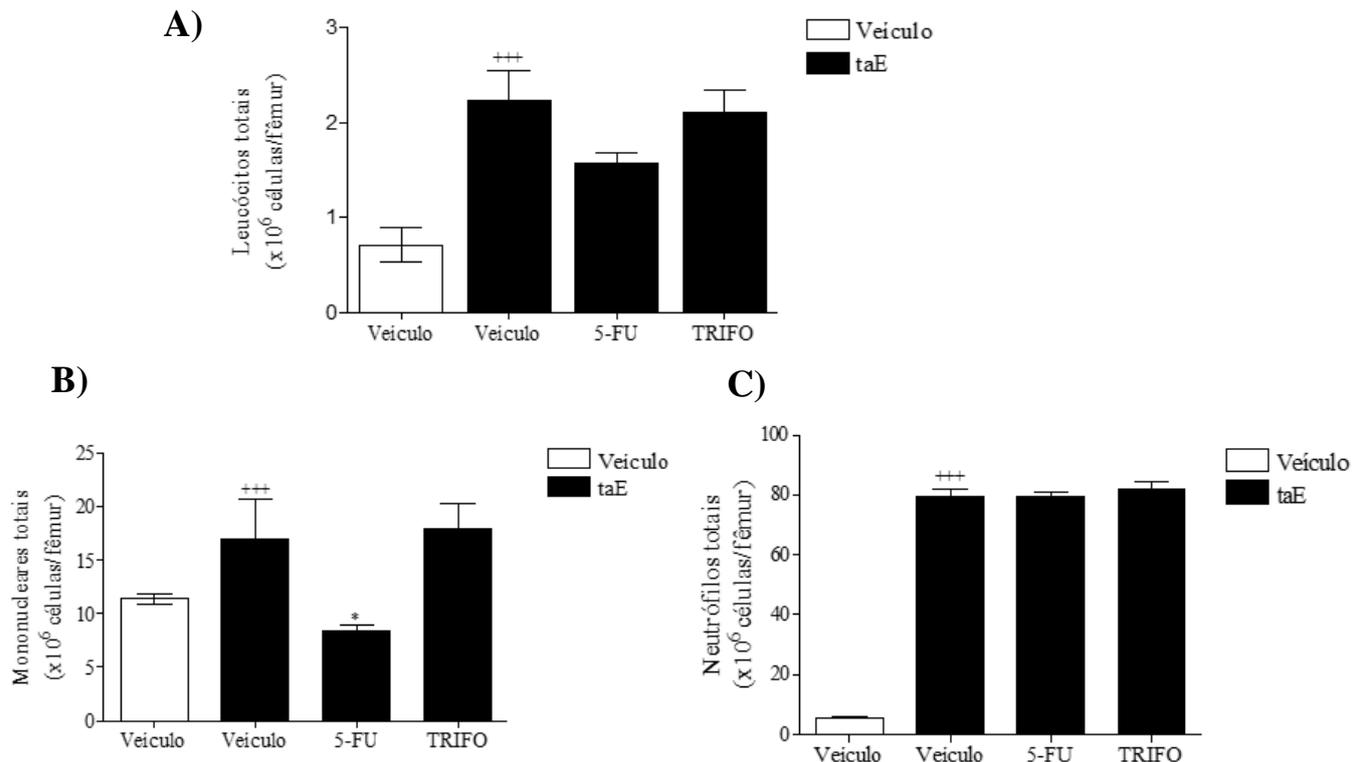
**Figura 14** – Contagem total e diferencial de leucócitos obtidos do sangue periférico dos animais portadores do taE tratados com trifolirizina.



As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n=5$ ) das contagens de células no sangue periférico de animais com taE e seus controles. (A) representa quantidade de leucócitos totais no sangue periférico, (B) a quantidade de monócitos, (C) a quantidade de linfócitos, e D) a quantidade de neutrófilos. Grupo veículo refere-se a animais tratados com NaCl 0,9% portadores ou não de taE. Animais portadores de taE foram tratados por 5 dias com 119,2  $\mu$ M/kg/dia de 5-fluorouracila (5-FU) ou trifolirizina (TRIFO). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA e pós teste de Newman Keuls, com +  $p<0,05$  e +++  $p<0,001$  comparado aos animais sem taE tratados com veículo (NaCl, 0,9%), \*\*  $p<0,01$  e \*\*\*  $p<0,001$  comparado aos animais portadores de taE tratados com veículo.

Como apresentado na Figura 15A, animais portadores do taE exibiram um aumento significativo nas contagens de células totais na medula óssea quando comparados aos animais do grupo controle (sem taE). O tratamento de animais portadores de taE com TRIFO ou 5-FU não afetou o aumento significativo nas contagens de células totais presentes na medula óssea (Figura 15A). Ao ser analisado o perfil diferencial de células na medula óssea observamos que o taE induziu um aumento, não significativo, nas células mononucleares (Figura 15B) e um intenso aumento na quantidade de neutrófilos (Figura 15C). O tratamento de animais com taE com TRIFO não interferiu de forma significativa com o aumento na contagem de células mononucleares (Figura 15B) nem com a contagem de neutrófilos (Figura 15C). Porém, apenas a população de células mononucleares se mostrou sensível ao tratamento com 5-FU (Figura 15B).

**Figura 15** - Contagem total e diferencial de leucócitos obtidos da medula óssea dos animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (taE) tratados com trifolirizina.

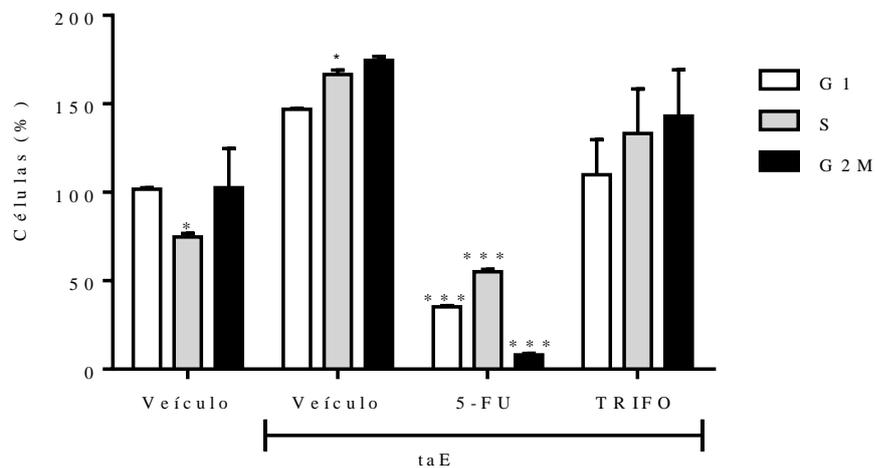


As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) da quantidade de células presentes na medula óssea. (A) representa a quantidade total de células, (B) a quantidade de células mononucleares, e (C) a quantidade de neutrófilos. Grupo veículo refere-se a animais tratados com NaCl 0,9% portadores ou não de taE. Animais portadores de taE foram tratados por 5 dias com 119,2  $\mu$ M/kg/dia de 5-fluorouracila (5-FU) ou trifolirizina (TRIFO). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA e pós teste de Newman Keuls, com  $+++ p < 0,001$  comparado aos animais sem taE tratados com veículo (NaCl, 0,9%),  $* p < 0,05$  comparado aos animais portadores de taE tratados com veículo.

### 5.2.2 Análise do ciclo celular de células do tumor de Ehrlich obtidas de animais tratados com trifolirizina

Com o propósito de avaliar os efeitos do tratamento com trifolirizina sobre a divisão das células, foi avaliado o perfil do ciclo celular das células presentes no líquido ascítico por citometria de fluxo utilizando o agente fluorescente iodeto de propídeo (PI). Na Figura 16, podemos observar que animais do grupo controle, sem taE tratados com NaCl 0,9% (veículo), exibiram células com um perfil celular típico, com uma discreta redução de células na fase S. Já as células obtidas do líquido ascítico de animais com taE observamos um significativo aumento de células na fase S do ciclo celular. O tratamento dos animais portadores de taE com TRIFO não interferiu de forma significativa com o perfil de células nas fases do ciclo celular. Porém, observou-se uma evidente mudança no comportamento de células que estavam na fase S do ciclo. Como esperado, os animais tratados com 5-FU exibiram uma significativa redução nas células em todas as fases do ciclo celular.

**Figura 16** – Ciclo celular das células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com trifolirizina.

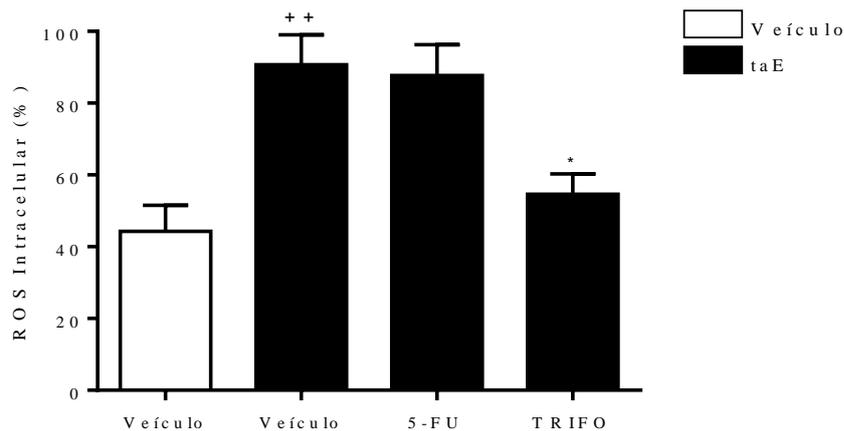


As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As células foram obtidas do líquido peritoneal de animais portadores ou não de taE, e submetidos ao tratamento por 5 dias com 119,2  $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{dia}$  de 5-fluorouracila (5-FU) ou 22,4  $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{dia}$  com trifolirizina (TRIFO). Análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA e pós teste de Newman Keuls, com \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.2.3 Quantificação das espécies reativas de oxigênio (ROS) em células obtidas do líquido ascítico tumoral de animais com taE

Conforme apresentado na Figura 17, as células totais recuperadas do fluido ascítico de animais com taE exibiram elevados níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) no tempo de 10 dias pós inoculação, fenômeno que foi completamente revertido pelo tratamento dos animais com TRIFO durante 5 dias consecutivos. Já as células obtidas de animais portadores taE tratados com 5-FU não exibiram alterações significativas nos elevados níveis intracelulares de ROS.

**Figura 17** – Espécies reativas de oxigênio intracelular de células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com trifolirizina.



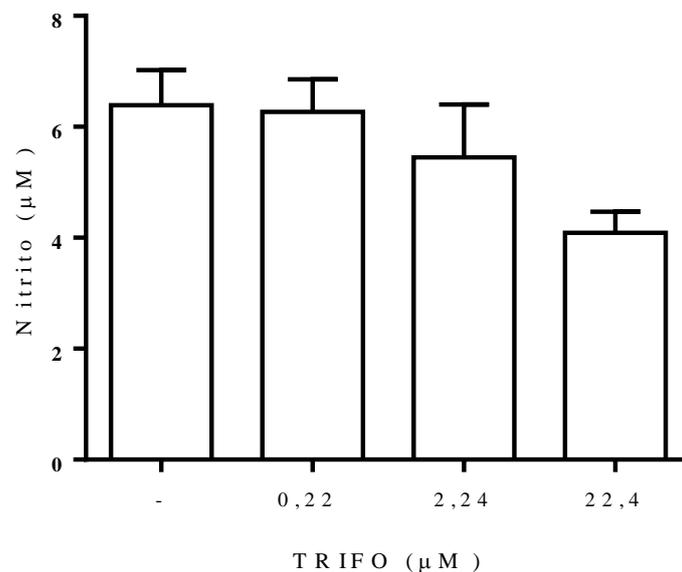
As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) referente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular em células do peritônio de animais portadores de taE. As células foram obtidas do líquido peritoneal de animais portadores ou não de taE que foram submetidos ao tratamento por 5 dias com 119,2  $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{dia}$  de 5-fluorouracila (5-FU) ou 22,4  $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{dia}$  com trifolirizina (TRIFO). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA e pós teste de Newman Keuls, com ++  $p < 0,01$  comparado aos animais sem taE tratados com veículo (NaCl, 0,9%), \*  $p < 0,01$  comparado aos animais portadores de taE tratados com veículo.

### 5.3 Efeito *in vitro* da trifolirizina sobre as células do taE

#### 5.3.1 Efeito da trifolirizina sobre a produção de óxido nítrico

A partir do resultado anterior demonstrando que células peritoneais obtidas de animais com taE tratados com TRIFO exibem uma menor produção de NO, seguimos para avaliar o efeito direto da TRIFO sobre a produção de NO por células tumorais *in vitro*. A Figura 18 apresenta a produção espontânea de óxido nítrico por células obtidas do líquido ascítico de animais com taE sob tratamento com TRIFO. Após 24h de exposição à TRIFO, o sobrenadante foi recuperado para quantificação da geração de NO pela técnica de Griess. Como apresentado na Figura 18, as células totais do peritônio de animais com taE produzem de modo espontâneo NO. Porém, esta produção não se mostrou sensível ao tratamento com TRIFO, uma vez que nenhuma das concentrações utilizadas de TRIFO (0,22  $\mu$ M, 2,24  $\mu$ M e 22,4  $\mu$ M) causou alterações significativas na geração espontânea de NO.

**Figura 18** – Efeito da trifolirizina sobre a produção de NO em células do taE.

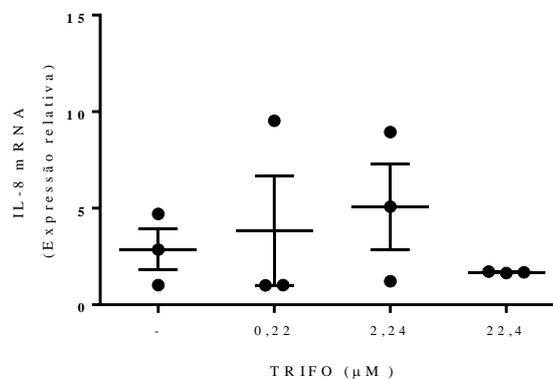


As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) referente a produção de óxido nítrico *in vitro* por células taE após o tratamento por 24 horas com trifolirizina (TRIFO). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA.

### 5.3.2 Efeito da trifolirizina sobre a expressão de mRNA para IL-8 em células do taE

A expressão de mRNA para IL-8 em células tumorais obtidas do líquido ascítico de animais com taE foi apresentada na Figura 19. Conforme apresentado na figura, a exposição de células tumorais à TRIFO não alterou de forma significativa a expressão basal de mRNA para IL-8 após 24 h de tratamento.

**Figura 19** – Efeito da trifolirizina sobre a expressão gênica de mRNA para IL-8.



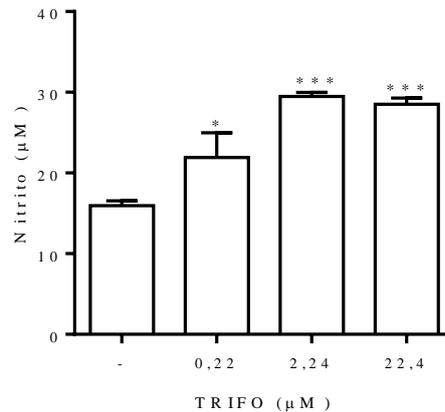
Os pontos representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) referente a expressão gênica de mRNA para IL-8 avaliada por qPCR. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA.

## 5.4 Efeito da trifolirizina sobre o perfil funcional de macrófagos *in vitro*

### 5.4.1 Efeito da trifolirizina sobre a produção *in vitro* de NO por macrófagos

A Figura 20 apresenta a geração de óxido nítrico (NO), representado pela produção de nitrito em macrófagos da linhagem J774.A1 *in vitro*. O tratamento com todas as concentrações testadas de TRIFO (0,22; 2,24 e 22,4 µM) induziu um aumento significativo na produção basal de NO após 24 h.

**Figura 20** – Efeito da trifolirizina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos *in vitro*.

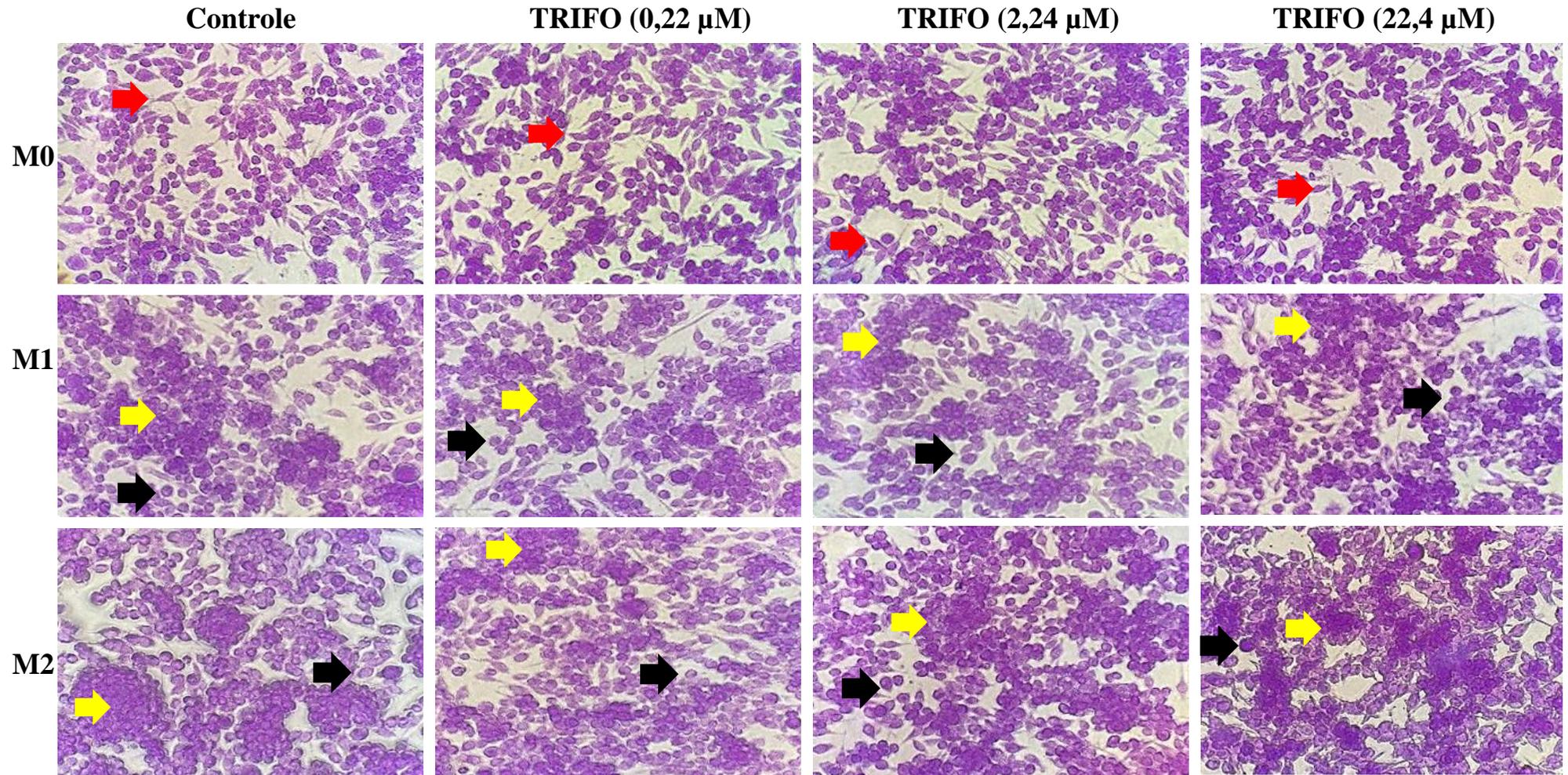


As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) da produção de óxido nítrico *in vitro* por macrófagos murinos J774.A1 após o tratamento por 24 horas com trifolirizina (TRIFO). O gráfico representa a quantidade de NO produzido por macrófagos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de variância One-Way ANOVA e pós teste de Newman Keuls, com \*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparado aos animais sem taE tratados com veículo (NaCl, 0,9%).

#### 5.4.2 Efeito da trifolirizina sobre a alteração morfológica induzida pela polarização funcional de macrófagos

Como demonstrado na Figura 21, foi realizada a avaliação das alterações morfológicas de macrófagos submetidos à polarização funcional do perfil M0 para o perfil M1 ou M2 tratados ou não com TRIFO. Macrófagos com fenótipo M0 possuem morfologia mais alongada, tamanho celular uniforme e citoplasma escasso. O tratamento com TRIFO nas três concentrações testadas não alterou o padrão morfológico dessas células (setas vermelhas). Foi ainda possível observar que as células J774.A1 polarizadas para o perfil M1 e M2 sofreram uma mudança em sua morfologia, tornando-se mais arredondadas quando comparadas aos macrófagos não estimulados M0 (setas pretas). Também foi possível observar a formação de agregados celulares nos grupos estimulados (setas amarelas), porém o tratamento com TRIFO não induziu alterações a partir deste perfil morfológico.

**Figura 21** – Efeito da trifolirizina sobre a polarização fenotípica de macrófagos para o perfil M1 e M2.

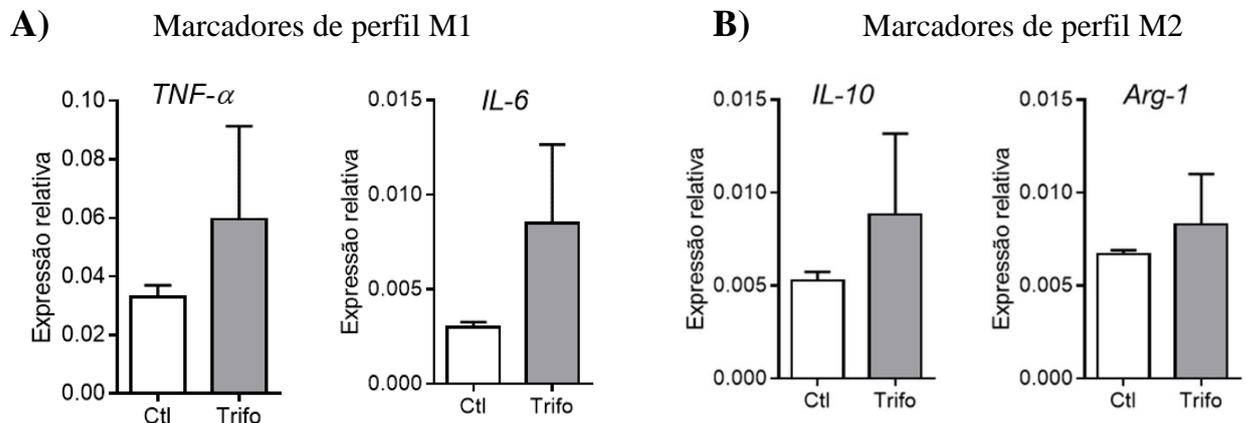


Imagens representativas de macrófagos com perfil M0, M1 ou M2 submetidos ao tratamento com trifolirizina (TRIFO) por 24 h. Após o tempo de tratamento as células foram coradas com cristal violeta e visualizadas ao microscópio óptico (aumento de 400x).

### 5.4.3 Efeito da trifolirizina sobre a expressão de marcadores funcionais de macrófagos

A partir dos resultados acima, avançamos para avaliar os efeitos TRIFO sobre a expressão basal de marcadores específicos de macrófagos com o perfil M1 e M2. Macrófagos com perfil M0 foram tratadas com TRIFO (22,4  $\mu$ M) por 24 h, e em seguida, tiveram a expressão gênica de marcadores moleculares para o perfil M1 e para o M2 avaliados. Como apresentado na Figura 22, apesar do tratamento com a TRIFO sugerir um aumento na expressão dos marcadores moleculares tanto para o perfil M1 (Figura 21A, TNF- $\alpha$  e IL-6) quanto para o M2 (Figura 21B, IL-10 e Arg-1), não houve diferença significativa entre os níveis de expressão gênica entre os grupos tratados com TRIFO e os valores dos respectivos grupos controles.

**Figura 22** – Efeito da trifolirizina sobre a expressão gênica de marcadores funcionais de macrófagos M1 e M2.



As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 3$ ) da expressão dos marcadores para o perfil M1 e M2. Macrófagos não polarizados tratados com trifolirizina (TRIFO, 22,4  $\mu$ M) por 24 h tiveram a expressão gênica avaliada por qPCR. (A) representa a expressão gênica para marcadores funcionais de macrófagos M1 (TNF- $\alpha$  e IL-6), (B) representa a expressão gênica para marcadores funcionais de macrófagos M2 (IL-10 e Arg-1). Células mantidas em meio DMEM com 10% SBF sem estímulo foram usadas como controle (Ctl). A análise estatística foi realizada utilizando o Prism 5, por One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

## 6 DISCUSSÃO

Devido a crescente incidência de novos casos de câncer em todo mundo (INCA, 2020) e por todo dano causado na saúde física e mental do paciente, bem como todo impacto negativo que esta patologia causa no sistema de saúde público (BORST e ELFERINK, 2002; CALEY E JONES, 2012), a busca por novas moléculas bioativas com potencial antitumoral vem ganhando papel de destaque. Neste aspecto, compondo o conjunto de estratégias necessárias para identificar candidatos a fármacos antitumorais, o estabelecimento e caracterização de modelos pré-clínicos de estudo, incluindo os modelos animais de experimentação, são cruciais para identificar os efeitos destes compostos no sistema vivo.

O tumor de Ehrlich tem se mostrado um relevante modelo animal, dentre os já descritos na literatura, devido à facilidade operacional da técnica, baixo custo e a realização de estudos citológicos por ser possível a obtenção das células tumorais (HOSSNE, 2002). A implantação de um modelo animal de câncer para a pesquisa pré-clínica é de extrema relevância, uma vez que, a partir destes modelos, novas moléculas com efeitos farmacológicos promissores podem ser caracterizadas e definidos para prosseguirem, ou não, como candidatos a fármacos antitumorais. O modelo animal de tumor de Ehrlich já é bem descrito por diferentes autores, porém, os protocolos experimentais utilizados apresentem variações no que se refere ao número de células inoculadas, ao tempo de tratamento, idade dos animais, sexo e tempo de desenvolvimento tumoral desde a indução do tumor até a eutanásia. Diante desta diversidade de variações de protocolo, a padronização de um procedimento experimental adequado às condições locais se faz necessário. Neste sentido, como na Universidade Federal de Alagoas até o momento não havia modelos animais para estudo do câncer estabelecido, decidimos inicialmente padronizar o modelo animal de tumor de Ehrlich para seguir com a investigação sobre os possíveis efeitos da trifolirizina sobre o câncer.

De acordo com Hossne (2002) o tumor de Ehrlich pode ter seu crescimento e agressividade controlados a partir do número de células que são inoculadas nos animais recebedores. Assim, considerando as informações da literatura científica para obter o modelo animal, foi utilizado no presente estudo uma inoculação de  $5 \times 10^6$  células na cavidade peritoneal de camundongos Swiss fêmeas com 8-12 semanas de idade. Com este procedimento foi possível constatar que o desenvolvimento do tumor foi influenciado pela idade dos animais, onde animais mais velhos apresentaram uma maior concentração de células totais na cavidade peritoneal no 10º dia após a indução, sugerindo a susceptibilidade aumentada para estabelecimento com o passar da idade. Tal observação está de acordo com as informações

encontradas na literatura científica que reportam o impacto da idade no favorecimento do crescimento tumoral (LALA, 1972; THOMAS e HEMPEL, 1976).

No presente estudo, para caracterizar o perfil de crescimento tumoral, a celularidade tumoral foi avaliada em tempos diferentes após sua inoculação intraperitoneal, sendo identificados no tempo de 5 dias, 10 dias, 15 dias e 20 dias pós-inoculação. Nossos resultados revelaram que o volume de líquido ascítico e da área abdominal, bem como a quantidade total de células recuperadas pela lavagem peritoneal, exibiram crescimento gradativo ao longo dos dias. Cabe destacar ainda que o volume de líquido ascítico produzido no 20º dia de experimentação foi exponencialmente maior que a proporção entre o 10º e 15º dia. A morfologia das células de Ehrlich presentes no fluido ascítico foi heterogênea quanto ao seu tamanho e características nucleares. Em sintonia com os nossos achados, estudos morfológicos realizados por outros autores já descreveram as células tumorais de Ehrlich como sendo pleomórficas, com um tamanho 2 a 3 vezes maior que o diâmetro de uma hemácia e seus núcleos apresentam tamanhos e formas variáveis (DAGLI, GUERRA e SALDIVA, 1992). Cabe mencionar ainda que outros protocolos utilizados para a implantação do tumor de Ehrlich na sua forma ascítica, foi também observado um crescimento proporcional entre o volume de fluido ascítico e a quantidade de células de Ehrlich, fazendo com que a concentração de células tumorais se mantivesse constante (VINCENT e NICHOLLS, 1967). A produção desse fluido ascítico tumoral pode estar relacionada ao aumento da permeabilidade de capilares peritoneais, permeabilidade esta que é resultante da irritação causada pela inoculação das células tumorais, que também está associada a liberação de substâncias envolvidas no processo inflamatório (FECCHIO *et al.*, 1990).

Na análise de sobrevivência de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich, foi observada uma mortalidade variável durante os dias de análise. Em todos os animais que morreram durante o tempo de estudo foi observado que o fluido peritoneal coletado se mostrou com intensa hemorragia, o que permite especular a possível causa da morte destes animais. Tal observação encontra sustentação na literatura, visto que o estudo de Klein e Klein (1951) demonstrou que a forma ascítica do tumor de Ehrlich provoca morte em um tempo mais curto em relação ao tumor de Ehrlich na sua forma sólida devido à pressão mecânica exercida pelo aumento do volume de líquido ascítico, por substâncias tóxicas liberadas por células tumorais mortas e pelo processo de hemorragia intraperitoneal (MATSUZAKI, 2004).

O número de células tumorais aumentou de forma progressiva nos diferentes dias estudados, em particular a partir do 5º dia após a indução do tumor. Em relação à quantidade de neutrófilos, mononucleares e eosinófilos, não houve nenhuma alteração significativa entre

os diferentes dias de experimentação no grupo controle. Vale destacar o aumento da população de neutrófilos no fluido ascítico dos animais portadores do taE a partir no 20º dia pós-indução do tumor, fenômeno que se mostra associado às drásticas alterações induzidas pelas células tumorais.

Ao analisarmos o número total de leucócitos no sangue periférico dos animais de todos os grupos experimentais, notamos um aumento significativo da quantidade de leucócitos totais no 10º, 15º e 20º dias de desenvolvimento tumoral, fenômeno resultante do aumento da população de neutrófilos. Esse padrão no aumento de leucócitos totais também foi constatado na medula óssea a partir do 10º dia após a indução, que pode estar associado ao aumento de neutrófilos circulantes. Nossas observações estão de acordo com estudos prévios (MATSUZAKI, 2004, p.26, apud LALA, 1974, v. 7, p. 293-304) onde descrevem que o desenvolvimento e a evolução do tumor ascítico de Ehrlich é acompanhado pelo influxo de leucócitos do sangue para a cavidade peritoneal.

As células tumorais variam nas suas respostas a diversos tratamentos, provavelmente refletindo o perfil metabólico que possuem, uma vez que trocas nos mecanismos de reparo do DNA, nos pontos de checagem do ciclo celular ou no controle da apoptose influenciam na susceptibilidade das células aos quimioterápicos (ALBERTS et al, 2010, CHOI et al., 2007). Neste contexto, avaliamos neste estudo o perfil do ciclo celular das células do tumor de Ehrlich nos diferentes dias de experimentação bem como a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por estas células. Os resultados obtidos a partir da análise do ciclo celular revelaram que houve discretas mudanças no perfil de distribuição nas diferentes fases do ciclo nos grupos experimentais estudados. Foi possível notar um discreto aumento, porém significativo, na porcentagem de células em todas as fases do ciclo no grupo tumoral (taE) em comparação ao grupo controle. Ao analisarmos a produção de ROS por estas células, podemos notar um aumento significativo no 10º e no 15º dia de evolução tumoral, embora a média percentual apresente uma tendência de redução destas ROS no 20º dia. Está bastante estabelecido que os níveis de ROS intracelular podem ser utilizados para monitorar o potencial dano que as células estão expostas (GORRINI, HARRIS e MAK, 2013). Mesmo que alguns estudos tenham reportado que o estresse oxidativo causado pela resposta inflamatória do hospedeiro possa promover o crescimento tumoral, o desequilíbrio oxidativo nas células tumorais pode também aumentar a sensibilidade ao tratamento com quimioterápicos (APPIERTO et al., 2009). Além disso, o processo inflamatório local que resulta no aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, na produção do fluido ascítico tumoral, pode induzir que as células do tumor deflagrem alterações no microambiente, o que pode gerar um

“burst” de mitose nas células locais (FREITAS et al, 1991). A resposta inflamatória no contexto do tumor pode variar, mas tende a auxiliar na progressão tumoral (VARRICCHI et al., 2017). O aumento da divisão celular leva a um alto consumo de oxigênio, resultando em um estado de hipóxia que está associado a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores que promovem a formação de novos vasos (angiogênese), tanto que já foi reportado na literatura científica que a progressão tumoral é favorecida pelo estado inflamatório tecidual persistente (GALDIERO, MARONE e MANTOVANI, 2018; STYLIANOPOULOS et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, o número de novos casos de câncer tem aumentado e, no Brasil, o câncer de mama é o tipo mais frequente, com uma maior incidência e mortalidade, entre as mulheres (GERBER et al., 2003). Nesse contexto, nas últimas décadas inúmeras pesquisas foram realizadas a fim de elucidar fatores de risco, etiologia e, principalmente, abordagens terapêuticas mais efetivas (INCA, 2000). Neste contexto, a busca por candidatos a fármacos antitumorais a partir de fontes naturais tem aumentado significativamente. Os vegetais são espécies ricas em produção de produtos biologicamente ativos, tanto que atualmente, fármacos usados na clínica para o tratamento de diversas patologias são oriundos de fontes vegetais (DUTRA et al., 2016). Dentre os produtos derivados das plantas, os metabólitos secundários que exercem função de proteção contra estresse abióticos e bióticos nos vegetais, são compostos que já forneceram uma ampla gama de compostos farmacologicamente ativos, dentro os quais podemos destacar os compostos fenólicos, como flavonoides e isoflavonas (PRADO, 2009).

As isoflavonas, também conhecidas como isoflavonóides, são uma classe de compostos não-esteróides, que possuem sua estrutura química semelhante ao beta-estradiol natural (SENA, COSTA e COSTA, 2007) e são amplamente distribuídas na família Fabaceae (LUI et al., 2003). Muitos estudos já foram realizados com membros da família Fabaceae devido a vasta gama de espécies com propriedades terapêuticas. Estudos realizados na última década comprovaram a ampla gama de atividades farmacológicas de espécies vegetais desta família. Dentre essas espécies, nosso grupo de pesquisa já descreveu o potencial farmacológico com as espécies *Bowdichia virgilioides* e *Caesalpinia ferrea* como fontes de produtos úteis contra a dor e aumento do metabolismo oxidativo (SOUZA, 2015; SOUZA, 2012; MATOS, 2012; JULIANE et al., 2016; SILVA et al., 2010).

Diversos compostos produzidos por espécies da família Fabaceae já foram isolados, identificados e avaliados quanto às suas atividades biológicas. Em estudos recentes, Juck et al. (2016) identificou a presença do isoflavonóide trifolirizina na espécie *Sophora flavescens* e *Ononidis Radix* (ERGENE ÖZ et al., 2018). A trifolirizina, que foi descrita pela primeira vez

em 1965 por Fujise e colaboradores (1965), e tem chamando a atenção para suas ações biológicas devido ao amplo espectro de efeitos farmacológicos, dentre os quais podemos destacar suas ações anti-inflamatórias e anticâncer *in vitro* (LU et al., 2016; ZHOU et al., 2009). Além destes efeitos, estudos recentes reportaram as ações da trifolirizina em induzir autofagia em células tumorais (SUN et al., 2020), em regular a resposta imunoinflamatória por inibir a ativação do inflamassoma (ZHANG e WANG, 2022) e inibir a úlcera gástrica (MANAL-AHMAD et al., 2021)

No presente estudo utilizamos o modelo de tumor ascítico de Ehrlich para avaliar o potencial da trifolirizina em modular as repercussões locais e sistêmicas induzidas pelo estabelecimento do tumor ascítico de Ehrlich, bem como suas ações sobre as células tumorais *in vitro*. Constatamos inicialmente que o tratamento com trifolirizina não interferiu no peso dos animais, assim como também não interferiu com o volume do líquido ascítico tumoral presente na cavidade peritoneal. Apesar dos animais exibirem um nítido aspecto de caquexia com o passar dos dias, foi possível notar um evidente acúmulo de líquido na cavidade peritoneal, o que pode explicar a manutenção dos pesos dos animais ao longo dos dias de desenvolvimento tumoral. Os animais que receberam tratamento com fármaco referência, o 5-FU, exibiram uma redução no volume ascítico acompanhado de uma diminuição na área abdominal, porém, também mantiveram inalterados o perfil de peso corpóreo. No entanto, neste caso, o aspecto caquético dos animais estava atenuado, o que pode indicar uma manutenção do comportamento de ingestão de alimentos, o que pode justificar a manutenção do peso corpóreo. Estas observações encontram respaldo na literatura onde um estudo clínico revelou que o tratamento com 5-FU por seis meses em mulheres com câncer de mama não afetou o ganho de peso das pacientes devido a manutenção do apetite e ingestão de alimentos (DEL-RIO, et al., 2002).

Ao avançarmos com as análises, seguimos para avaliar a quantidade e o perfil de células no líquido ascítico tumoral. Nossos resultados revelaram que o grupo de animais com ascítico de Ehrlich exibiram um grande número de células no peritônio com predominância de células tumorais. Entretanto, no grupo de animais com tumor que foram submetidos ao tratamento com TRIFO houve um aumento ainda maior de leucócitos, com aumento significativo na contagem de neutrófilos. Esta alteração no perfil de celularidade com aumento de neutrófilos pode estar associada a um maior fluido inflamatório e, conseqüentemente, a não alteração do volume total de líquido ascítico tumoral. Além disso, pode ser especulado ainda que este aumento na população de neutrófilos ocorra devido a efeitos indiretos da TRIFO em suprimir a função de células de defesa residentes no peritônio, como por exemplo em macrófagos. Em linha com este raciocínio, recentes estudos já reportaram que a TRIFO exerce efeitos supressores sobre a

ativação de macrófagos (ZHOU et al., 2009), um importante componente de defesa do hospedeiro células tumorais. Assim, considerando este aspecto, é possível especular que os efeitos inibitórios da TRIFO sobre a capacidade de resposta dos macrófagos podem ocasionar um ambiente favorável para o desenvolvimento tumoral, o que traria reflexo no incremento da resposta inflamatória após o tratamento com TRIFO. Estudos posteriores são necessários para esclarecer este aspecto.

Seguindo este racional onde a TRIFO pode suprimir o perfil de defesa da resposta inflamatória, notamos ao analisar a população de leucócitos do sangue periférico dos animais com tumor ascítico de Ehrlich um aumento nas contagens totais de leucócitos no grupo tratado com TRIFO, com um aumento particular na população de neutrófilos. Assim, este aumento sistêmico nas contagens de neutrófilos pode estar associado aos efeitos inibidores da TRIFO nos mecanismos básicos da resposta inflamatória, o que pode favorecer a evolução tumoral. Em linha com este racional, é de conhecimento que a inflamação envolve sistemas imunes inato e adaptativo com reconhecida capacidade protetora para manter a homeostase do tecido e eliminar células tumorais (ZHAO et al., 2021), logo, o uso de fármacos capazes de suprimir a inflamação de maneira sistêmica leva a um favorecimento do desenvolvimento tumoral.

Seguindo com o estudo, passamos a avaliar os efeitos da TRIFO sobre as células recuperadas do fluido ascítico dos animais com tumor. Ao analisar o perfil do ciclo celular das células peritoneais constatamos que o tratamento com TRIFO resultou em uma discreta diminuição na porcentagem de células na fase S em relação às células do grupo tumoral sem tratamento. Embora não significativa, esta redução foi também acompanhada por uma supressão do conteúdo de ROS nas células tumorais após o tratamento com TRIFO. Os tumores de mama são frequentemente infiltrados por macrófagos, o que pode contribuir para o estresse oxidativo (KUNDU, ZHANG e FULTON, 1995). Diversas células tumorais apresentam um constante estado de estresse oxidativo e induzem a expressão de proto-oncogenes. Aparentemente, as células tumorais são resistentes ao dano nas células causados por agentes oxidantes, apesar de estarem sob constante microambiente oxidativo (TOYOKUNI *et al.*, 1995). Um dos fatores que conferem à célula uma resistência ao estresse oxidativo, é a glicólise reforçada. Em um primeiro relato, constatou-se que células cancerígenas possuem um aumento da glicólise, por um mecanismo desconhecido (KONDOH, 2008).

Os níveis de ROS intracelular podem ser utilizados para monitorar o dano celular. Diferentes maneiras de desenvolver resistência ao desequilíbrio oxidativo incluem de vias que podem eliminar o acúmulo de espécies reativas, minimizando o comprometimento das células tumorais. Exemplos desses processos incluem o direcionamento da via glicolítica na via da

pentose fosfato (SOSA et al., 2013), ou mesmo na regulação positiva de mecanismos de proteção aos agentes oxidantes, de forma a não comprometer o DNA e as funções bioquímicas da célula tumoral (GORRINI, HARRIS e MAK, 2013). A terapia pró-oxidante é baseada na geração de espécies reativas de oxigênio para matar as células tumorais. Embora o estresse oxidativo causado por ROS promova o crescimento tumoral, ele também pode aumentar a sensibilidade ao tratamento (APPIERTO et al., 2009). Seria necessário definir os níveis de ROS em um tumor específico e sua capacidade de mudar sua via glicolítica, com o fim de se obter a morte celular (SOSA et al., 2013).

Encontra-se bem descrito na literatura científica que outros mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), estão envolvidos em diversas patologias, incluindo a progressão tumoral. Na tumorigênese, níveis elevados de NO estão diretamente envolvidos com a angiogênese – processo importante para a manutenção, sobrevivência e disseminação das células tumorais no organismo (COSTA et al, 2003). No presente estudo, ao analisarmos a produção espontânea de NO *in vitro* por células tumorais após exposição por 24 h com TRIFO, não foi observada nenhuma alteração significativa na produção deste mediador inflamatório. Estudos prévios descrevem efeitos controversos do óxido nítrico endógeno em condições de resposta inflamatórias. DAL-SECCO e colaboradores (2003) demonstraram, durante a resposta inflamatória, um papel inibitório do NO sobre a migração de neutrófilos resultante da diminuição da adesão e rolamento destas células ao endotélio. Ao mesmo tempo, diferentes estudos também reportaram que distintos isoflavonoides são capazes de afetar o metabolismo oxidativo das células sem alterar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (MIADOKOVÁ, 2009). Esses dados fortalecem os nossos resultados, visto que o tratamento com TRIFO inibiu a geração de ROS sem afetar a produção de NO por células tumorais.

Na tentativa de identificar possíveis explicações para justificar o elevado número de neutrófilos em animais com tumor ascítico de Ehrlich tratados com TRIFO, decidimos avaliar o efeito direto da trifolirizina sobre a produção de interleucina-8 (IL-8) por células tumorais recuperada do fluido ascítico. A IL-8 (CXCL-8) é uma quimiocina responsável pela mobilização de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, e pode ser produzida e secretada por distintos tipos de células (FILHO, 2017), incluindo células tumorais de camundongos e de humanos (SINGH et al., 2019). No entanto, nossos resultados revelaram que o tratamento *in vitro* com TRIFO em células tumorais não alterou a expressão gênica de IL-8. O que parece reforçar a proposta de efeitos indiretos da TRIFO para justificar o aumento nos níveis de neutrófilos no líquido ascítico.

Adicionalmente, com intuito de estender as análises sobre os possíveis alvos da TRIFO, avaliamos o efeito direto deste isoflavonoide sobre algumas funções de macrófagos, uma vez que, quando ativados, podem estar envolvidos em respostas antitumorais ou produzir fatores que favoreçam o crescimento e invasão tumoral (SINGH et al, 2019, GURTNER et al, 2008). Os macrófagos estão envolvidos na migração celular, angiogênese, produção de matriz extracelular, entre outros papéis importantes para a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa, sintetizando NO, fatores de crescimento (como o fator de crescimento transformante  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento endotelial (VEGF) no sítio inflamatório (WITTE e BARBUL, 2002). Inicialmente, foi avaliado o efeito direto da trifolirizina sobre a capacidade de geração de óxido nítrico por macrófagos murinos da linhagem J774A.1. Nossos resultados revelaram o potencial da TRIFO em induzir a geração de NO de forma dependente de dose.

A partir desta influência da TRIFO sobre a geração de óxido nítrico por macrófagos, decidimos investigar se este isoflavonoide seria capaz de interferir com a diferenciação fenotípica dos macrófagos. Diante desta plasticidade funcional dos macrófagos, a avaliação de um possível efeito sobre um perfil fenotípico específico poderia sustentar a hipótese do padrão de resposta observado *in vivo*. Nossos resultados revelaram que macrófagos J774.A1 expostos à TRIFO não mostraram alterações significativas da expressão espontânea de genes típicos para cada perfil funcional de macrófagos, ou seja, não afetaram de forma significativa a expressão dos marcadores funcionais para o perfil M1 TNF- $\alpha$  e IL-6, nem mesmo para os marcadores do perfil M2 IL-10 e Arg-1. Diferente do nosso estudo, o trabalho desenvolvido por Zhou e colaboradores (2009), revelou que a trifolirizina inibiu em macrófagos J774A.1 a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6). No entanto, neste trabalho, os autores estimularam os macrófagos com LPS, e detectaram os efeitos anti-inflamatório da TRIFO. Estas condições são diferentes da observada em nosso estudo, uma vez que avaliamos o efeito da TRIFO sobre a expressão basal destes mediadores.

No conjunto, este estudo permitiu a padronização de um modelo experimental para investigar substâncias com potencial antitumoral. Além disso, verificamos que a trifolirizina, não apresentou um efeito supressor sobre a evolução do tumor ascítico de Ehrlich *in vivo*, mas pode estar envolvida na modulação do processo inflamatório/resolutivo mediado por células imunes. No entanto, experimentos adicionais são necessários para melhor caracterizar os efeitos da trifolirizina sobre o estabelecimento/progressão tumoral, bem como suas ações sobre a ativação de macrófagos.

## 7 CONCLUSÕES

- O modelo murino de tumor ascítico de Ehrlich foi padronizado no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, seguindo um padrão semelhante ao descrito na literatura, com sua fase exponencial de crescimento celular aos sete dias após a inoculação das células na cavidade peritoneal;
- *In vivo*, a trifolirizina, nas doses testadas, não mostrou efeito inibitório sobre as células tumorais ou sobre o volume de fluido ascítico formado na cavidade peritoneal. Entretanto, mostrou-se envolvida no aumento do recrutamento de neutrófilos para o local do tumor;
- A avaliação de células taE obtidas de camundongos tratados com TRIFO, mostrou um aumento significativo da fase S do ciclo celular, sugerindo uma possível parada, mas não interferiu na produção de ROS intracelular;
- O tratamento *in vitro* com TRIFO, resultou em um aumento dos níveis de NO em células taE;
- A trifolirizina não interferiu na expressão gênica de IL-8 em células taE e nem em marcadores dos perfis M1 e M2 em macrófagos J774.A1 *in vitro*.

Tomados em conjunto, estes resultados mostram os potenciais efeitos da trifolirizina em afetar a resposta imunoinflamatória associada ao câncer, em particular ao tumor ascítico de Ehrlich.

## **8 PERSPECTIVAS**

Este trabalho tem como perspectiva realizar a quantificação de citocinas inflamatórias presentes no fluido ascítico dos animais portadores do taE e no sobrenadante de macrófagos M1 e M2 tratados com trifolirizina, bem como a expressão gênica de marcadores destes perfis fenotípicos em células submetidas à estimulação.

## REFERÊNCIAS

- ACTIVIDAD, C. O. N.; HELICOBACTER, A. AS. v. 14, n. 1, p. 51–61, 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.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed, Porto Alegre, RS, p. 1206, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html>>. Acesso em 12 de abril de 2022.
- ARATANECEMUGE, Y.; HIBASAMI, H.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; KOMIYA, T. Induction of apoptosis by maackiain and trifolirhizin (maackiain glycoside) isolated from sanzukon (*Sophora Subprostrate* Chen et T. Chen) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. **Oncology Reports**, v. 12, n. 6, p. 1183–1188, 2004.
- 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.
- 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, 28 maio 2004.
- BORST, P.; ELFERINK, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 537–592, 2002.
- BORST, P.; JONKERS, J.; ROTTENBERG, S. **What makes tumors multidrug resistant** Cell Cycle Taylor and Francis Inc., , 15 nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998803>>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- 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.
- BRUYÉRE, F.; NOËL, A. Lymphangiogenesis: *in vitro* and *in vivo* models. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 8-21, 2010.
- CALEY, A.; JONES, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery**, 2012.
- CHAKRABORTY, T. *et al.* Acanthus ilicifolius plant extract prevents DNA alterations in a transplantable Ehrlich ascites carcinoma-bearing murine model. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 48, p. 6538–6548, 2007.
- CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. **Nature**, 225(5234):734-5, 1970.

CHOI, E. H.; CHANG, H. J.; CHO, J. Y.; CHUN, H. S. Cytoprotective effect of anthocyanins against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes in relation to their antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 10, p. 1873–1881, 2007.

CRISTINA, M.; LUI, Y.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M. DE; REGINA, A.; SCAMPARINI, P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [s.l: s.n.].

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 JONG, M.; MAINA, T. Of mice and humans: are they the same? Implications in cancer translational research. **J Nucl Med**, 51(4):501-4, 2010.

DEL RIO, G.; ZIRONI, S.; VALERIANI, L.; MENOZZI, R.; BONDI, M.; BERTOLINI, M.; PICCININI, L.; BANZI, M. C.; FEDERICO, M. Weight gain in women with breast cancer treated with adjuvant cyclophosphomide, methotrexate and 5-fluorouracil. Analysis of resting energy expenditure and body composition. **Breast Cancer Res Treat.**, 73(3):267-73, 2002.

DONIDA, L.; MIOT, B.; MIOT, H. A.; GUIMARÃES DA SILVA, M.; ESTHER, M.; MARQUES, A. Fisiopatologia do melasma \* Physiopathology of melasma. **An Bras Dermatol.** [s.l: s.n.].

DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological research**, v. 59, n. 4, p. 459–69, 2010.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res.**, 112:4-29, 2016.

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

ERGENE ÖZ, B.; SALTAN İŞCAN, G.; KÜPELI AKKOL, E.; SÜNTAR, İ.; BAHADIR ACIKARA, Ö. Isoflavonoids as wound healing agents from *Ononidis Radix*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, n. October 2017, p. 384–393, 2018.

ESTEVEES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Beneficial effects of soy isoflavones on chronic diseases. **Revista de Nutricao**, v. 14, n. 1, p. 43–52, 2001.

FANG, J.; SEKI, T.; MAEDA, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 28 abr. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249331>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125–132, 1990.

FUJISE, Y.; TODA, T.; ITÔ, S. Isolation of trifolirhizin from *Ononis spinosa* L. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, 13(1):93-5, 1965.

GALDIERO, M. R.; MARONE, G.; MANTOVANI, A. Cancer inflammation and cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 8, p. 1–17, 2018.

GAO, T.; YAO, H.; SONG, J.; LIU, C.; ZHU, Y.; MA, X.; PANG, X.; XU, H.; CHEN, S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 116–121, 2010.

GERBER, B.; MÜLLER, H.; REIMER, T.; KRAUSE, A.; FRIESE, K. Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 79, n. 2, p. 265–276, 2003.

GESCHER, A.; PASTORINO, U.; PLUMMER, S. M.; MANSON, M. M. Suppression of tumour development by substances derived from the diet—mechanisms and clinical implications. **Br J Clin Pharmacol.**, 45:1-12, 1998.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em 12 de abril de 2022.

GONDA, T. A.; TU, S.; WANG, T. C. **Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis** *Cell Cycle* Taylor and Francis Inc., , 1 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19550141>>. Acesso em: 15 mar. 2020

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.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBOUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Annals of Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. **Immunity, Inflammation, and Cancer** *Cell*, mar. 2010.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. **Current Opinion in Genetics and Development**, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036794>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

GUERRA, J. L. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de Ehrlich. 1983. 79 f. **Tese (Doutorado em Patologia)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

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

HANN, B.; BALMAIN, A. Building validated mouse models of human cancer. **Curr Opin Biol**, 13(6):778-84, 2001.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutation Research/DNAging**, 1992.

HARTVEIT, F. Cellular injury in untreated **Ehrlich's** ascites carcinoma. **Br J Cancer**, 16(3):556-61, 1962.

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.

HUIPING, Z.; HERMAN, L.; ZHIHONG, C.; LIANGLI, L. Y. Anti-Inflammatory and antiproliferative activities of trifolirhizin, a flavonoid from *Sophora flavescens* roots. **J Agric Food Chem.**, 10;57(11):4580-5, 2009.

HYUN, S. K.; LEE, W. H.; JEONG, D. M.; KIM, Y.; CHOI, J. S. Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 1, p. 154–158, 2008.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/>>. Acesso em 12 de abril de 2022.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC monographs of carcinogenic risks to humans and handbooks of cancer prevention. **Lyon: IARC**, 2021. Disponível em: <[https://monographs.iarc.who.int/human\\_cancer\\_known\\_causes\\_and\\_prevention.](https://monographs.iarc.who.int/human_cancer_known_causes_and_prevention.)> Acesso em: 13 maio 2022.

JUCK, D. B. F.; REZENDE, L. C. DE; DAVID, J. P.; QUEIROZ, L. P. DE; DAVID, J. M. Two new isoflavonoids from *Bowdichia virgilioides*. **Natural product research**, v. 20, n. 1, p. 27–30, 2006.

JULIANE, P. DA S.; JAMYLLÉ, N. DE S. F.; BENISIO, F. DA S. F.; LUIZ, A. F. DA S.; TAYHANA, P. M. S.; HELOISA, DE C. M.; VINICIUS, DE F. C.; RENATO, S. R.; EMILIANO, B. Aqueous extract of *Bowdichia virgilioides* stem bark inhibition of allergic inflammation in mice. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 34, p. 575–584, 2016.

KASSI, M.; POLSANI, V.; SCHUTT, R. C.; WONG, S.; NABI, F.; REARDON, M. J.; SHAH, D. J. Differentiating benign from malignant cardiac tumors with cardiac magnetic resonance imaging. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 157, n. 5, p. 1912-1922.e2, 2019.

KONDOH, H. **Cellular life span and the Warburg effect** **Experimental Cell Research**, 2008.

KONG-HAI, N.; ZHENG-DE, W.; XIN-CE, H.; CHEN-XI, W.; TIAN-TIAN, Y.; GUO-XIN, H.; MENG-TAO, Z. Determination of trifolirhizin in rat plasma by UPLC: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, 990, 181–184, 2015.

KUNDU, N.; ZHANG, S.; FULTON, A. M. Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. **Clinical & experimental metastasis**, v. 13, n. 1, p. 16–22, jan. 1995.

LALA, P. K. Age-specific changes in the proliferation of Ehrlich ascites tumor cells grown as solid tumors. **Cancer Research**, 32(3):628-36, 1972.

LU, X.; MA, J.; QIU, H.; YANG, L.; CAO, L.; SHEN, J. Anti-proliferation effects of trifolirhizin on MKN45 cells and possible mechanism. **Oncology Reports**, v. 36, n. 5, p. 2785–2792, 2016.

MANAL, A. A.; YASSER, I. K.; MANAL, M. A. Efficacy of extract from *Ononis spinosa* L. on ethanol-induced gastric ulcer in rats. **J Tradit Chin Med.**, 41(2):270-275, 2021.

MARQUES, F. M.; FIGUEIRA, M. M.; SCHIMITT, E. F. P.; KONDRATYUK, T. P.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R.; FRONZA, M. In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxid and nitric oxide generation and the NF- $\kappa$ B signalling pathway. **Inflammaol. Pharmac.** v. 27, n. 2, p. 281-289, 2018.

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.

MIADOKOVÁ, E. Isoflavonoids - an overview of their biological activities and potential health benefits. **Interdiscip Toxicol.**, Dec;2(4):211-8, 2009.

MILLS, C. D.; LEY, K. M1 and M2 macrophages: the chicken and egg of immunity. **J Innate Immun.** v. 6, p. 716-726, 2014.

MOSMANN, T. 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.

MOHAMED, M. M.; MOHAMED, M. A.; FIKRY, N. M.; Enhancement of antitumor effects of 5-fluorouracil combined with ultrasound on Ehrlich ascites tumor in vivo. **Ultrasound Med Biol**, v. 11, p. 1635-43, 2003.

MOHAMED, M.; MAHA, R. A.; ABDOLLAH, MOHAMED E. ELSESY, DALAL A. ABOU EL ELLA, SUHER K. ZADA, MAI F. TOLBA. The natural isoflavone Biochanin-A synergizes 5-fluorouracil anticancer activity in vitro and in vivo in Ehrlich solid-phase carcinoma model. **Phytotherapy Research**, 2022.

NI, K. HAI; WEN, Z. DE; HUANG, X. CE; WANG, C. XI; YE, T. TIAN; HU, G. XIN; ZHOU, M. TAO. Determination of trifolirhizin in rat plasma by UPLC: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 990, p. 181–184, 2015.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592–603, 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.

ROOMI, M.W.; KALINOVSKY T.; ROOMI, N.M.; CHA, J.; RATH, M.; NIEDZWIECKI, A. In vitro and in vivo effects of a nutrient mixture on breast cancer progression. **International Journal of Oncology**, 44(6):1933-44, 2014.

SAHIN, I.; BILIR, B.; SHAKIR, A.; KAZIM, S.; OMER, K. Soy Isoflavones in Integrative Oncology: Increased Efficacy and Decreased Toxicity of Cancer Therapy. **Integrative Cancer Therapies**, 2019.

SANTOS, O. J. DOS; SAUAIA FILHO, E. N.; NASCIMENTO, F. R. F. DO; SILVA JÚNIOR, F. C.; SILVA FIALHO, E. M.; SANTOS, R. H. P.; SANTOS, R. A. P.; SERRA, I. C. P. B. Avaliação do uso do extrato bruto de *Euphorbia tirucalli* na inibição do tumor ascítico de ehrlich. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 43, n. 1, p. 18–21, 2016.

SARKAR, F. H.; LI, Y. Isoflavonas de soja e prevenção do câncer. **Investir em Câncer**, 21 :744-757, 2003.

SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 2, p. 407–419, 1 fev. 2019.

SENA, V. M. G. D. M.; COSTA, L. O. B. F.; COSTA, H. D. L. F. F. Efeitos da isoflavona de soja sobre os sintomas climatéricos e espessura endometrial: Ensaio clínico, randomizado duplo-cego e controlado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 29, n. 10, p. 532–537, 2007.

SIGIURA, K. Tumor transplantation. In: WILLIAN, I.G. **Methods of animal experimentation**. London: Academic Press, v. 2. p. 171-222, 1965.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D. Comunicação Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich [Cell proliferation markers for evaluating the growth of solid and ascitic forms of Ehrlich tumor]. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** [s.l: s.n.].

SILVA, J. P.; RODARTE, R. S.; CALHEIROS, A. S.; SOUZA, C. Z.; AMENDOEIRA, F. C.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R.; FRUTUOSO, V. S.; BARRETO, E. Antinociceptive activity of aqueous extract of *Bowdichia virgilioides* in mice. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 2, p. 348–351, 2010.

SINGH, S.; AWASTHI, M.; PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. N. Natural Products as Anticancerous Therapeutic Molecules with Special Reference to Enzymatic Targets Topoisomerase, COX, LOX and Aromatase. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, n. 3, p. 238–274, 5 jan. 2018.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. **Oxidative stress and cancer: An overview** *Ageing Research Reviews*, 2013.

SPAGNUOLO, C.; RUSSO, G. L.; ORHAN, I. E. Genistéina e câncer: status atual, desafios e

direções futuras. **Adv Nutr.**, 6 :408-419, 2015.

STYLIANOPOULOS, T. *et al.* Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 38, p. 15101–15108, 2012.

SUN, D.; TAO, W.; ZHANG, F.; SHEN, W.; TAN, J.; LI, L.; MENG, Q.; CHEN, Y.; YANG, Y.; CHENG, H. Trifolirhizin induces autophagy-dependent apoptosis in colon cancer via AMPK/mTOR signaling. **Signal Transduct Target Ther.** Aug 27;5(1):174, 2020.

SZATROWSKI, T. P.; NATHAN, C. F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer Research**, v. 51, n. 3, p. 794–798, 1991.

**The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer - Siddhartha Mukherjee - Google Livros.** Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=qT-5MLRkHBAC&oi=fnd&pg=PP17&ots=0w1Ps3R8uc&sig=QRAcqtMT4baYdKpD0IvDHpraNYU&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=qT-5MLRkHBAC&oi=fnd&pg=PP17&ots=0w1Ps3R8uc&sig=QRAcqtMT4baYdKpD0IvDHpraNYU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)>. Acesso em: 15 mar. 2020.

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

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS letters**, v. 358, n. 1, p. 1–3, 1995.

VALADARES, M. C.; KLEIN, S. I.; GUARALDO, A. M. A.; QUEIROZ, M. L. S. Enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumour. **European Journal of Pharmacology**, v. 473, n. 2–3, p. 191–196, 25 jul. 2003.

VARRICCHI, G.; GALDIERO, M. R.; MARONE, GIANCARLO; GRANATA, F.; BORRIELLO, F.; MARONE, GIANNI. Controversial role of mast cells in skin cancers. **Experimental Dermatology**, v. 26, n. 1, p. 11–17, 2017.

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.

VIOLATO, N. M.; RAFACHO, A.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. Higher insulin sensitivity and impaired insulin secretion in cachectic solid ehrlich tumour-bearing mice. **Hormone and Metabolic Research**, v. 46, n. 9, p. 615–620, 18 mar. 2014.

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.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2002.

HU, W.; WU, X.; TANG, J.; XIAO, N.; ZHAO, G.; ZHANG, L.; OU, L. In vitro and in vivo studies of antiosteosarcoma activities of formononetin. **Journal of Cellular Physiology**, 17305-17313, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics. **Breast cancer: prevention and control**. Geneva: WHO, 2020. Disponível

em: <<https://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>>. Acesso em: 13 maio 2022.

ZHANG, Z.; WANG, C.; DU, G.; LIAN-WEN QI, L.; CALWAY, T.; HE, T.; DU, W.; YUAN, C. Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via ATM/p53-dependent pathway in human colon cancer cells. **International Journal Oncology**, 43 :289-296, 2013.

ZHANG, Q.; WANG, S.; JI, S. Trifolirhizin regulates the balance of Th17/Treg cells and inflammation in the ulcerative colitis mice through inhibiting the TXNIP-mediated activation of NLRP3 inflammasome. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, 2022.

ZHAO, H.; WU, L.; YAN, G.; CHEN, Y.; ZHOU, M.; WU, Y.; LI, Y. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal Transduct Target Ther.**, 12;6(1):263, 2021.

ZHOU, H.; LUTTERODT, H.; CHENG, Z.; YU, L. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of trifolirhizin, a flavonoid from *Sophora flavescens* roots. [s.d.].

ZÖRNIG, M.; HUEBER, A. O.; BAUM, W.; EVAN, G. **Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2001.