



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

EVERLAINE LEITE ESTEVAM DOS SANTOS

**EFEITO ANTITUMORAL DO EXTRATO AQUOSO OBTIDO DO QUIABO
(*Abelmoschus esculentus* (L.) MOENCH) NO MODELO MURINO DE
CARCINOMA DE EHRLICH ASCÍTICO**

Maceió – AL,
2025

EVERLAINE LEITE ESTEVAM DOS SANTOS

**EFEITO ANTITUMORAL DO EXTRATO AQUOSO OBTIDO DO QUIABO
(*Abelmoschus esculentus* (L.) MOENCH) NO MODELO MURINO DE
CARCINOMA DE EHRLICH ASCÍTICO**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Alagoas, como
requisito final para a obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Jamylle Nunes de
Souza Ferro

Maceió – AL,

2025

**Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Gislaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

S237e Santos, Everlaine Leite Estevam dos.

Efeito antitumoral do extrato aquoso obtido do quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) moench) no modelo murino de carcinoma de ehrlich ascítico / Everlaine Leite Estevam dos Santos. – 2025.

99 f.: il.: color.

Orientadora: Jamylle Nunes de Souza Ferro.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2025.

Bibliografia: f. 86-97.

Anexos: f. 98-99.

1. Câncer- Tratamento. 2. *Abelmoschus esculentus*. 3. Plantas medicinais. 4. Estresse oxidativo. 5. Angiogênese tumoral. I. Título.

CDU: 616-006:635.648

Folha de Aprovação

EVERLAINE LEITE ESTEVAM DOS SANTOS

EFEITO ANTITUMORAL DO EXTRATO AQUOSO OBTIDO DO QUIABO (*Abelmoschus esculentus* (L.) MOENCH) NO MODELO MURINO DE CARCINOMA DE EHRLICH ASCÍTICO

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 27 de fevereiro de 2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br
JAMYILLE NUNES DE SOUZA FERRO
Data: 12/03/2025 15:12:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Dra. Jamyille Nunes de Souza Ferro – UFAL) (Orientadora)

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br
CARLOS ALBERTO DE CARVALHO FRAGA
Data: 12/03/2025 15:05:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Examinador Externo) – Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga – UFAL

Documento assinado digitalmente
gov.br
EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO
Data: 07/03/2025 23:43:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Examinador Interno) – Dr. Emiliano de Oliveira Barreto – UFAL

Dedico esta conquista a Deus e à minha família. Em especial, à minha mãe, Ana Maria, que sempre confiou nos meus sonhos, e ao meu pai, Edson Estevam (*in memoriam*), que acreditou que realizá-los seria possível.

Dedico ainda a todos que perderam a vida e àqueles que seguem vivendo com a esperança de que, um dia, o câncer seja uma doença menos devastadora de corpos, sonhos e esperanças.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela força e pelas oportunidades que me permitiram trilhar esta jornada com perseverança e determinação.

À minha família, que esteve ao meu lado em todos os momentos, sendo fonte de apoio e força, expresso minha mais profunda gratidão. Aos meus irmãos Everton Gabriel (*in memoriam*), Everline, Everson Daniel e Jadson, e aos meus sobrinhos Miguel e Gabriel pelo incentivo em cada etapa da minha caminhada. À minha mãe, Ana, meu porto seguro, que, sem dúvidas, é a razão pela qual consegui trilhar este caminho e ao meu pai, Edson (*in memoriam*), que juntos sempre serão minha fonte de inspiração e garra, e à minha florzinha, Helô, cuja vida é a minha maior fonte de amor e motivação.

Agradeço à toda família LBC pelo apoio, ensinamentos e companheirismo ao longo desta jornada. À Ju, por todos os ensinamentos, carinho, amizade e cuidado. Aos que não mediram esforços e compartilharam comigo incansáveis horas de experimentos, minha sincera gratidão. Aos professores pesquisadores do LBC que juntamente a minha orientadora são fonte de perseverança na Ciência, Maria Danielma, Emílio Barreto e Alexandre Borbely, deixo aqui a minha mais profunda admiração e gratidão.

Agradeço ao grupo de pesquisa o qual faço parte, em especial aos meus companheiros de histologia, Fernanda e Jonata, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos e colegas que conquistei ao longo desta jornada que marcaram com boas memórias esse momento tão especial da minha formação e que, certamente levarei para toda a vida, minha sincera gratidão por cada palavra de apoio e pelos ensinamentos que ultrapassaram as paredes do LBC, do PPGCS e da UFAL. Cecília, Cleide, Ellen, Biazinha, Biazona, Jô, Laura, Manu, Vanessa, Julius, Lilian, Polli, Lays, Felipe, Ray, Camilla, Camila, Steph, Keyla, Ana, Aninha, Iasmin, Júlia e Nalvinha (*in memoriam*), Lusca, Vitor, Thays, Elias, Mary, Nanda, Thay, Raíssa, Mel, Zaíne, Andressa, Jessica e aos meus colegas de que encontrei na pós-graduação.

Agradeço ao professor Ênio Bassi e à doutoranda Elane pelos momentos de colaboração e aprendizados que certamente deixaram importantes marcas na minha formação científica.

Agradeço aos pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco, à professora Ivone Antônia de Souza por ceder as células do tumor de Ehrlich possibilitando a realização desta e outras importantes pesquisas, ao professor Severino Alves Júnior e ao pós-doutorando Yago por colaborarem conosco nesta pesquisa.

Àqueles que estiveram comigo desde o início e deixaram o caminho mais leve. A jornada não teria sido a mesma sem vocês, obrigada por tudo e por tanto meus amigos. Tay, Mona, Fernanda, Matheus e Mi.

Ao meu querido conselheiro científico, Marvin Lins, que esteve comigo em cada momento dessa jornada, me orientando e me incentivando sempre a fazer as melhores escolhas. Obrigada por me apoiar, me ouvir e por acreditar tanto em mim.

À minha ori, Jamylle Ferro, minha profunda gratidão pelas oportunidades concedidas e por me proporcionar momentos valiosos de aprendizado dentro e fora do LBC. Obrigada por estar presente em cada momento importante dessa trajetória, por depositar sua confiança em mim e por ser fonte de inspiração e de amor pela Ciência.

Aos membros da banca avaliadora de qualificação, as professoras Ivone Antônia de Souza e Maria Danielma dos Santos Reis, e de defesa os professores Carlos Alberto de Carvalho Fraga e Emiliano de Oliveira Barreto, agradeço pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições nesta etapa da minha formação que certamente enriqueceram ainda mais este trabalho.

Por fim, agradeço às agências de fomento à pesquisa brasileira, em especial à CAPES pelo financiamento da bolsa que me possibilitou realizar de forma satisfatória a tão sonhada pós-graduação. Agradeço ainda à UFAL pelo apoio institucional, à coordenação e ao corpo docente do PPGCS pelo apoio e pelas importantes contribuições na minha formação.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

RESUMO

O interesse por produtos naturais na medicina, especialmente no desenvolvimento de terapias anticâncer, tem se intensificado devido à diversidade de moléculas eficazes. Compostos bioativos extraídos de plantas apresentam grande potencial terapêutico, podendo possuir menos efeitos adversos em comparação aos tratamentos convencionais. Este estudo investigou o efeito antitumoral do extrato aquoso obtido do fruto de *Abelmoschus esculentus*, popularmente conhecido como quiabo, utilizando o modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico avaliando parâmetros como ganho de peso, circunferência abdominal, análise macroscópica por imagens, volume tumoral, quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs), angiogênese, tempo de sobrevida e possíveis efeitos sistêmicos (CEUA 20/2019). Os resultados demonstraram que o tratamento com o extrato aquoso do quiabo, nas doses de 25 mg/Kg e 100 mg/Kg, atenuaram significativamente o crescimento tumoral, que é evidenciado pela diminuição do volume ascítico, circunferência abdominal e ganho de peso associados ao tumor. Imagens fotográficas e de raio-X confirmaram a redução do volume tumoral, com diminuição da área ocupada pela ascite. Uma análise macroscópica das imagens indicou que os animais tratados com o extrato apresentaram menor distensão abdominal em comparação aos animais do grupo controle tumoral, o que reflete na diminuição da ascite, um marcador de crescimento tumoral neste modelo experimental. A contagem celular no líquido ascítico mostrou redução das células tumorais, sem afetar o quantitativo de leucócitos, com destaque para o efeito citotóxico específico sobre as células cancerígenas. Além disso, o tratamento com o extrato aumentou cerca de 27 % os níveis de EROs, sugerindo uma modulação do estresse oxidativo no microambiente tumoral, o que pode contribuir para a indução de morte celular por apoptose, um importante mecanismo anticâncer. A análise da angiogênese revelou uma redução significativa na área vascular abdominal dos animais tratados, indicando que o extrato pode inibir a formação de novos vasos sanguíneos, a partir da redução de VEGF (46 % e 62 %, EAE 25 e 100 mg/Kg, respectivamente) no microambiente tumoral, necessários para o crescimento do tumor. A sobrevida de animais tratados com o extrato aumentou significativamente, com um incremento na expectativa de vida de até 34,21 % e 55,26 % nas doses de 25 e 100 mg/Kg, respectivamente. Além disso, não foram observadas alterações macroscópicas ou microestruturais nos órgãos avaliados dos animais tratados, sugerindo a ausência de toxicidade sistêmica e a preservação dos principais órgãos linfoides nas condições deste estudo. Esses resultados evidenciam o potencial terapêutico do extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus* como um agente anticâncer, destacando a sua eficácia na redução do crescimento tumoral, na indução de morte celular, na prevenção da angiogênese e no aumento da sobrevida, com baixo risco de efeitos adversos. No entanto, são necessários estudos adicionais para esclarecer os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos observados, de modo a aprofundar o entendimento sobre a ação antitumoral do extrato.

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

ABSTRACT

The interest in natural products in medicine, especially in the development of anticancer therapies, has intensified due to the diversity of effective molecules. Bioactive compounds extracted from plants have great therapeutic potential and may have fewer adverse effects compared to conventional treatments. This study investigated the antitumor effect of the aqueous extract obtained from the fruit of *Abelmoschus esculentus*, commonly known as okra, using the murine model of Ehrlich ascitic carcinoma, evaluating parameters such as weight gain, abdominal circumference, macroscopic image analysis, tumor volume, quantification of reactive oxygen species (ROS), angiogenesis, survival time, and possible systemic effects (CEUA 20/2019). The results demonstrated that treatment with the aqueous okra extract, at doses of 25 mg/kg and 100 mg/kg, significantly attenuated tumor growth, as evidenced by the reduction in ascitic volume, abdominal circumference, and weight gain associated with the tumor. Photographic and X-ray images confirmed the reduction in tumor volume, with a decrease in the area occupied by ascites. A macroscopic analysis of the images indicated that animals treated with the extract had less abdominal distension compared to the control tumor group, reflecting the reduction of ascites, a tumor growth marker in this experimental model. Cell counting in the ascitic fluid showed a reduction in tumor cells without affecting leukocyte counts, highlighting the extract's specific cytotoxic effect on cancer cells. Additionally, treatment with the extract increased ROS levels by approximately 27%, suggesting modulation of oxidative stress in the tumor microenvironment, which may contribute to apoptosis-induced cell death, an important anticancer mechanism. Angiogenesis analysis revealed a significant reduction in the abdominal vascular area of treated animals, indicating that the extract may inhibit the formation of new blood vessels through the reduction of VEGF (46% and 62% for 25 mg/kg and 100 mg/kg of aqueous extract, respectively) in the tumor microenvironment, which is necessary for tumor growth. The survival of animals treated with the extract increased significantly, with a life expectancy increase of up to 34.21% and 55.26% at doses of 25 mg/kg and 100 mg/kg, respectively. Furthermore, no macroscopic or microstructural alterations were observed in the evaluated organs of treated animals, suggesting the absence of systemic toxicity and the preservation of major lymphoid organs under the conditions of this study. These results highlight the therapeutic potential of the aqueous extract from the *Abelmoschus esculentus* fruit as an anticancer agent, demonstrating its efficacy in reducing tumor growth, inducing cell death, preventing angiogenesis, and increasing survival with a low risk of adverse effects. However, further studies are needed to elucidate the cellular and molecular mechanisms underlying the observed effects and to deepen the understanding of the antitumor action of the extract.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- As características marcantes do câncer.....	24
Figura 2	- Composição do microambiente tumoral.....	26
Figura 3	- Mecanismos moleculares da apoptose.....	28
Figura 4	- Possíveis estratégias terapêuticas anticâncer direcionadas às EROs.....	31
Figura 5	- Estratégias de indução de morte celular oxidativa no câncer.....	32
Figura 6	- Estratégias antiangiogênicas visando o VEGF e seus receptores.....	35
Figura 7	- Efeito antiangiogênico de produtos naturais em células de câncer de mama.....	36
Figura 8	- Produtos naturais com potencial em induzir a apoptose em células de câncer de mama.....	43
Figura 9	- Imagens do fruto de <i>Abelmoschus esculentus</i>	45
Figura 10	- Delineamento experimental.....	50
Figura 11	- Esquema de quantificação da área peritoneal a partir de imagens de raio-X de camundongos portadores do tEa.....	51
Figura 12	- Visualização dos vasos sanguíneos da região abdominal.....	54
Figura 13	- Isolamento de células da medula óssea.....	56
Figura 14	- Efeito do extrato aquoso obtido do fruto de <i>Abelmoschus esculentus</i> nos parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral no modelo de tEa.....	59
Figura 15	- Efeito do EAE no perfil de células em animais portadores do tEa.....	60
Figura 16	- Efeito do EAE no perfil de leucócitos no tEa.....	62
Figura 17	- Efeito do EAE sobre os parâmetros de morfologia e morte celular em células de animais portadores do tEa.....	62
Figura 18	- Efeito do EAE na produção de EROs intracelular no tEa.....	63
Figura 19	- Efeito do EAE na angiogênese tumoral em animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico.....	65
Figura 20	- Efeito do EAE no tempo de sobrevida de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico.....	66
Figura 21	- Efeito do EAE nos leucócitos do sangue periférico e da medula óssea de animais portadores do tEa.....	69

Figura 22 – Efeito do EAE no fígado e no rim de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico.....	71
Figura 23 – Efeito do EAE nos órgãos linfoides de animais portadores do tEa....	72
Figura 24 – Resumo gráfico dos efeitos do EAE frente ao tEa.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Grupos experimentais e tratamentos.....	50
Tabela 2	– Efeito do EAE na inibição tumoral de animais portadores do tEa..	62
Tabela 3	– Efeito do EAE na expectativa de vida de animais portadores do tEa.....	69
Tabela 4	– Efeito do tratamento com EAE no consumo hídrico e alimentar de animais portadores do tEa.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
a.C.	Antes de Cristo
A375	Linhagem celular de melanoma humano
A549	Linhagem celular de carcinoma epitelial de pulmão tipo II
ACK	Solução Cloreto de Amônio-Potássio
ACS	Sociedade Americana de Câncer (<i>American Cancer Society</i>)
<i>Ad libitum</i>	Livre demanda
Akt	Proteína Quinase B (<i>Protein Kinase B</i>)
ANOVA	Análise de Variância
ARRIVE	Relatórios de Pesquisa com Animais: Experimentos In Vivo (<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>)
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
Bak	Antagonista/Assassino de Bcl-2
Bax	Proteína X Associada Bcl-2
Bcl	Família de proteínas Bcl-2
Bcl-2	Leucemia/linfoma de células B 2
Bcl-XL	Bcl-2 Extra Longo
CA	Califórnia (EUA)
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório.
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal.
cm	Centímetros
cm²	Centímetros quadrados

CT26	Linhagem celular de carcinoma de cólon
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloreto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAE	Extrato Aquoso do Fruto de <i>Abelmoschus esculentus</i>
EPM	Erro Padrão da Média
EPO	Eritropoietina
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular (<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
Flt-1	Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>)
g	grama, unidade de massa.
G0/G1	Fases do ciclo celular
GLOBOCAN	Observatório Global do Câncer (<i>Global Cancer Observatory</i>)
h	hora, unidade de tempo.
H₂DCFH-DA	Diacetato diclorofluoresceína
HeLa	Linhagem celular de adenocarcinoma de colo de útero
HepG-2	Linhagem celular de câncer de fígado humano
HFLS-RA	Fibroblastos Sinoviais Humanos Semelhantes a Artrite Reumatoide
HIF	Fatores induzidos por hipóxia
HSP70	Proteína do choque térmico 70 kD
i.p.	Intraperitoneal

i.v.	Intravenoso
IARC	Agência internacional de Pesquisa sobre o câncer (<i>International Agency For Research On Cancer</i>)
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
ICT	Inibição do Crescimento Tumoral
IEV	Incremento na Expectativa de Vida
IL	Interleucinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ip	Intraperitoneal
IP	Iodeto de propídeo
iv	Intravenosa
JNK	Quinases N-terminais c-Jun
Jurkat	Linhagem celular de leucemia aguda de células T
L.	Linnaeus
LA	Laranja de Acridina
LA/IP	Laranja de Acridina / Iodeto de Propídeo
LBC	Laboratório de Biologia Celular
MAPK	Quinase Ativada por Mitógeno (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
mg/Kg	Miligramma por quilograma
mg/mL	Miligramma por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro

 mM	Milimolar
 MO	Medula óssea
 MT	Microambiente Tumoral
 mTOR	Alvo da Rapamicina em Mamíferos (<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>)
 NCI-N87	Linhagem celular de câncer gástrico
 NF-κB	Fator nuclear Kappa B
 NIH	(<i>National Institutes of Health</i>)
 nm	Nanômetro
 NT	Não tumoral
 OMS	Organização Mundial da Saúde
 P53	Gene supressor de tumor p53
 PAI-1	Ativador do plasminogênio-1
 PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
 PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
 PDGF-B	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
 pg/mL	Picograma por mililitro
 pH	Potencial Hidrogeniônico
 PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
 PKA	Proteína quinase A dependente de AMPc
 PNPIc	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
 PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
 RAM264.7	Linhagem celular de macrófagos
 rcf	Força centrífuga relativa

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Número de rotações por minuto
SBF	Soro Bovino Fetal (<i>Serum Bovine Fetal</i>)
SESCTICS	Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação e do Complexo Econômico-Industrial da Saúde
SisGen	Sistema de Cadastro e Gestão de Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado
Sod-1	Superóxido desmutase 1
SP	Sangue periférico
SUS	Sistema Único de Saúde
tEa	Tumor de Ehrlich ascítico
TEM	Transição Epitelial Mesenquimal
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante Beta (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TM	Tumoral
TMS	Tempo Médio de Sobrevida
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TNF-α	Tumoral necrosis factor alpha (<i>Fator de Necrose Tumoral alfa</i>)
TP53	Gene que codifica a proteína supressora de tumor p53.
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USA	Estados Unidos da América (<i>United States of America</i>)
v.i.	Via inalatória
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (<i>Vascular Endothelial</i>

Growth Factor)

VEGF-A	Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (isoforma do VEGF)
VEGFR	Receptor de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>)
VEGFR1-3	Receptores do Fator de Crescimento Endotelial Vascular 1 a 3
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>Organização Mundial da Saúde</i>)
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µmol/Kg	Micromols por quilograma

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Marca Registrada
°C	Grau Celsius, unidade de temperatura
α	Alpha
β	Beta
μ	Micro
M	Mol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Câncer.....	22
2.1.1	Microambiente tumoral.....	25
2.1.2	Mecanismos de evasão da apoptose.....	26
2.1.3	Estresse oxidativo e câncer.....	30
2.1.4	Angiogênese associada aos tumores.....	33
2.2	Carcinoma de Ehrlich.....	37
2.2.1	Padronização do carcinoma de Ehrlich ascítico.....	39
2.3	Tratamentos e produtos naturais como fonte de bioativos na farmacologia do câncer.....	41
2.4	Propriedades bioativas de <i>Abelmoschus esculentus</i>.....	44
3	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo geral.....	46
3.2	Objetivos específicos.....	46
4	METODOLOGIA.....	47
4.1	Reagentes e soluções.....	47
4.2	Obtenção do extrato.....	47
4.3	Solubilização do extrato.....	48
4.4	Animais.....	48
4.5	Manutenção da matriz tumoral doadora.....	48
4.6	Indução tumoral e grupos experimentais.....	49
4.7	Análise dos parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral.....	51
4.8	Análise morfológica das células do tumor de Ehrlich ascítico.....	52
4.9	Marcação fluorescente com laranja de acridina e iodeto de propídeo.....	53
4.10	Celularidade diferencial do tumor.....	53
4.11	Quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular....	53
4.12	Análise da angiogênese associada ao tumor.....	54
4.12.1	Quantificação da área dos vasos sanguíneos abdominais.....	54

4.12.2	Quantificação de VEGF.....	54
4.13	Efeitos sistêmicos.....	55
4.13.1	Ingestão de água e ração.....	55
4.13.2	Quantificação de leucócitos no sangue periférico.....	55
4.13.3	Celularidade da medula óssea.....	55
4.13.4	Análise histopatológica.....	56
4.13.5	Análise da celularidade dos órgãos linfoides.....	56
4.14	Analises estatísticas.....	57
5	RESULTADOS.....	58
5.1	O extrato do fruto de <i>Abelmoschus esculentus</i> atenua os parâmetros de medida do desenvolvimento tumoral no modelo de tEa.....	58
5.2	O EAE induz a morte celular e promove alterações morfológicas nas células tumorais.....	63
5.3	O EAE acentua a produção de EROs em células do tEa.....	64
5.4	O EAE reduz a área dos vasos no modelo de tumor de Ehrlich ascítico.....	65
5.5	O EAE promove um aumento no tempo de sobrevida de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico.....	68
5.6	O tratamento com EAE não promove toxicidade sistêmica em animais portadores do tEa.....	69
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÃO	84
8	PERSPECTIVAS.....	85
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXO 1 – Aprovação do CEUA.....	98
	ANEXO 2 – Produtos gerados a partir dos dados da dissertação.....	99

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa um grave problema de saúde pública, sendo atualmente a segunda maior causa de mortes no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares (WHO, 2020; Lin; Park, 2024). O aumento alarmante nas taxas de morbidade e mortalidade tem gerado uma crescente preocupação global (Schwartz, 2024). A estimativa é que entre os anos de 2022 a 2050 ocorram no mundo cerca de 35,3 milhões de novos casos (GLOBOCAN, 2024). Em 2020 as neoplasias malignas foram responsáveis pela morte de quase 10 milhões de pessoas no mundo e a estimativa é que em 2050 esse número dobre, o que destaca a importância do desenvolvimento de novas terapias e o aprimoramento das terapias já existentes para o tratamento dessas doenças (Sung *et al.*, 2020; Mullard, 2020; IARC, 2024).

O câncer é definido como um conjunto de doenças que têm em comum a proliferação de células de forma desordenada que perdem a capacidade de resposta aos sinais naturais de parada da divisão celular e se agrupam formando tumores classificados como malignos devido às características invasivas que apresentam (Hanahan; Weinberg, 2011). Essas células alteradas podem invadir tecidos adjacentes e migrar para outros órgãos, formando as metástases, dificultando ainda mais o tratamento (INCA, 2022). Além disso, as neoplasias malignas apresentam um microambiente próprio e altamente especializado composto, de forma geral, por células tumorais, componentes do estroma, células imunes recrutadas, componentes solúveis, além de uma intensa rede vascular que em conjunto sustentam a manutenção e o crescimento do tumor maligno (Feitosa *et al.*, 2021). Essas características fazem do câncer um conjunto de doenças complexas e de difícil tratamento (Hanahan, 2022).

Diante dessa complexidade, há uma busca constante por novas abordagens terapêuticas que possam atuar de maneira eficaz contra o câncer, minimizando os efeitos adversos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (ACS, 2016). Atualmente, as principais formas de tratamento contra o câncer incluem a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia, podendo a quimioterapia ser utilizada de forma isolada ou adjuvante aos outros tratamentos (Vanneman; Dranoff, 2012; Li *et al.*, 2022). Estima-se que cerca de 60% dos fármacos utilizados na quimioterapia do câncer são derivados ou inspirados em produtos naturais, o que estimula a

pesquisa por novas moléculas naturais com potencial terapêutico (Dutra *et al.*, 2016).

O quiabeiro da espécie *Abelmoschus esculentus* é um vegetal oriundo da África sendo amplamente cultivado em regiões tropicais e subtropicais (Deng *et al.*, 2022). Seu fruto, conhecido popularmente como quiabo, é consumido por diferentes populações no mundo devido às propriedades nutricionais e medicinais que apresentam (Zheng *et al.*, 2014; Gamal-Eldeen *et al.*, 2022). As atividades biológicas do quiabo incluem as ações antimicrobiana, gastroprotetora, antidiabética, antioxidante, cicatrizante, anti-inflamatória e imunoestimulante (Onakpa, 2013; Chen *et al.*, 2016; Islam, 2019; Ahmed *et al.*, 2021; Geng *et al.*, 2022; Siddique *et al.*, 2022; Sipahi *et al.*, 2022).

Estudos recentes demonstraram o potencial citotóxico *in vitro* de lectinas isoladas das sementes do quiabo contra células de câncer de mama e de glioblastoma (Monte *et al.*, 2013; Musthafa *et al.*, 2021). O extrato etanólico das flores de *Abelmoschus esculentus* também apresentou atividade citotóxica contra células de câncer colorretal humano além de atenuar o crescimento tumoral em modelo de xenoenxerto de câncer de colorretal em camundongos (Deng *et al.*, 2020). Além disso, o extrato sulfatado do quiabo apresentou atividade citotóxica no modelo de câncer hepático *in vivo* (Gamal-Eldeen *et al.*, 2022), ilustrando o potencial de substâncias isoladas de diferentes órgãos dessa espécie vegetal na terapia anticâncer.

Em 2022, Pramudya e colaboradores demonstraram o potencial do extrato etanólico isolado do quiabo em reduzir o espessamento epitelial das glândulas mamárias em ratas, entretanto o efeito antitumoral *in vivo* do extrato aquoso obtido do quiabo ainda não foi descrito. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito antitumoral do extrato aquoso obtido do fruto de *Abelmoschus esculentus* no modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico. Os resultados obtidos neste estudo são promissores e destacam o fortalecimento da fitoterapia aplicada ao tratamento das neoplasias malignas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O termo câncer refere-se a um conjunto de doenças que têm em comum a proliferação de células de forma desordenada e independente de fatores de crescimento, não respeitando os limites da fisiologia normal do tecido (Hanahan; Weinberg, 2011). Essas células alteradas possuem mutações genéticas que permitem a capacidade aumentada de migração e de invasão de tecidos adjacentes, sendo esses processos cruciais para a progressão da doença (Zanotelli; Zhang; Reinhart-King, 2021). A compreensão da biologia do câncer é um grande desafio no entendimento total da doença. Essa dificuldade se dá devido ao câncer ser um conjunto de neoplasias malignas altamente heterogêneas entre si, onde cada paciente com câncer torna-se portador de uma doença única, o que dificulta o desenvolvimento de terapias com alta efetividade em diferentes tipos de cânceres (ACS, 2016).

Em 2020, estimativas internacionais demonstraram que o câncer de mama foi o mais incidente entre as mulheres em 158 países, enquanto o câncer de colo de útero foi o mais comum em 23 países, especialmente em nações de baixa e média renda (Bray *et al.*, 2024). Entre os homens, o câncer de próstata liderou a incidência em 112 países, seguido pelo câncer de pulmão em 36 países (Ferlay *et al.*, 2022; Bray *et al.*, 2024). Esses dados destacam a disparidade global na ocorrência do câncer, refletindo não apenas os fatores de risco específicos das doenças, mas também as diferenças na infraestrutura de saúde, nas terapias disponíveis à população e nos programas de vigilância (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024).

Com os avanços científicos e tecnológicos nos estudos da biologia do câncer, pode-se compreender alguns dos processos de formação de uma célula tumoral até o estabelecimento de uma neoplasia maligna propriamente dita, definindo-se o processo de formação das neoplasias malignas como carcinogênese, possuindo 3 estágios: O primeiro estágio é a iniciação onde as células normais sofrem a ação de estímulos cancerígenos, podendo estes ser de origem química, física ou biológica (Peters; Gonzalez, 2018). Esses agentes promovem alterações nos genes de células ainda saudáveis que passam a ter o seu material genético alterado,

entretanto, essas células ainda são consideradas células normais mas iniciadas no processo de carcinogênese (INCA, 2022).

No segundo estágio, essas células iniciadas são expostas aos agentes oncopromotores, responsáveis pela transformação da célula iniciada em célula maligna (INCA, 2022). De forma geral, esse processo ocorre após um longo e continuado contato com o estímulo oncogênico. Nessa etapa, a depender dos danos ocasionados, caso haja a suspensão do agente agressor, o processo de carcinogênese pode ser interrompido (Peters; Gonzalez, 2018).

A última etapa é a progressão, onde essa célula maligna geneticamente alterada passa a proliferar de forma intensa e a não responder aos sinais de parada da proliferação celular, propagando as mutações às suas células filhas, podendo assim levar a formação de uma neoplasia maligna propriamente dita (INCA, 2022). Ainda nesse estágio, as células malignas podem sofrer a ação de agentes nomeados oncoaceleradores que são responsáveis em acelerar a carcinogênese e a promover a instabilidade genética presente nessas células, as quais podem adquirir ainda mais mutações que auxiliam no processo de estabilização e de progressão da doença (Hanahan; Weiberg, 2011; INCA, 2022).

Nos anos 2000, Hanahan e Weiberg propuseram seis características marcantes (*Hallmarks*) apresentadas por diferentes células cancerígenas que permitem a sua sobrevivência e a progressão no processo tumorigênico, dentre os quais incluem a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, a evasão da apoptose, o potencial replicativo ilimitado, a angiogênese sustentada, e a invasão de tecido e metástase (Hanahan; Weiberg, 2000). Os autores relataram que cada uma dessas alterações na fisiologia das células normais representa a capacidade de evasão de um mecanismo de defesa anticâncer do organismo (Hanahan; Weiberg, 2000). Em 2011, com os avanços nas pesquisas para o entendimento na biologia dos tumores, abrangendo agora os estudos para além das células malignas de forma isolada, os autores adicionaram a essa lista duas características facilitadoras ou habilitadoras para a progressão das neoplasias malignas: a instabilidade genômica e a inflamação promotora de tumor, e duas características emergentes: a reprogramação do metabolismo energético das células e a evasão do sistema imune (Hanahan; Weinberg, 2011). Em 2022, essas

características, nomeadamente emergentes passaram a fazer parte das características marcantes das células cancerígenas (Hanahan, 2022).

Além disso, outras quatro características importantes do câncer foram propostas por Hanahan em 2022, que incluem o desbloqueio da plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética não mutacional, os microbiomas polimórficos e as células senescentes (Hanahan, 2022). Assim, o conjunto de 14 características marcantes do câncer abrange marcas já consolidadas e em ascensão, ilustrando a complexidade das doenças neoplásicas e a importância do desenvolvimento científico na compreensão da biologia e das múltiplas facetas das neoplasias malignas (Figura 1).

Figura 1 – As características marcantes do câncer.

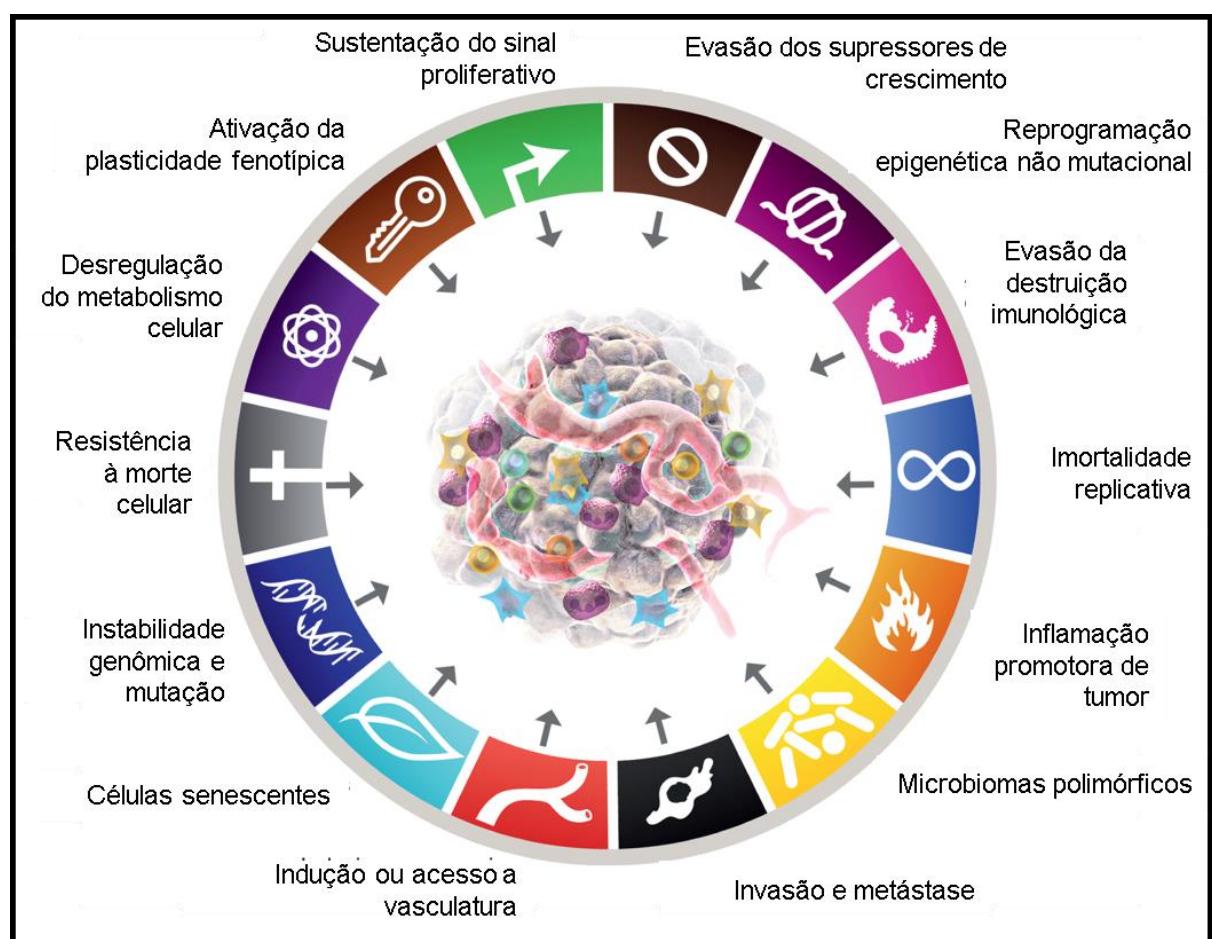


Imagen representativa das características marcantes, os “*Hallmarks*” do câncer. Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.

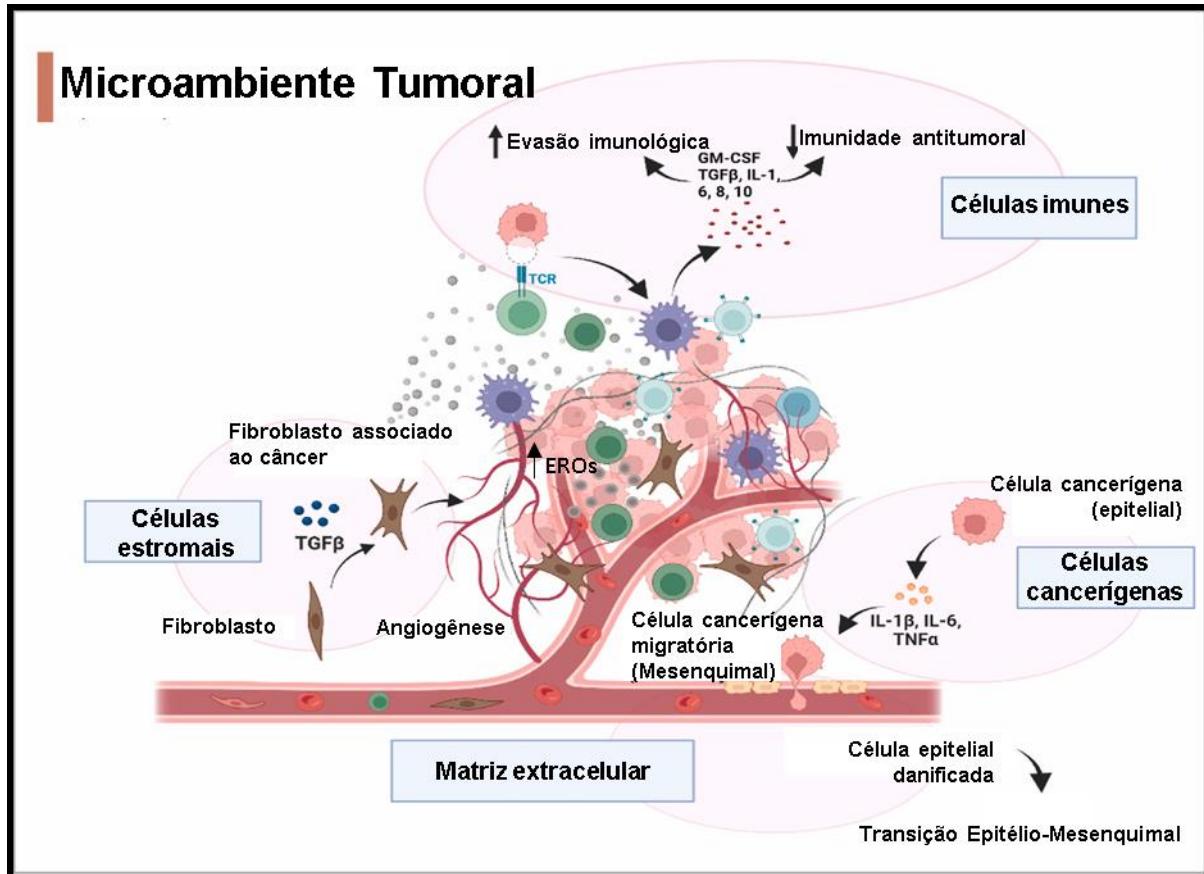
2.1.1 Microambiente tumoral

Com o entendimento do processo de carcinogênese, foi possível avançar nos estudos da biologia dos tumores onde, nas últimas décadas as doenças neoplásicas malignas deixaram de ser estudadas de forma isolada e passaram a ser compreendidas como parte de um ambiente que, juntamente com outros componentes locais e recrutados, possibilitam a formação e a manutenção do tumor maligno, nomeadamente microambiente tumoral (Langley; Fidler, 2011; Elia; Haigis, 2021; Feitosa *et al.*, 2021).

O microambiente tumoral é compreendido como um conjunto de elementos celulares e acelulares, que podem ser recrutados ou fazerem parte do estroma local, que são modulados pelas células tumorais e passam a exercer funções de forma e colaborar com a manutenção e a progressão da doença (De Visser; Joyce, 2023). Os componentes desse microambiente incluem populações heterogêneas e interativas de células cancerígenas e células-tronco cancerígenas, células estromais, células inflamatórias recrutadas, o parênquima transformado, fatores solúveis e matriz extracelular alterada que interagem mutuamente em um ambiente altamente imunomodulado (Visser; Joyce, 2023) (Figura 2, p. 26).

Esse ecossistema complexo com papel proeminente no desenvolvimento e na progressão da doença tem uma importante função na resistência ao tratamento (El-Tanani *et al.*, 2024). Sendo assim, compreender os diferentes tipos de microambiente de cada tumor passou a ser crucial para uma escolha mais assertiva do tratamento de forma direcionada para cada doença, podendo dessa forma, afetar positivamente no prognóstico da doença (El-Tanani *et al.*, 2024).

Figura 2 – Composição do microambiente tumoral.



Componentes do microambiente tumoral e as interações entre as células tumorais, estromais e imunes recrutadas. A modulação da resposta imune ao tumor bem como de processos que levam a progressão das neoplasias malignas como a transição epitelio-mesenquimal e a angiogênese podem ser reguladas a partir de fatores solúveis secretados por células imunes e células tumorais. Além disso, células do estroma local como os fibroblastos associados ao câncer pode desempenhar importante papel na progressão da doença. GM-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos; TGF- β : Fator de Crescimento Transformador Beta; IL-1 β : Interleucina 1 Beta; IL-6: Interleucina 6; TNF α : Fator de Necrose Tumoral Alpha; TCR: Receptor de Células T; EROS: Espécies reativas de oxigênio. Fonte: Adaptado de El-Tanani *et al.*, 2024.

2.1.2 Mecanismos de evasão da apoptose

As observações do desenvolvimento de células tumorais associam a carcinogênese à evolução darwiniana, onde de forma semelhante, as células tumorais adquirem alterações genéticas que às conferem vantagens evolutivas possibilitando a sobrevivência da célula tumoral alterada (Nowell, 1976). Dentre essas vantagens está a evasão da morte celular (Green, 2018).

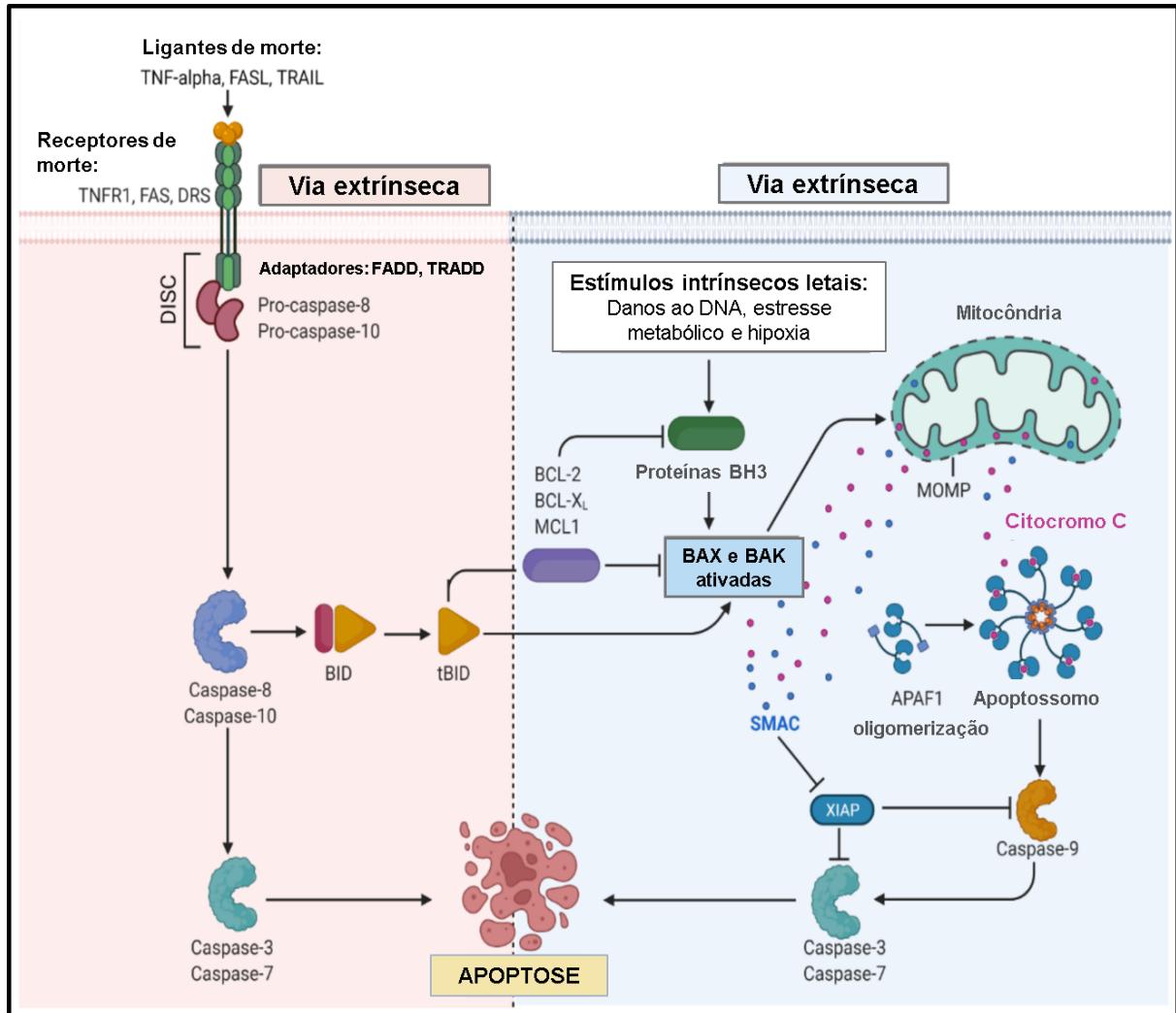
A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um processo fisiológico responsável pela manutenção da homeostase tecidual sendo uma das principais barreiras contra células alteradas e infectadas (Green, 2018).

Podendo ser desencadeada por diferentes estímulos, como agentes químicos, a radiação e a ação de hormônios, a apoptose é necessária durante o desenvolvimento embrionário, no envelhecimento e no controle da proliferação como mecanismo de defesa contra as respostas imunológicas e eliminação de células danificadas ao longo de toda a vida (Morana; Wood; Gregory, 2022). Assim, o mecanismo de apoptose é crucial para o controle do desenvolvimento de diferentes doenças, dentre elas o câncer.

A apoptose foi descrita pela primeira vez em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie nos estudos do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Fadeel; Orrenius, 2005), onde foi demonstrado que, das aproximadamente 1000 células geradas em adultos dessa espécie, 131 sofreram morte por apoptose durante a morfogênese (Elmore, 2007). Em 2002, o Prêmio Nobel de Medicina foi concedido a Sydney Brenner, Robert Horvitz e John Sulston, pela contribuição no campo da pesquisa em estudos sobre apoptose (The Nobel Prize, 2002). Os mecanismos de apoptose são frequentemente desregulados no câncer (Kashyap; Garg; Goel, 2022). Assim, explorar componentes apoptóticos subjacentes à sua expressão na carcinogênese pode ajudar a rastrear a progressão da doença (Gerl; Vaux, 2005; Morana; Wood; Gregory, 2022).

Os mecanismos moleculares da apoptose são bem caracterizados e envolvem a ativação de caspases por duas vias distintas; a via intrínseca, que é acionada por danos mitocondriais, e a via extrínseca, iniciada pela ativação de receptores de morte celular por ligantes específicos (Morana; Wood; Gregory, 2022). A ativação molecular intrínseca e extrínseca da morte celular programada é ilustrada na figura 3 (p. 28).

Figura 3 – Mecanismo molecular da apoptose.



A ativação molecular das vias intrínseca e extrínseca da morte celular programada ocorre de maneira interdependente, baseando-se em sinais específicos que iniciam cascatas de eventos moleculares dependentes de energia, culminando na ativação das caspases iniciadoras e, por fim, na caspase-3 executora. A via extrínseca é iniciada por estímulos externos, mediados por ligantes de morte celular, como TNF (fator de necrose tumoral), FASL (ligante associado ao antígeno FAS-7) e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF). Esses ligantes interagem com receptores de morte específicos localizados na membrana plasmática, como TNFR1 (receptor do fator de necrose tumoral) FAS e DRS (receptores de morte). A ativação desses receptores resulta na formação do DISC (complexo de sinalização indutor de morte), que recruta proteínas adaptadoras e a pró-caspase-8, levando à sua ativação. A caspase-8 ativada pode ativar diretamente a caspase-3 executora, iniciando o processo de apoptose e também pode ativar o BID (domínio de interação BH3) em tBID (BID truncada), integrando a via extrínseca à via intrínseca ao promover a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) por meio da ativação de BAX e BAK. Na via intrínseca, os sinais internos, como estresse celular, danos ao DNA ou alterações no retículo endoplasmático (ER), resultam na ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como BAX e BAK. Essas proteínas promovem a MOMP, liberando fatores apoptogênicos como o SMAC e o citocromo c, que interagem com o APAF (fator de ativação de protease apoptótica), culminando na ativação do apoptossomo e da caspase-9 iniciadora. Ambas as vias convergem na ativação da caspase-3 executora, que degrada substratos celulares e leva à morte celular programada. Durante esse processo, proteínas reguladoras como o BID que integra as vias intrínseca e extrínseca, MCL (proteína antiapoptótica) e XIAP (inibidor da apoptose) exercem papéis essenciais na modulação de eventos moleculares. Fonte: Adaptado de Wani *et al.*, 2023.

As células tumorais desenvolveram diferentes estratégias para evitar a apoptose, garantindo a sua sobrevivência e proteção. Uma das principais estratégias é a superexpressão de proteínas antiapoptóticas e a inibição de proteínas pró-apoptóticas. As células cancerígenas frequentemente aumentam a expressão de proteínas da família de Leucemia/linfoma de células B 2 (Bcl-2), como Bcl-2 e Bcl-2 Extra Longo (Bcl-XL), que bloqueiam a apoptose ao inibir a liberação do citocromo c das mitocôndrias, e inibem a ativação de proteínas como Bax e Bak impedindo, assim, a ativação da cascata de caspases e a morte celular programada. A redução ou a mutação dessas proteínas impedem que a célula siga esse caminho de morte celular (Bairey *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2014; Kashyap; Garg; Goel, 2022).

Outro mecanismo é a ativação de vias de sobrevivência celular, especialmente as vias da Fosfatidilinositol 3-quinase e Proteína Kinase B (PI3K/Akt) e das Quinase Ativada por Mitógeno e Quinase Regulada por Sinal Extracelular (MAPK/ERK) (Mishra *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2024). A via PI3K/Akt, em particular, pode inibir diretamente proteínas pró-apoptóticas além de ativar proteínas envolvidas na sobrevivência celular (Sun *et al.*, 2024). As células tumorais também podem diminuir a expressão ou a atividade das caspases, seja por inibição direta ou por mutações genéticas que afetam a sua função. Entre as alterações genéticas associadas, a mutação do gene *TP53* é uma das mais comuns. A p53, codificada por esse gene, é uma proteína supressora de tumor que induz a apoptose em resposta a danos ao DNA (Zhang *et al.*, 2020). Quando mutadas, as células tumorais perdem um importante sensor apoptótico, permitindo o acúmulo de mutações sem que a célula seja eliminada (Sun *et al.*, 2024).

O microambiente tumoral desempenha um papel protetor para as células neoplásicas, uma vez que células imunes associadas ao tumor secretam fatores de crescimento e citocinas que ativam vias de sobrevivência, inibindo a apoptose e promovendo a resistência tumoral (Jin; Jin, 2020). Outro mecanismo importante envolve a produção de enzimas antioxidantes que protegem as células contra danos oxidativos (Jelic *et al.*, 2021). Esses múltiplos mecanismos que as células tumorais utilizam para evadir da morte celular programada estão relacionados à resistência às terapias convencionais que visam a indução da apoptose para eliminar as células tumorais.

2.1.3 Estresse oxidativo e câncer

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas, subprodutos principalmente da transferência de elétrons mitocondrial das células e incluem principalmente o radical hidroxila, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio que interagem com outros constituintes celulares, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Juan *et al.*, 2021). Além do metabolismo mitocondrial, as fontes endógenas de espécies reativas incluem outras organelas como os peroxissomos e o retículo endoplasmático, muitas atividades enzimáticas, metabolismo de ácidos graxos e células fagocíticas (Martemucci *et al.*, 2022). Em altos níveis, as espécies reativas de oxigênio podem causar danos celulares podendo levar à morte celular oxidativa (An *et al.*, 2024). Como mecanismo de evasão da morte celular, as células tumorais evoluíram com um mecanismo antioxidante eficiente a fim de resistir aos altos níveis de EROs derivadas da sua alta taxa metabólica (Gorrini; Harris; Mak, 2013; Perillo *et al.*, 2020).

Enquanto as espécies reativas contribuem para a instabilidade genômica podendo funcionar ainda como moléculas sinalizadoras para promover a proliferação, a migração, a invasão, a angiogênese e a metástase celular, colaborando com a progressão da doença (Cheung; Vousden, 2022), o aumento de EROs acima do limite crítico pode induzir a danos celulares promovendo a morte das células tumorais, podendo esse mecanismo aumentar a sensibilidade das células aos quimioterápicos, e assim suprimir o desenvolvimento do tumor (Perillo *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2022). Além disso, as células tumorais têm intrinsecamente mais EROs em comparação com células normais. Com isso, a geração elevada de EROs torna as células cancerosas mais suscetíveis ao estresse de retículo endoplasmático, o que contribui para a ativação da apoptose (Bobrovnikova-Marjon *et al.*, 2010; Huang; Chen, 2013).

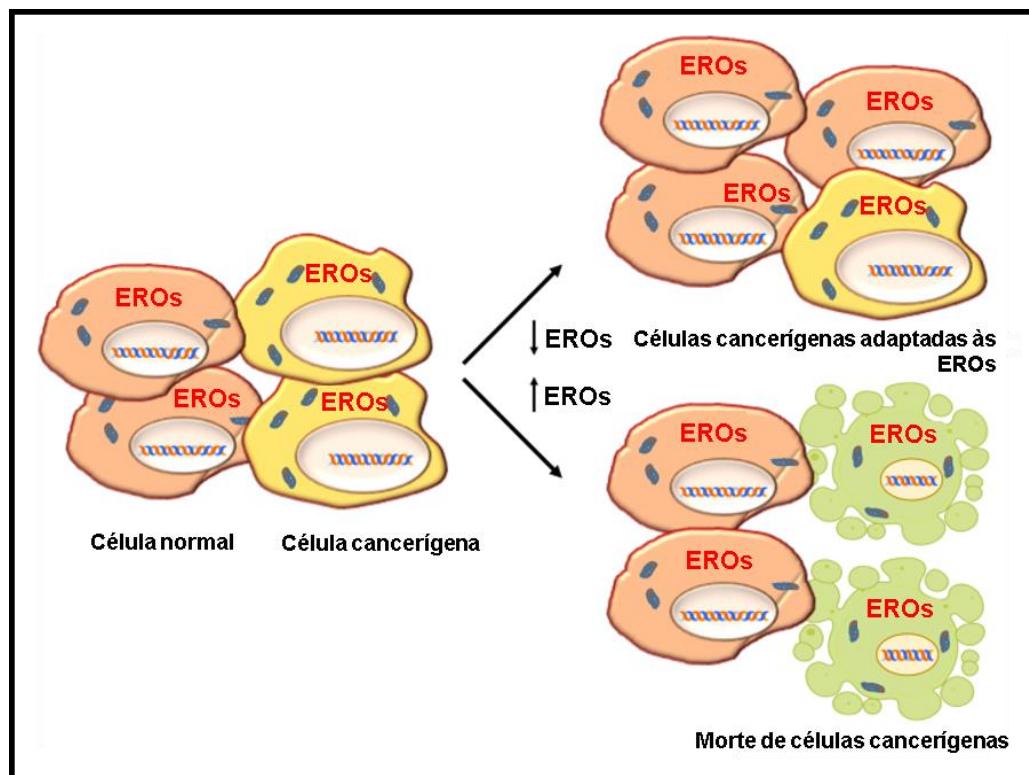
Dentre os danos celulares que culminam na morte da célula, os danos ao DNA induzidos pelas EROs levam a modulação da expressão gênica, modificações de bases, deleções, rearranjos cromossômicos, quebra de fita e hiper e hipometilação (Dizdaroglu; Jaruga, 2012; Martemucci *et al.*, 2022). Devido à baixa estabilidade e a falta de mecanismos de reparo ativo, o RNA é mais suscetível aos danos causados pelas EROs do que o DNA (Hofer *et al.*, 2005). Esse acúmulo de

alterações no material genético pode contribuir para a instabilidade genômica das células cancerosas, assim como iniciar mecanismos de reparo o que pode culminar na apoptose (Kim; Kim, 2018). Além disso, a oxidação de proteínas e lipídeos podem causar danos celulares importantes à membranas que resultem na morte celular (An *et al.*, 2024).

Na presença de danos celulares ocasionados por espécies reativas, ocorre a despolarização da membrana mitocondrial a partir da captação de cálcio elevando a geração de EROs (Kim; Kim, 2018). Proteínas pró-apoptóticas se inserem na membrana mitocondrial para aumentar a permeabilidade levando a liberação do citocromo c ativando assim a maquinaria apoptótica intrínseca (Kuwana *et al.*, 2005). Portanto, a facilitação do estresse oxidativo para iniciar a via da apoptose pode ser uma estratégia terapêutica para a atividade anticâncer.

Sendo assim, a modulação das espécies reativas no microambiente tumoral tem o potencial de ser utilizada como estratégia direcionada à eliminação das células cancerígenas (Figura 4).

Figura 4 – Possíveis estratégias terapêuticas anticâncer relacionadas às EROs.

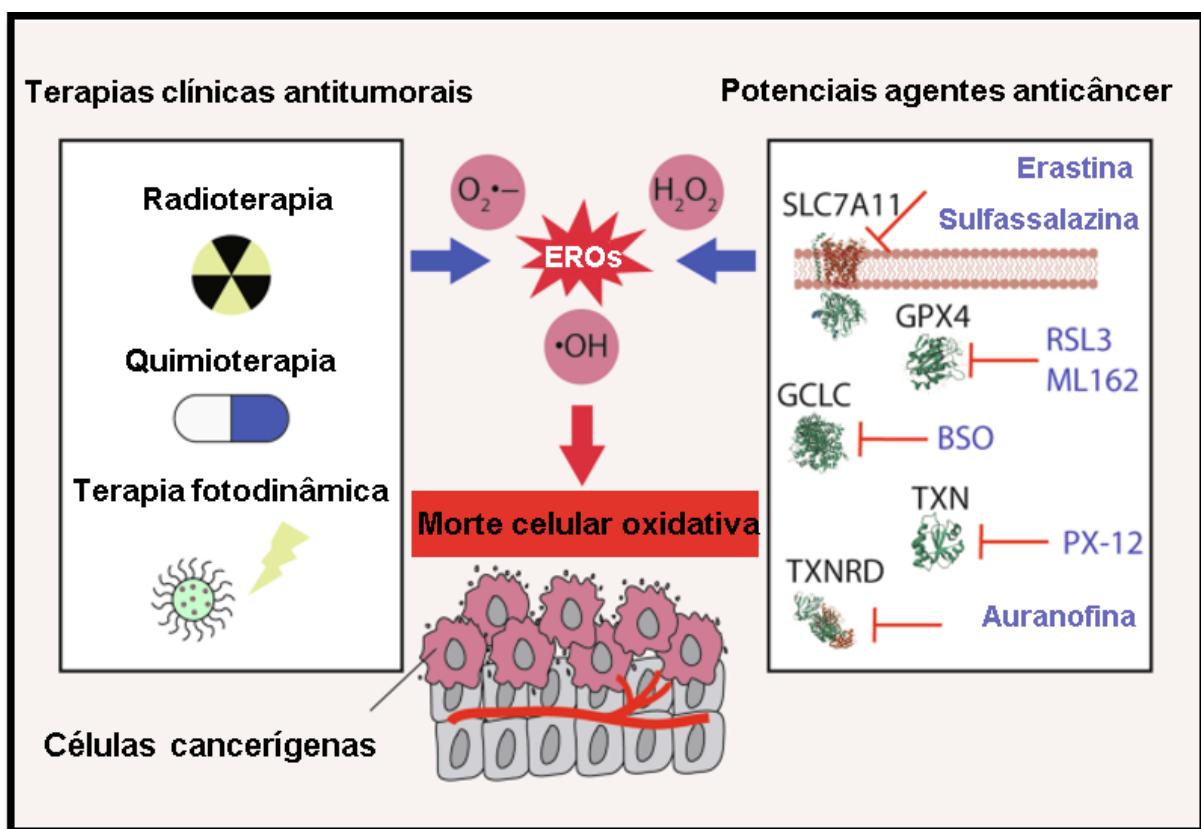


Estratégias terapêuticas que podem ser utilizadas no tratamento do câncer. A primeira estratégia envolve a redução nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) a fim de reduzir a proliferação celular. Já a segunda estratégia considera que as células tumorais adaptadas à altos níveis de EROs

não suportam um novo aumento significativo de espécies reativas levando a danos celulares irreversíveis promovendo a ativação da maquinaria apoptótica. Fonte: Adaptado de Perillo *et al.*, 2020.

Desta forma, tem crescido o número de estudos investigando o potencial de compostos capazes de modular o microambiente tumoral de forma a tornar o estresse oxidativo um agente de indução de danos às células neoplásicas, sendo um importante mecanismo de indução de morte celular oxidativa no câncer. Algumas substâncias com esse fim são ilustradas na figura 5.

Figura 5 – Estratégias de indução de morte celular oxidativa no câncer.



Terapias que visam a indução da morte celular oxidativa a partir da indução do aumento de EROS. Terapias convencionais como a radioterapia, a quimioterapia e a terapia fotodinâmica podem aumentar os níveis de EROS sendo eficazes na destruição celular. Além disso, alguns potenciais agentes anticâncer que visam componentes específicos do sistema antioxidante, como SLC7A11, GCLC, GPX4, TXN e TXNRD, têm o potencial de eliminar seletivamente células cancerígenas. EROS: Espécies Reativas de Oxigênio; O₂: superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; OH: radical hidroxila; SLC7A11: Transportador de Cistina-Glutamato; GPX4: Glutathione Peroxidase 4; GCLC: Glutathione-Cisteína Ligase Catalítica; BSO: Buthionine Sulfoximine; TXN: Tioredoxina; TXNRD: Tioredoxina Redutase. Fonte: Adaptado de An *et al.*, 2024.

2.1.4 Angiogênese associada aos tumores

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (Venkatakrishnan; Parvathi, 2022). É definida ainda como um processo fisiológico que ocorre na embriogênese e de forma transitória no processo de cicatrização de feridas (Viallard; Larrivée, 2017; Oršolić *et al.*, 2020), estando ainda envolvido na fisiopatologia de algumas condições patológicas como em inflamações crônicas associadas à asma, na artrite reumatoide, na retinopatia diabética, na aterosclerose e em doenças gastrointestinais, como a doença de Crohn e ainda nas neoplasias malignas (Khalid *et al.*, 2016). Esse mecanismo é um processo crítico no desenvolvimento do câncer, sendo ativado por oncogenes, fatores de crescimento e em resposta a hipóxia, e a sua prevenção pode limitar a disponibilidade de nutrientes e oxigênio para as células tumorais, resultando em um efeito antitumoral ainda mais pronunciado dos fármacos antitumorais (Garcia *et al.*, 2020).

Nos tumores sólidos de até 2 mm, o processo de obtenção de oxigênio e nutrientes pode ser realizado por difusão. Tumores que excedem esse milímetro geralmente ativam mecanismos vasculares, devido a exposição a um ambiente hipóxico, possibilitando a chegada desses compostos e auxiliando na progressão da tumorigênese (Wei *et al.*, 2021). Dentre os mecanismos vasculares utilizados pelas células cancerosas, o mimetismo vasculogênico é um mecanismo derivado da angiogênese tumoral em que células-tronco cancerosas se diferenciam em células endoteliais malignas, que em combinação com componentes estromais, formam estruturas vasculares que transportam nutrientes e eritrócitos para o tumor maligno (Sun *et al.*, 2016). Esse mecanismo secundário a angiogênese tumoral clássica reforça a importância dos mecanismos vasculares na progressão da doença.

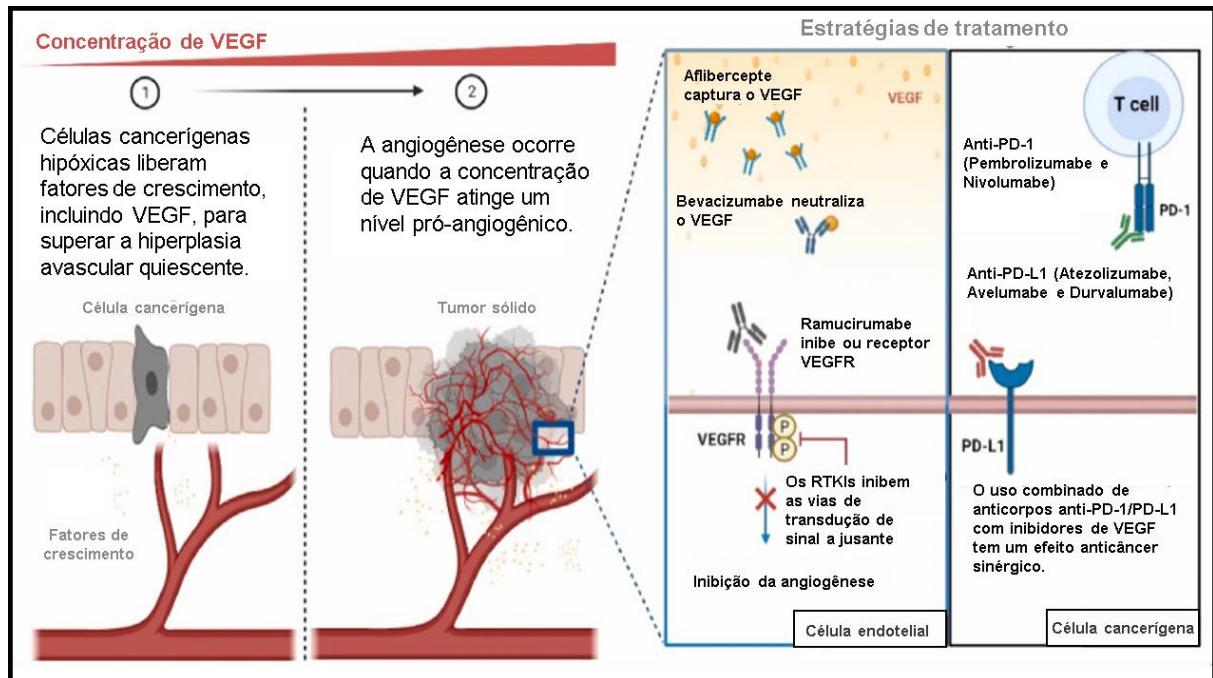
A formação de novos vasos sanguíneos se dá pela ativação de vias e de processos cruciais na formação e na progressão tumoral. Dentre esses processos, a hipóxia é um fator-chave responsável pela ativação de fatores induzidos por hipóxia (HIF) que quando ativados podem levar à transcrição de genes envolvidos na adaptação celular como na angiogênese, na proliferação e na sobrevivência (Semenza, 2001; Marin-Hernandez *et al.*, 2009). HIF-1 regula a expressão de fatores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento

transformador beta (TGF- β), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-B), o ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), a eritropoietina (EPO) e os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) importantes no processo de formação de novos vasos (Lugano; Ramachandran, 2020). Além disso, a sinalização de ERK e a proteína quinase A dependente de AMPc (PKA) estão relacionadas ao aumento da expressão de HIF-1 (Masoud; Li, 2015; Bullen *et al.*, 2016). Outras vias de sobrevivência reguladas na carcinogênese como a PI3K/Akt e das MAPK estão ainda relacionadas a angiogênese por aumentar os níveis de VEGF (Viallard, Larrivée, 2017).

Os VEGFs são uma classe de citocinas que são reguladores-chave da angiogênese a partir da ativação da sinalização do VEGF em células endoteliais ligando-se à tirosina quinases do receptor de VEGF (VEGFR1-3) (Ferrara; Gerber, 2003; Eulberg *et al.*, 2022). Por esses meios, o VEGF pode estimular a proliferação e a sobrevivência das células endoteliais e aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos, apoiando assim as demandas metabólicas do tumor em crescimento, além de possuir um importante papel na modulação e na imunossupressão induzida por tumores (Zhang *et al.*, 2024). Intervenções farmacológicas voltadas à redução desse processo podem promover alterações estruturais e funcionais do microambiente do tumor promovendo a redução da progressão tumoral (Garcia *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2022).

Com esta finalidade, o avastin (Bevacizumab) foi o primeiro inibidor para o controle da angiogênese aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA). O Bevacizumab é um anticorpo monoclonal utilizado para o tratamento de diferentes tipos de cânceres, e que tem como mecanismo de ação a inibição da ligação do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) ao seu receptor, limitando a mitose das células endoteliais (FDA, 2018; Garcia *et al.*, 2020). Algumas estratégias antiangiogênicas utilizadas na prática clínica são ilustradas na figura 6 (p. 35).

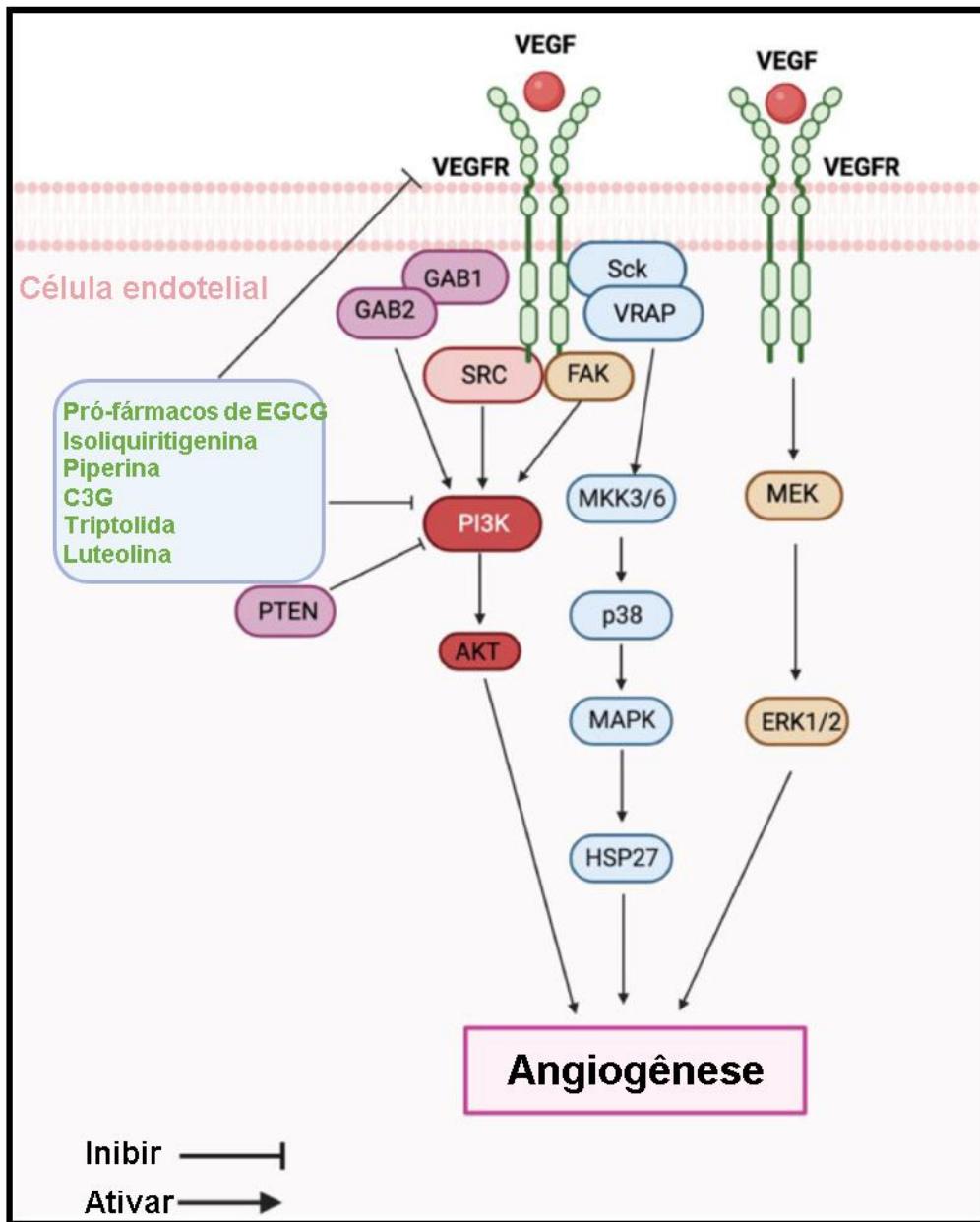
Figura 6 - Estratégias antiangiogênicas visando o VEGF e os seus receptores.



O aumento da concentração de VEGF no microambiente tumoral resulta na ramificação dos vasos sanguíneos pré-existentes. Diversas estratégias são empregadas para suprimir o crescimento das redes vasculares facilitadas pelas células tumorais. Nessa etapa, agentes específicos podem interagir diretamente com o receptor VEGF (como o Ramucirumabe), capturar VEGF livre (como o Aflibercepto), neutralizá-lo (como o Bevacizumabe) ou inibir as tirosina-quinases do receptor, com foco principalmente no receptor VEGF-2, impedindo sua fosforilação (como o Sorafenibe e o Sunitinibe). A terapia combinada com agentes anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (por exemplo, Pembrolizumabe-lenvatinibe ou Avelumabe-axitinibe) supera as limitações dos agentes anti-VEGF, vencendo o microambiente imunossupressor característico de tumores sólidos. Fonte: Adaptado de Ghalehbandi *et al.*, 2023.

Devido a importância da angiogênese no processo de manutenção e de progressão tumoral, os estudos sobre moléculas que tenham a função de atenuar esse processo são importantes formas de compreender e de modular o microambiente tumoral (Zhang *et al.*, 2024). Algumas substâncias isoladas de produtos naturais com a função de bloquear a ação do VEGF em células de câncer de mama são ilustrados na figura 7 (p. 36).

Figura 7 – Efeito antiangiogênico de produtos naturais em células de câncer de mama.



Os fatores de crescimento endotelial vascular são uma classe de citocinas produzidas por células tumorais que são ativados por oncogenes, fatores de crescimento e estímulos hipóxicos estando diretamente relacionados a angiogênese e na progressão do câncer. Pró-fármacos de EGCG, isoliquiritigenina, piperina e luteolina podem inibir diretamente os níveis de VEGFR e inibir as vias de sinalização PI3K e MAPK para afetar a angiogênese tumoral no câncer de mama. VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; VEGFR: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular; GAB1/2: Proteína Adaptadora de Grb2-Associada 1/2; SRC: Proto-oncogene Src; PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase; AKT: Proteína Quinase B; PTEN: Fosfatase e Homólogo de Tensina; ScK: Src Quinase; VRAP: Proteína associada ao VEGFR; FAK: Quinase de Adesão Focal; MKK3/6: Quinase de MAP 3/6; p38: Proteína Quinase p38; MAPK: Quinase de Proteína Ativada por Mitógenos; HSP27: Proteína de Choque Térmico 27; MEK: Quinase de MAP/ERK; ERK1/2: Quinase Regulada por sinal extracelular 1/2. Fonte: Adaptado de Zhang *et al.*, 2024.

2.2 Carcinoma de Ehrlich

Nos últimos anos, os avanços tecnológicos significativos nos estudos voltados para o desenvolvimento de potenciais fármacos proporcionaram o aprimoramento de metodologias e de equipamentos capazes de simular condições patológicas de maneira cada vez mais eficaz (Lo; Karlsson; Kuo, 2020; Honkala *et al.*, 2021). No entanto, em algumas doenças, como o câncer, o desenvolvimento de modelos experimentais que reproduzam de forma completa a complexa interação entre as células tumorais, o microambiente tumoral e o sistema biológico do hospedeiro ainda representa um grande desafio (Honkala *et al.*, 2021). Nesse contexto, os modelos animais tornam-se ferramentas indispensáveis, permitindo uma maior compreensão dos processos biológicos envolvidos na progressão tumoral e na resposta terapêutica, desempenhando um papel crucial na validação pré-clínica de eficácia e da segurança de candidatos a fármacos (Bahcecioglu *et al.*, 2020).

Dentre os diferentes modelos experimentais nas pesquisas voltadas ao desenvolvimento de potenciais fármacos antitumorais, o carcinoma de Ehrlich ascítico, juntamente com os modelos tumorais murinos Sarcoma 37 (S37), Sarcoma 180 (S180) e Walker 256, destacam-se como pioneiros nos estudos experimentais voltados à compreensão da biologia tumoral e na avaliação de terapias farmacológicas direcionadas ao câncer (Devita; Chu, 2008). O tumor de Ehrlich foi descrito pela primeira vez em 1896 pelo químico alemão Paul Ehrlich como um adenocarcinoma mamário de origem epitelial maligna que surgiu espontaneamente em camundongos (Dagli; Guerra; Saldiva, 1992; Matsuzaki *et al.*, 2006).

Esse modelo é caracterizado como um carcinoma indiferenciado, originalmente hiperdiploide, altamente maligno, sem regressão espontânea, de rápido crescimento e de comportamento agressivo, capaz de proliferar em quase todas as linhagens de camundongos (Nascimento *et al.*, 2006). Essa alta capacidade proliferativa em diferentes linhagens murinas deve-se, provavelmente, à ausência de抗ígenos específicos de transplante tumoral, o que o torna um modelo relevante para estudos oncológicos (Chen; Watkins, 1970; Ozaslan *et al.*, 2011; Feitosa *et al.*, 2021).

O tumor de Ehrlich pode se desenvolver em duas formas distintas: sólido, quando inoculado por via subcutânea ou intramuscular, e ascítico, quando as células

tumorais são introduzidas por via intraperitoneal (Dagli; Guerra; Saldiva, 1992). Essa resolução torna o modelo útil para a avaliação de diferentes apresentações tumorais (Radulski *et al.*, 2023). A forma ascítica do tumor de Ehrlich caracteriza-se por preencher a cavidade peritoneal com células malignas e fluido ascítico, desencadeando reações inflamatórias locais, principalmente devido ao aumento da permeabilidade vascular, o que favorece o crescimento tumoral (Haldar *et al.*, 2010). As células apresentam uma rápida proliferação, com pico de crescimento no 6º dia após a inoculação, apresentando células pleomórficas, anaplásicas, com alta razão núcleo-citoplasma, núcleo com cromatina frouxa e múltiplos nucléolos (Segura; Barbero; Márquez, 2000).

Altamente transplantável e de fácil manipulação, o carcinoma de Ehrlich ascítico tornou-se amplamente reconhecido por sua semelhança com tumores humanos, especialmente aqueles mais sensíveis à quimioterapia, devido à sua rápida taxa de crescimento (Ozaslan *et al.*, 2011). Assim, é amplamente utilizado para investigar a eficácia de compostos quimioterápicos e substâncias bioativas de origem natural ou sintética (Moyen *et al.*, 2024; Shiomi *et al.*, 2024; Haque *et al.*, 2024; El-Sayed *et al.*, 2024). Além disso, o modelo tem sido utilizado em estudos que envolvem a compreensão dos mecanismos biológicos, tumorigênicos, fisiopatológicos, bioquímicos, imunológicos e farmacológicos aplicados ao câncer, consolidando a sua relevância na oncologia experimental (Matsuzaki *et al.*, 2006; Feitosa *et al.*, 2021).

O desenvolvimento do tumor de Ehrlich é marcado por uma série de alterações complexas e interligadas no organismo do hospedeiro, refletindo a agressividade e a evolução do câncer no contexto experimental do modelo, comprometendo, assim, a homeostasia do organismo (Feitosa *et al.*, 2021). A formação da ascite tumoral associada a proliferação celular gera uma pressão intra-abdominal elevada, o que pode levar a dificuldades respiratórias e alterações no sistema circulatório dos animais (Radulski *et al.*, 2023). Além disso, o desenvolvimento e a progressão do tumor de Ehrlich podem causar alterações na função hepática, renal e cardíaca, devido ao aumento da carga metabólica e à liberação de substâncias inflamatórias (Feitosa *et al.*, 2021).

O tumor de Ehrlich ascítico provoca ainda alterações no sistema imune dos animais que podem ser observadas a partir do segundo dia após a inoculação das

células tumorais, com redução de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e aumento de células B e macrófagos esplênicos (Segura; Barbero; Márquez, 2000). No timo, os danos são observados mais tarde, marcado pela depleção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ circulantes (Mandal *et al.*, 2006). Embora a presença do tumor deflagre uma resposta imune, o microambiente tumoral imunossupressor do tumor facilita a evasão do sistema imunológico (Feitosa *et al.*, 2021).

O desenvolvimento do tumor de Ehrlich é marcado por um processo inflamatório sistêmico, com neutrofilia, aumento de macrófagos, trombocitopenia e esplenomegalia (Fecchio *et al.*, 1995; Segura; Barbero; Márquez, 2000). Os neutrófilos são células importantes no desenvolvimento do tumor de Ehrlich na sua forma ascítica sendo responsáveis por controlar o desenvolvimento do tumor em animais suscetíveis, e acentuar o desenvolvimento do tumor em camundongos que são resistentes ao desenvolvimento tumoral (Bergami-Santos; Barbuto, 2004).

A agressividade e a resistência das células de Ehrlich estão relacionadas à superexpressão da proteína de choque térmico 70 (HSP70) chaperona, que é responsável pela proliferação, pela invasão, pela metástase e pelo controle da morte celular (Abdin *et al.*, 2014). Assim, o tumor de Ehrlich é um modelo tumoral pré-clínico multifacetado com diferentes aplicabilidades nos estudos voltados à oncologia experimental.

2.2.1 Padronização do carcinoma de Ehrlich ascítico

Devido à importância do modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico na oncologia experimental, especialmente em testes pré-clínicos de potenciais agentes antitumorais, diversos ensaios podem ser explorados para a avaliação do efeito antitumoral. Além disso, há divergências quanto aos parâmetros iniciais que influenciam o desenvolvimento, a progressão e a resposta do tumor às substâncias testadas. Diante disso, a padronização do modelo de tumor de Ehrlich em sua forma ascítica foi realizada no Laboratório de Biologia Celular da UFAL, considerando diferentes fatores, como a idade dos animais, a quantidade do inóculo tumoral e o tempo de análise, utilizando distintas metodologias que permitem mensurar a atividade antitumoral de substâncias de origem natural ou sintética.

Os dados referentes à padronização do tumor de Ehrlich ascítico estão apresentados no meu Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas, na modalidade bacharelado - UFAL (Santos, 2023), e na tese de doutorado da doutora Tayhana Souza (Souza, 2022). A definição da quantidade de inóculo tumoral foi baseada em uma revisão da literatura e em testes preliminares realizados no LBC, nos quais se observou que o desenvolvimento tumoral pode ser controlado a partir do número de células inoculadas. Dessa forma, adotou-se o inóculo de 5×10^6 células para a indução tumoral.

Inicialmente, observou-se que a idade dos animais influenciou a progressão do tumor. Camundongos Swiss fêmeas mais velhos (14 a 20 semanas) mostraram-se mais suscetíveis ao desenvolvimento tumoral em comparação aos mais jovens (5 a 7 semanas). Com base nesses achados, determinou-se uma janela etária de 10 a 14 semanas para a indução tumoral, período no qual foram preservados o desenvolvimento, a progressão e a agressividade do tumor, levando-se em consideração também o bem-estar dos animais.

Após investigar a cinética da progressão tumoral, observou-se a formação do tumor a partir do 6º dia após a inoculação das células tumorais, com avaliação de parâmetros como ganho de peso associado ao tumor, medidas abdominais, volume ascítico, celularidade e acompanhamento macroscópico por imagens. Esses parâmetros foram mais evidentes nos dias 11, 16 e 21 após o inóculo, apresentando um aumento progressivo ao longo do período avaliado. Entretanto, ao analisar um importante marcador de progressão no microambiente tumoral, verificou-se que o quantitativo de espécies reativas de oxigênio intracelular permaneceu constante em células recuperadas da ascite tumoral. Diante disso, foi selecionado o tempo de 11 dias para a análise. Além disso, o tumor demonstrou resposta ao fármaco quimioterápico controle, 5-fluorouracil, após 5 dias de tratamento, estabelecendo, assim, os dias do protocolo experimental da seguinte forma: dia 1 – indução tumoral; dias 6 a 10 – tratamentos; e dia 11 – ponto final do protocolo experimental.

2.3 Tratamentos e produtos naturais como fonte de bioativos na farmacologia do câncer

Apesar de uma quantidade substancial de conhecimento acumulado sobre a epidemiologia da maioria dos tipos de cânceres, incluindo as suas causas, o tratamento eficaz de diversas dessas doenças ainda tem sido bastante estudado em diversas partes do mundo.

A cirurgia foi a primeira forma de tratamento dirigida a essas doenças, com registros que datam de cerca de 1600 a.C. (Breasted, 1930). Embora rudimentar, essa abordagem foi aprimorada ao longo dos séculos, formando uma base sólida para as práticas cirúrgicas atuais utilizadas no tratamento de diversas condições patológicas (Breasted, 1930; Wyld; Audisio; Poston, 2015). Com o tempo, outras terapias começaram a ser exploradas, como a radioterapia, que foi decisivamente fortalecida pela descoberta dos raios X por Marie Curie em 1898 (Devita; Chu, 2008).

Posteriormente, após a Segunda Guerra Mundial, a quimioterapia emergiu como uma importante adição ao arsenal terapêutico, com o advento de medicamentos como a mostarda nitrogenada, usada no tratamento de leucemias e linfomas (Goodman *et al.*, 1946; Devita; Chu, 2008; Falzone; Salomone; Libra, 2018).

O desenvolvimento da biologia molecular, nos anos seguintes, proporcionou uma compreensão mais aprofundada da biologia tumoral para além das células isoladas, o que levou ao surgimento das terapias direcionadas. Essas terapias, focadas em mecanismos imunológicos e alvos específicos nas células tumorais, ampliaram ainda mais as opções terapêuticas no tratamento do câncer (Bergholz *et al.*, 2020). Assim, o uso de abordagens combinadas, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapias-alvo, tornou-se uma estratégia comum para tratar diferentes tipos de cânceres.

A quimioterapia é a forma de tratamento mais utilizada em diversos tipos de cânceres devido a sua alta eficácia e pela possibilidade de combinações com outros tipos de tratamento (Sordo-Bahamonde *et al.*, 2023). Na década de 1940, o entendimento de que substâncias químicas poderiam interromper o crescimento das células cancerígenas melhorando a resposta dos pacientes com neoplasias metastáticas aos outros tipos de tratamento, abriu caminhos para o desenvolvimento de fármacos quimioterápicos que visam inibir a divisão celular e induzir a morte das

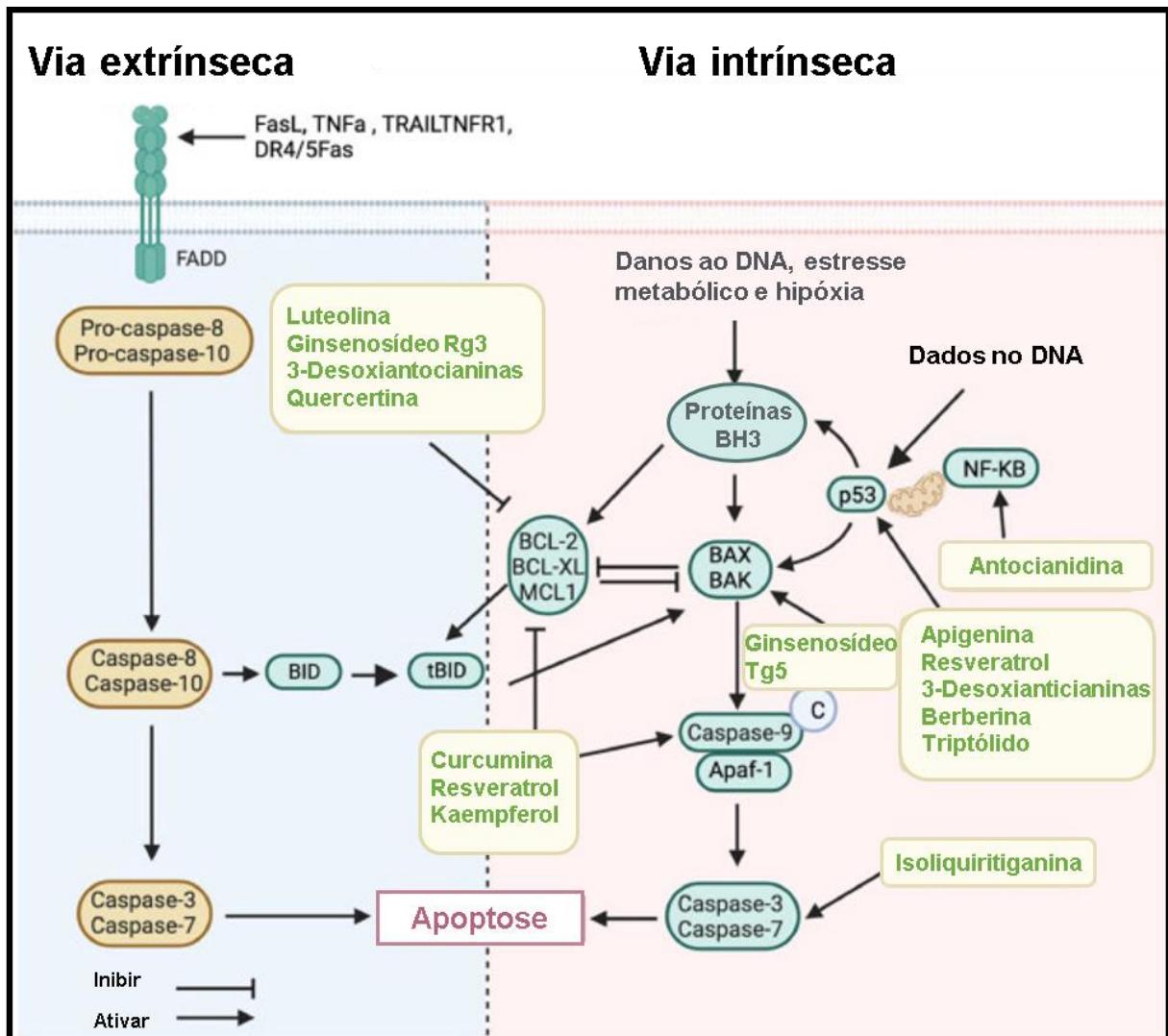
células malignas (Devita; Chu, 2008). Entretanto, apesar de sua eficácia, o principal entrave na quimioterapia são os graves efeitos adversos que estes medicamentos apresentam, como a mielossupressão e distúrbios nos sistemas cardiovascular, gastrointestinal e respiratório, sendo necessária a busca pelo desenvolvimento de fármacos cada vez mais específicos para as células tumorais (Karati; Kumar, 2023).

Os produtos de origem natural, caracterizados por sua diversidade estrutural, fontes abrangentes e múltiplas atividades biológicas, surgiram como uma alternativa na busca de moléculas bioativas no tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer (Newman; Cragg, 2020; Huang *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2024). O uso de produtos naturais, como plantas medicinais para o tratamento de doenças datam de tempos antigos, quando civilizações como a egípcia, a grega e a chinesa já utilizavam preparados de plantas para aliviar os sintomas e combater enfermidades (Farnsworth *et al.*, 1985). Com o avanço da ciência e da farmacologia, o interesse por essas substâncias se intensificou, levando à investigação de seus compostos bioativos, que podem atuar de maneira seletiva sobre células tumorais, oferecendo alternativas terapêuticas ao tratamento convencional (Newman; Cragg, 2020).

O desenvolvimento de fármacos anticâncer derivados ou inspirados em produtos naturais tem crescido nos últimos anos. Levantamentos recentes indicaram que, entre os anos de 1981 e 2019, apenas 15,7% do total de medicamentos anticâncer derivados de pequenas moléculas foram totalmente originados de fontes sintéticas, o que evidencia a notável contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos antitumorais (Newman; Cragg, 2020). Os diversos alvos envolvidos na resposta antitumoral de moléculas naturais podem estar relacionados ao crescente interesse nos estudos voltados para essa terapia.

Muitos produtos naturais exercem efeitos antitumorais por meio da regulação da mitose, levando à indução da morte celular (Steinmetz; Prota, 2018). Os medicamentos antimitóticos clássicos derivados de produtos naturais possuem uma ampla gama de usos clínicos. Exemplos desses fármacos incluem o Taxol, o Sulfato de Vimblastina, o Sulfato de Vincristina, o Sulfato de Vindesina e o Irinotecano, utilizados no tratamento de diferentes tipos de cânceres (Huang *et al.*, 2022). Alguns produtos naturais com potencial para induzir a morte celular programada em células de câncer de mama são ilustrados na figura 8 (p, 43). Os produtos naturais oferecem uma promessa substancial para o desenvolvimento de fármacos anticâncer.

Figura 8 – Produtos naturais com potencial em induzir a apoptose em células de câncer de mama.



Membros da família do fator de necrose tumoral (TNF) e receptores de ligante indutor de apoptose associado ao TNF (TRAIL) ativam receptores de morte para iniciar a via extrínseca da apoptose. A caspase-8 e a caspase-3 ativadas desencadeiam a fase executiva da apoptose. As proteínas da família do linfoma de células B 2 (Bcl-2) controlam a ativação de vias intrínsecas através das mitocôndrias, ativando a caspase-9 e apaf-1 e, finalmente, a caspase-3, levando à apoptose intrínseca. A curcumina, o resveratrol, a quercetina e o kaempferol inibem efetivamente as proteínas da família Bcl-2 e promovem a apoptose. A apigenina e a berberina promovem a apoptose ativando o p53. A isoliquiritigenina ativa diretamente a caspase-3 e promove a apoptose em células de câncer de mama. Fonte: Adaptado de Zhang et al., 2024.

2.4 Propriedades bioativas de *Abelmoschus esculentus*

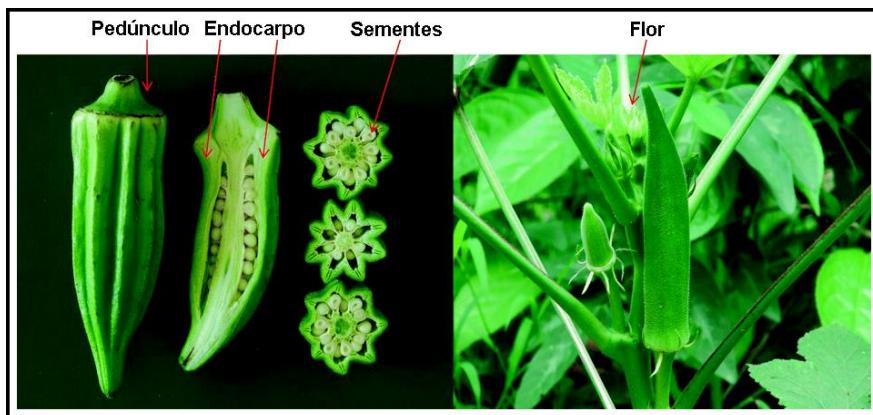
O consumo de componentes fitoquímicos de plantas pode desempenhar um papel essencial na prevenção e no tratamento de muitas doenças. A fitoterapia, prática milenar baseada no uso de plantas medicinais para tratar doenças, remonta

às civilizações antigas, como a egípcia, mesopotâmica, india e chinesa. Escritos antigos descrevem a categorização e o uso terapêutico de diferentes espécies vegetais que influenciaram a medicina ocidental (Petrovska, 2012; Heinrich *et al.*, 2023). Com o advento da química no século XIX, princípios ativos de planta puderam ser isolados e investigados, o que fortaleceu a base científica da fitoterapia (Cragg; Newman, 2005). A exemplo de substâncias isoladas de plantas com uso terapêutico até os dias atuais têm-se exemplos amplamente difundidos, como a morfina e a aspirina, que foram responsáveis por grandes avanços no tratamento de sintomas de diferentes doenças (Dutra *et al.*, 2016).

Atualmente, a fitoterapia integra os sistemas de saúde complementares, destacando-se por sua abordagem holística e pelo uso sustentável dos recursos naturais. No Brasil, o uso de produtos naturais com finalidades medicinais tem sido ampliado por meio da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que promove pesquisas e ações relacionadas às plantas medicinais e fitoterápicos. A Chamada Pública nº 5/2024 da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação e do Complexo Econômico-Industrial da Saúde (SESCTICS), reforça o objetivo de inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços vinculados à fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), assegurando segurança, eficácia e qualidade, em consonância com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS (Ministério da Saúde, 2024).

O *Abelmoschus esculentus* L. Moench, conhecido popularmente como quiabeiro, é uma espécie vegetal anual arbustiva pertencente à família Malvaceae amplamente cultivada em países com clima tropical e subtropical (Al-Shawi *et al.*, 2021). Originária da África, a espécie *Abelmoschus esculentus* é uma planta que atinge no máximo 5 pés de altura sendo uma dicotiledônea, possuindo flores amarelas hermafroditas e apresenta um alto valor econômico quando comparados às outras espécies do mesmo gênero (Al-Shawi *et al.*, 2021). É uma espécie comestível e seu fruto, conhecido como quiabo ou dedo-de-moça em diferentes países, é recoberto por tricomas e colhido 60-70 dias após o plantio (Fatima *et al.*, 2024), sendo amplamente utilizado na culinária em diferentes lugares do mundo (Islam, 2019) (Figura 9, p. 45).

Figura 9 – Imagens do fruto de *Abelmoschus esculentus*.



Fonte: Adaptado de Al-Shawi *et al.*, 2021.

Devido ao seu amplo valor nutricional por conter vitaminas, fibras, carboidratos, proteínas e minerais, o quiabo tem sido indicado como um alimento nutracêutico e para o tratamento de doenças (Mishra *et al.*, 2017; Elkhalfi *et al.*, 2021). Os compostos bioativos do quiabo possuem diferentes atividades biológicas descritas, como as ações anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante, antifúngica, imunomoduladora, gastroprotetora, antidiabética, hipolipemiante, neurofarmacológica e cicatrizante (Xia *et al.*, 2015; Islam, 2019; Al-Shawi *et al.*, 2021; Geng *et al.*, 2022; Kwok *et al.*, 2025).

Além disso, diferentes estudos relataram um potencial antitumoral *in vitro* de moléculas isoladas de diferentes partes dessa espécie vegetal contra linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB231), colorretal (CT26), câncer hepático (HepG2), câncer cervical humano (HeLa), leucemia de células T (Jurkat), glioblastoma (U84) e melanoma (B16F10) (Monte *et al.*, 2013; Monte *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2015; Chaemsawang *et al.*, 2019; Musthafa *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2020; Gamal-Eldeen *et al.*, 2022; Geng *et al.*, 2022; Kwok *et al.*, 2025).

Um estudo recente demonstrou o potencial antiproliferativo mediado por efeitos imunomodulatórios do extrato etanólico do fruto de *Abelmoschus esculentus* em modelo de câncer de mama sólido induzido em ratos por N-methyl-N-nitrosourea por reduzir a espessura da glândula mamária de ratas (Pramudva *et al.*, 2022). Em outro estudo, o extrato das flores do quiabo apresentou efeito antiproliferativo contra o modelo de xenoenxerto de tumor colorretal (CT26) induzido em camundongos (Deng *et al.*, 2020). Entretanto, o efeito antitumoral *in vivo* e seus efeitos associados do extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus* ainda é desconhecido.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antitumoral do extrato aquoso obtido a partir do fruto de *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench no modelo murino de tumor de Ehrlich ascítico (tEa).

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do extrato do fruto de *Abelmoschus esculentus* (EAE) sobre o ganho de peso, circunferência abdominal, volume tumoral e acompanhamento por imagens no modelo de tEa;
2. Avaliar o efeito do extrato de EAE na morfologia e morte celular no modelo de tEa;
3. Avaliar o efeito do extrato de EAE na produção de espécies reativas de oxigênio intracelular em células recuperadas da ascite tumoral;
4. Avaliar o efeito do extrato de EAE na angiogênese associada ao tEa;
5. Avaliar o efeito do extrato de EAE no tempo de sobrevivência de animais portadores do tEa;
6. Investigar os possíveis efeitos sistêmicos (análise histopatológica do fígado, rim, timo e baço, análise dos leucócitos circulantes e das células da medula óssea) do EAE em animais portadores do tEa.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes e soluções

O fármaco 5-fluorouracil (código 734940) foi adquirido da empresa Libbs. O isoflurano foi adquirido da BioChimico. A solução salina tamponada com fosfato (P4417-100) e a hematoxilina (código 90002670067) foram obtidas da RENYLAB. A eosina (E1007.01.AD) foi adquirida da LABSYNTH. O composto 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloreto conhecido como DAPI (D9542), o Entellan (1.07960.0500) e o corante Azul de Tripan (T8154) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (MO, EUA). O paraformaldeído (30525-89-4) foi obtido da Vetec. O iodeto de propídeo (P3566), a Laranja de acridina (A1301) e o soro bovino fetal foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O corante cristal violeta para a preparação da solução de Turk (código 3017) e a parafina (8012-95-1) foram adquiridos da Dinâmica Brasil. O xanol (x09738RA) foi obtido da Êxodo Scientific, a gentamicina da NovaFarma, e o Marcodine iodopovidona e o tiopental foram adquiridos da Cristália.

4.2 Obtenção do extrato

O extrato aquoso do fruto da espécie vegetal *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, conhecido popularmente como quiabo, foi preparado por pesquisadores colaboradores desta pesquisa no Laboratório Terras Raras do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O fruto do quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*) foi coletado no município de Campina Grande, estado da Paraíba, Brasil, em 10 de março de 2018, às 08:00 horas.

O cadastro do projeto de pesquisa relacionado à espécie vegetal foi realizado pelo prof. Dr. Severino Alves Júnior no Sistema de Cadastro e Gestão de Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

Para a obtenção do extrato aquoso do quiabo, 200 g do fruto inteiro, incluindo as sementes, foram cortados e submersos em água por um período de 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a filtragem do conteúdo total para a coleta do extrato solúvel. O extrato obtido foi mantido a -40 °C e liofilizado para a remoção da água a frio a fim de preservar as propriedades do extrato.

4.3 Solubilização do extrato

O extrato do quiabo (*Abelmoschus esculentus*) foi dissolvido em solução salina tamponada estéril (PBS, pH 7,0) de acordo com as concentrações avaliadas e imediatamente injetado nos animais via intraperitoneal.

4.4 Animais

Para este estudo, foram utilizados camundongos fêmeas (*Mus musculus*) da linhagem Swiss de 10-14 semanas de idade e pesando 25 ± 10 g. Os animais foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB - Campinas, SP) com aproximadamente 4 semanas de idade e mantidos no biotério setorial do Laboratório de Biologia Celular (LBC) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) para ambientação.

Os camundongos foram mantidos em grupos de 5 animais por gaiola fabricada de polipropileno leitoso com dimensões de 45 x 60 x 25 cm (Largura x Comprimento x Altura) e teto de aramado inoxidável, em gabinetes ventilados com exaustão filtrada de ar e condições controladas de luminosidade (ciclo claro-escuro de 12-12 horas), temperatura (20 ± 2 °C) e umidade (40 - 60%). Os animais foram mantidos com alimentação e água *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais deste estudo estavam em conformidade com as diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In vivo Experiments*) sendo aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UFAL (CEUA nº 20/2019 - ANEXO 1).

4.5 Manutenção da matriz tumoral doadora

As células do tumor de Ehrlich foram gentilmente cedidas pela profa. Dra. 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 por 11 dias a partir da inoculação das células, sendo realizado o transplante

tumoral após esse período. Para isso, o animal doador matriz do tumor de Ehrlich foi morto por superdosagem de anestésico tiopental (200 mg/kg, i.v.). Após a antisepsia da região abdominal do animal com álcool 70% e álcool iodado, o peritônio foi exposto para a punção da ascite tumoral. As células obtidas foram avaliadas quanto à viabilidade pelo método de exclusão com o corante azul de Tripan (Strober, 2015). 5×10^6 de células obtidas do lavado peritoneal foram suspensas em 0,5 mL de solução salina-fosfato estéril (PBS, pH 7,0) contendo antibiótico (gentamicina 40 µg/mL) e o sobrenadante tumoral obtido por centrifugação de parte da ascite tumoral.

A solução foi inoculada intraperitonealmente (i.p.) acima da mama superior esquerda do animal receptor saudável após a antisepsia local. A indução tumoral, a manutenção, o monitoramento do desenvolvimento tumoral e o esquema de tratamento foram realizados de acordo com o protocolo de padronização do tumor de Ehrlich ascítico estabelecido na UFAL (Santos, 2023).

4.6 Indução tumoral e grupos experimentais

As células de um animal da matriz doadora do tumor de Ehrlich ascítico no 11º dia de indução tumoral foram utilizadas para a indução do tumor nos animais experimentais. O dia da indução tumoral foi considerado o dia 1 do protocolo experimental.

25 camundongos foram distribuídos de forma randomizada em 5 grupos (5 animais por grupo). Após ambientados, os animais foram inoculados (i.p.) com 5×10^6 de células do tumor de Ehrlich e mantidos por 5 dias. No 6º dia do tumor, os animais foram tratados por 5 dias consecutivos de acordo com os tratamentos descritos (tabela 1, p. 50). O delineamento experimental foi ilustrado na figura 10 (p. 50). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1 - Grupos experimentais e tratamentos.

Grupo	Descrição
Controle não tumoral (NT)	Animais saudáveis tratados com PBS estéril (0,1 mL/Kg, i.p)
Controle tumoral (TM)	Animais tumorizados tratados com PBS estéril (0,1 mL/Kg, i.p.)
Controle quimioterápico (5-FU)	Animais tumorizados tratados com 5-fluorouracil (25 mg/Kg, i.p.)
Extrato aquoso de <i>Abelmoschus esculentus</i> (EAE 25)	Animais tumorizados tratados com EAE (25 mg/Kg, i.p.)
Extrato aquoso de <i>Abelmoschus esculentus</i> (EAE 100)	Animais tumorizados tratados com EAE (100 mg/Kg, i.p.)

Os grupos experimentais foram formados por camundongos Swiss fêmeas (5 animais por grupo em cada experimento) que foram inoculados ou não com as células do tEa e tratados por 5 dias consecutivos de acordo com o tratamento descrito.

Figura 10 – Delineamento experimental.

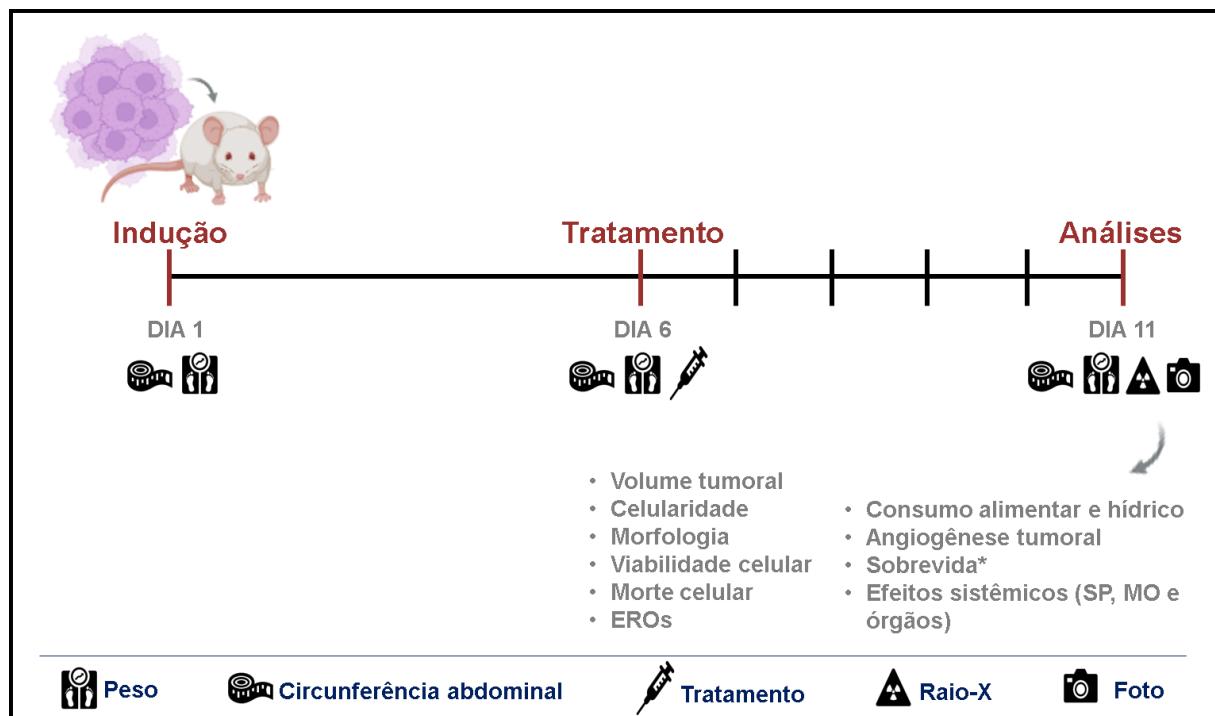


Imagen representativa do protocolo experimental realizado para o acompanhamento do desenvolvimento do tumor e avaliação do efeito antitumoral do extrato de *Abelmoschus esculentus*. SP (sangue periférico), MO (medula óssea) e EROs (espécies reativas de oxigênio). Imagen criada na plataforma BioRender.com.

4.7 Análise dos parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral

Para o acompanhamento do crescimento tumoral, nos dias 1, 6 e 11 do protocolo experimental, foram monitorados o ganho de peso e a circunferência abdominal dos animais verificada utilizando uma fita métrica. Foi realizada a captura de imagens fotográficas e de raio-X utilizando o Sistema de Imageamento In-Vivo MS FX PRO – Bruker. A partir das imagens de raio-X foi realizada a quantificação da área peritoneal dos animais (Figura 11).

Figura 11 – Esquema de quantificação da área peritoneal a partir de imagens de raio-X de camundongos portadores do tEa.

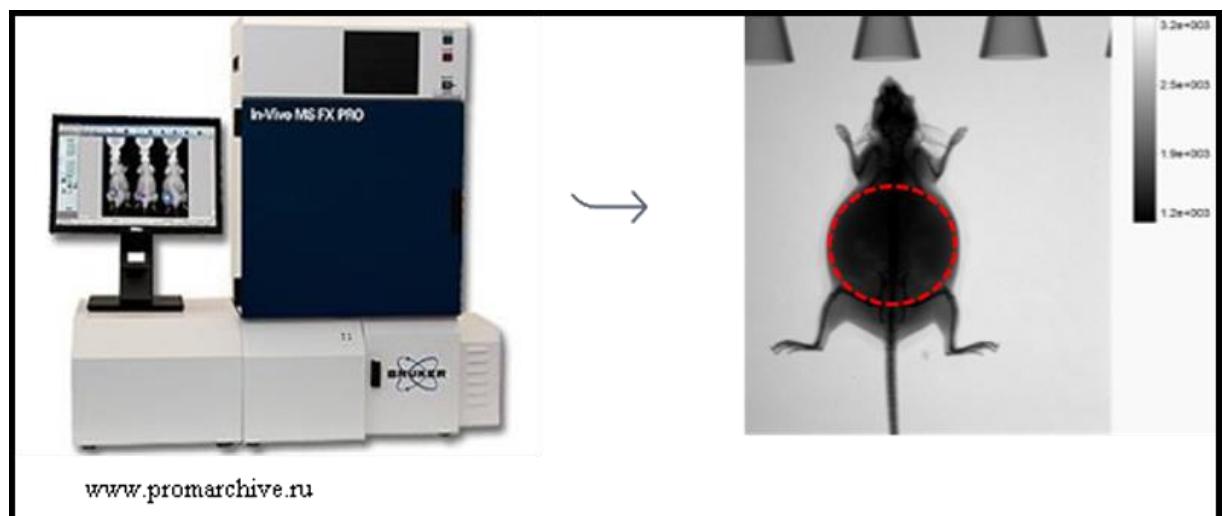


Imagen representativa da captura de imagem radiográfica no Sistema de imageamento In-Vivo MS FX PRO – Bruker. A quantificação da área peritoneal foi realizada utilizando o software Image J. Fonte: Santos, 2023.

No 11º dia, após a morte dos animais, a ascite tumoral foi coletada para a quantificação do volume e peso do conteúdo ascítico, e do quantitativo de células totais, tumorais e células mortas presentes no tumor utilizando o corante azul de Tripan. A taxa de inibição do crescimento tumoral (ICT) foi calculada a partir da contagem de células tumorais presentes no tumor (Morsi *et al.*, 2022) utilizando a equação:

$$ICT = [(média de células tumorais do grupo controle - média de células tumorais do grupo tratado) / média de células tumorais do grupo controle] \times 100$$

O percentual do ganho de peso e da circunferência abdominal no dia 11 foi

determinado em relação ao mesmo animal no dia 1 do protocolo experimental de acordo com a equação:

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

Para avaliar a sobrevida de animais portadores do tumor tratados com o EAE, em um outro conjunto experimental, os animais foram induzidos com o tumor (7 animais por grupo), tratados e avaliados diariamente quanto ao tempo médio de sobrevivência e ao incremento na expectativa de vida (Nicol, Prasad, 2006). A análise de sobrevivência foi realizada a partir do monitoramento diário dos óbitos não induzidos após o 11º dia do protocolo experimental.

O Tempo médio de sobrevida (TMS) foi calculado de acordo com a equação:

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

A taxa de incremento de expectativa de vida (IEV) foi calculada de acordo com a equação:

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

Onde T se refere ao TMS dos animais tratados e C representa o TMS dos animais do grupo controle.

4.8 Análise morfológica das células do tumor de Ehrlich ascítico

Para analisar a morfologia das células do tEa, as células coletadas da ascite tumoral foram citocentrífugadas (1500 rpm por 5 minutos) (Centrífuga CTT-2000 - Cienttece) e coradas com o kit de coloração Panótico Rápido. As fotomicrografias foram registradas no microscópio óptico (Olympus IX70) para a análise da morfologia celular. Como análise morfométrica, a área nuclear das células tumorais foi delimitada e quantificada utilizando o software Image J do *National Institutes of Health* (NIH, EUA).

Para a análise da morfologia nuclear, as células citocentrífugadas foram fixadas em paraformaldeído 4% e marcadas com o corante fluorescente DAPI (10 µg/mL) (Lingaraju *et al.*, 2018). As células foram fotografadas no microscópio

invertido de fluorescência (Nikon Eclipse 50i).

4.9 Marcação fluorescente com laranja de acridina e iodeto de propídeo

A análise de morte celular foi realizada utilizando a dupla coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) (Bank, 1988; Tang *et al.*, 2021). Laranja de acridina é um corante catiônico fluorescente que penetra tanto em células vivas quanto em células mortas, intercalando-se no DNA e corando o núcleo de verde. Já o iodeto de propídeo também se intercala no DNA, mas apenas de células que perderam a integridade da membrana, corando o núcleo de laranja ou vermelho (Dutta *et al.*, 2019).

As células coletadas de ascite tumoral (1×10^5) foram suspensas em uma solução contendo 5 µg/mL de LA e 5 µg/mL de IP por 2 minutos e montadas em lâminas. As imagens foram capturadas em um microscópio invertido de fluorescência. 100 células por lâmina foram avaliadas quanto a sua viabilidade. Células coradas em verde foram consideradas viáveis, enquanto que células coradas em laranja ou vermelho consideradas não viáveis (Dutta *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2021). O percentual de células mortas foi calculado seguindo a equação:

$$\text{Percentual de células tumorais mortas} = (\text{nº de células mortas do grupo tratado} / \text{nº de células mortas do grupo controle}) \times 100$$

4.10 Celularidade diferencial do tumor

O perfil de células imunes intratumorais foi avaliado utilizando fotomicrografias das células coradas com o corante Panótico Rápido. As células foram diferenciadas de acordo com a morfologia padrão dos leucócitos como neutrófilos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos e basófilos, contabilizando-se 100 células por lâmina. O cálculo do número diferencial de leucócitos presentes no tumor foi realizado considerando o número total de leucócitos contabilizados utilizando o corante Turk.

4.11 Quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular

Para mensurar a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular, foi utilizado o 2',7'- diacetato diclorofluoresceína (H₂DCFH-DA) (Kalyanaraman *et al.*,

2012). 1×10^6 de células por animal foram expostas ao H₂DCFH-DA a 5 μM por 15 minutos protegidas da Luz. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto IITM (BD Biosciences) adquirindo-se 20.000 eventos/amostra. Os dados foram apresentados como percentual de células marcadas.

4.12 Análise da angiogênese associada ao tumor

4.12.1 Quantificação da área dos vasos sanguíneos abdominais

A pele abdominal da região peritoneal dos animais foi coletada e disposta em lâmina (Figura 12) para a aquisição de imagens no microscópio óptico acoplado à câmera digital (Olympus IX 70). Foi realizada a captura aleatória de 10 fotomicrografias por lâmina. A área dos vasos sanguíneos foi mensurada utilizando o software Image J do *National Institutes of Health* (NIH, EUA) (Adaptado de Agrawal *et al.*, 2011).

Figura 12 – Visualização dos vasos sanguíneos da região abdominal.

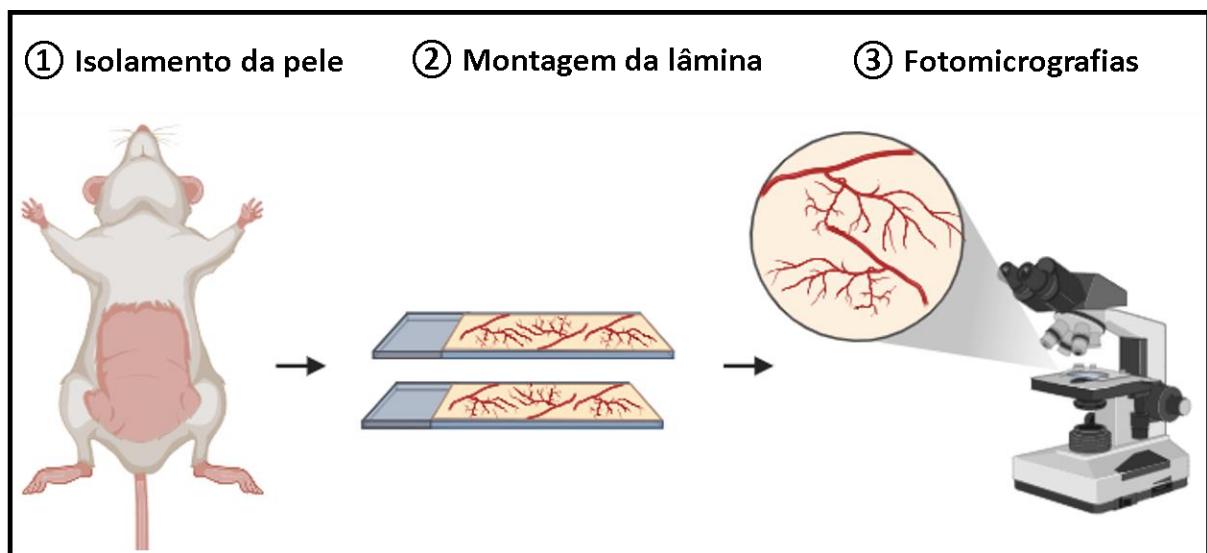


Ilustração do procedimento de isolamento da pele da região abdominal, destacando a visualização dos vasos sanguíneos. Imagem criada na plataforma BioRender.com.

4.12.2 Quantificação de VEGF

Os níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) presente no sobrenadante tumoral foi quantificado pelo ensaio imunoenzimático ELISA (Enzime-

Linked Immunoassay) seguindo as instruções do fabricante (PreproTech, ELISA). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Tecan Infinite 200 PRO-RChisto) e os resultados expressos em pg/mL de citocina.

4.13 Efeitos sistêmicos

4.13.1 Ingestão de água e ração

Para o monitoramento do consumo de água e ração, os animais foram alojados individualmente em gaiolas. A ração foi pesada utilizando uma balança analítica nos dias 1 e 11 do protocolo experimental, enquanto o consumo de água, em mililitros, foi mensurado utilizando uma proveta nos mesmos dias.

4.13.2 Quantificação de leucócitos no sangue periférico

Para a quantificação dos leucócitos da circulação periférica, foi realizada a coleta de 5 µL de sangue após um pequeno corte na ponta da cauda dos animais nos dias 1, 6 e 11 do protocolo experimental. A contagem dos leucócitos foi realizada utilizando o corante Turk.

Para a contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico, foram utilizados 5 µL de sangue por animal para a confecção de esfregaços sanguíneos em lâminas, que posteriormente foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa. Foram contabilizados 100 leucócitos por lâmina e diferenciados de acordo com a morfologia padrão.

4.13.3 Celularidade da medula óssea

Para avaliar o quantitativo de células da medula óssea (MO), o osso fêmur direito dos animais foi dissecado e uma abertura nas epífises distal e proximal foi realizada com o auxílio de uma agulha. Em seguida, o osso fêmur foi posto em tubos e centrifugado (10.000 rcf por 1 minuto) como ilustrado na figura 13 (p. 56). A medula óssea isolada foi suspensa em PBS a 4% de SBF e as células contadas na câmara de Neubauer utilizando o corante Turk.

Figura 13 – Isolamento de células da medula óssea.

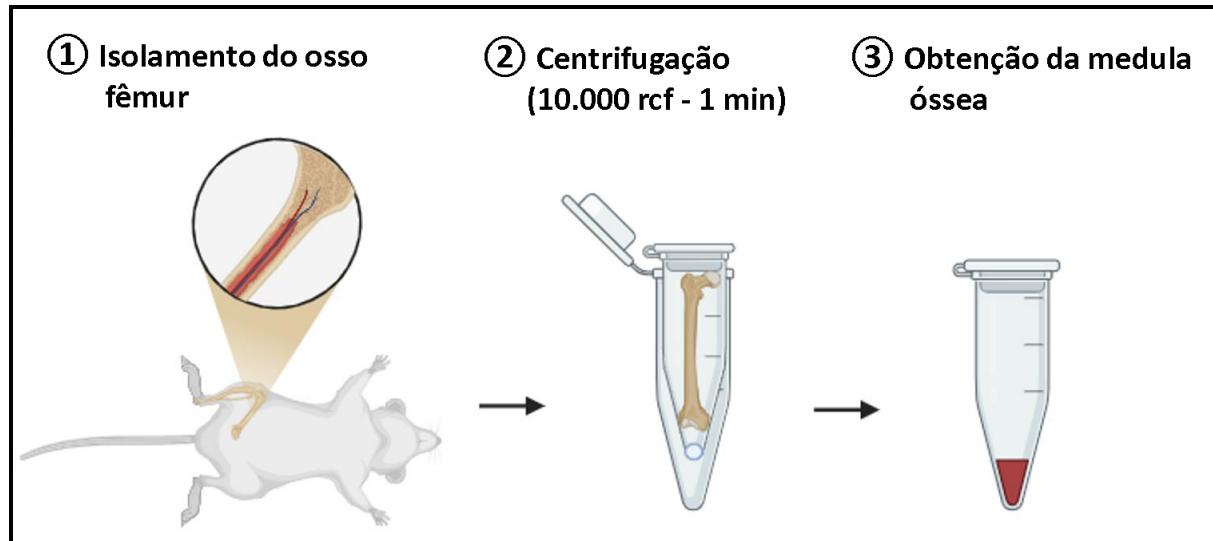


Imagen ilustrativa do isolamento de células da medula óssea. Imagem criada na plataforma BioRender.com.

4.13.4 Análise histopatológica

Após dissecados, o fígado, o rim, o timo e o baço dos animais foram fotografados e pesados utilizando uma balança analítica. Os órgãos foram fixados em formalina tamponada a 10%, processados e emblocados em parafina para secção em micrótomo (5 μ m) e processados histologicamente para coloração padrão com Hematoxilina e Eosina (Guo *et al.*, 2024). A análise histopatológica foi realizada a partir de fotomicrografias capturadas no microscópio óptico (Olympus IX70).

4.13.5 Análise da celularidade dos órgãos linfoides

Para a análise dos possíveis efeitos do EAE nos órgãos linfoides, em outro conjunto experimental, o timo e o baço dos animais foram dissecados, macerados em PBS a 4% de SBF e contabilizados na câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Tripan. Os macerados de esplenócitos foram submetidos ao protocolo com ACK durante 10 minutos para a lise das hemárias seguida de centrifugação e suspensão das células para a contagem (Crawford, Pilling, Gomer, 2010).

4.14 Análises estatísticas

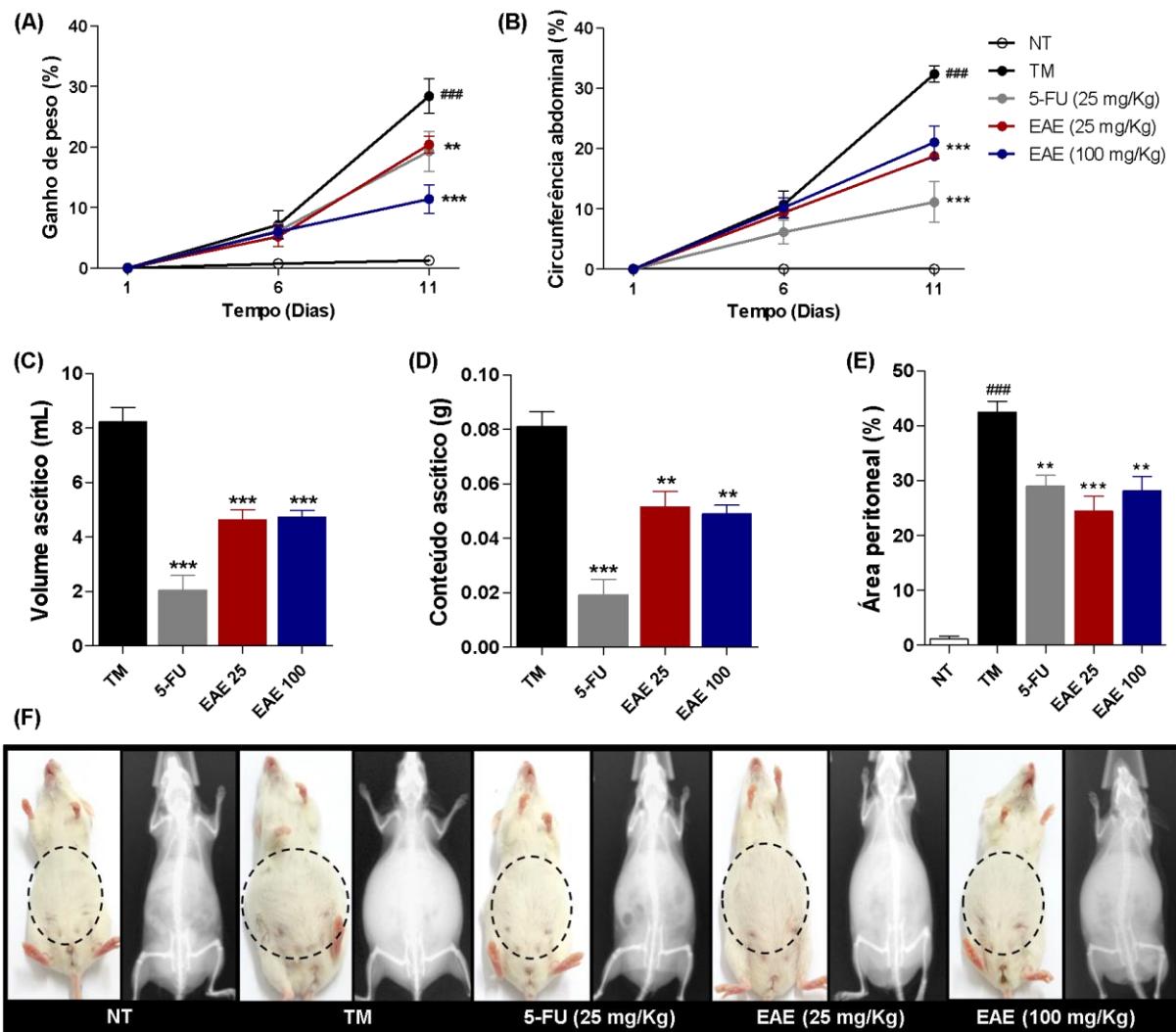
As análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 O extrato aquoso obtido do fruto de *Abelmoschus esculentus* atenua os parâmetros de medida do desenvolvimento tumoral no modelo de tEa

Os resultados demonstram que, em comparação aos animais saudáveis, os animais tumorizados apresentaram um aumento significativo dos parâmetros de desenvolvimento tumoral avaliados neste trabalho, com aumento no ganho de peso, da circunferência abdominal e da área peritoneal dos animais (Figura 14, p. 59). Os resultados indicam que o extrato do quiabo, em ambas as doses avaliadas, foi capaz de reduzir de forma significativa os parâmetros de desenvolvimento tumoral avaliados, com redução de 8% e 17% do ganho de peso associado ao desenvolvimento tumoral, e 14% e 11% da circunferência abdominal dos animais tratados com EAE 25 e 100 mg/Kg, respectivamente (Figura 14 A e B, p. 59). O tratamento com EAE reduziu a formação da ascite tumoral em 56,2% e 57,7% (Figura 14 C, p. 59), o que se reflete no peso do conteúdo ascítico e no acompanhamento macroscópico por imagens fotográficas e de raio-X (Figura 14 D e E, p. 59) onde é possível observar uma redução na distensão abdominal dos camundongos, sendo esta acompanhada da redução da área peritoneal dos animais tratados com EAE em relação ao grupo controle tumoral (Figura 14 F, p. 59).

Figura 14 – Efeito do extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus* nos parâmetros de medidas do desenvolvimento tumoral no modelo de tEa.

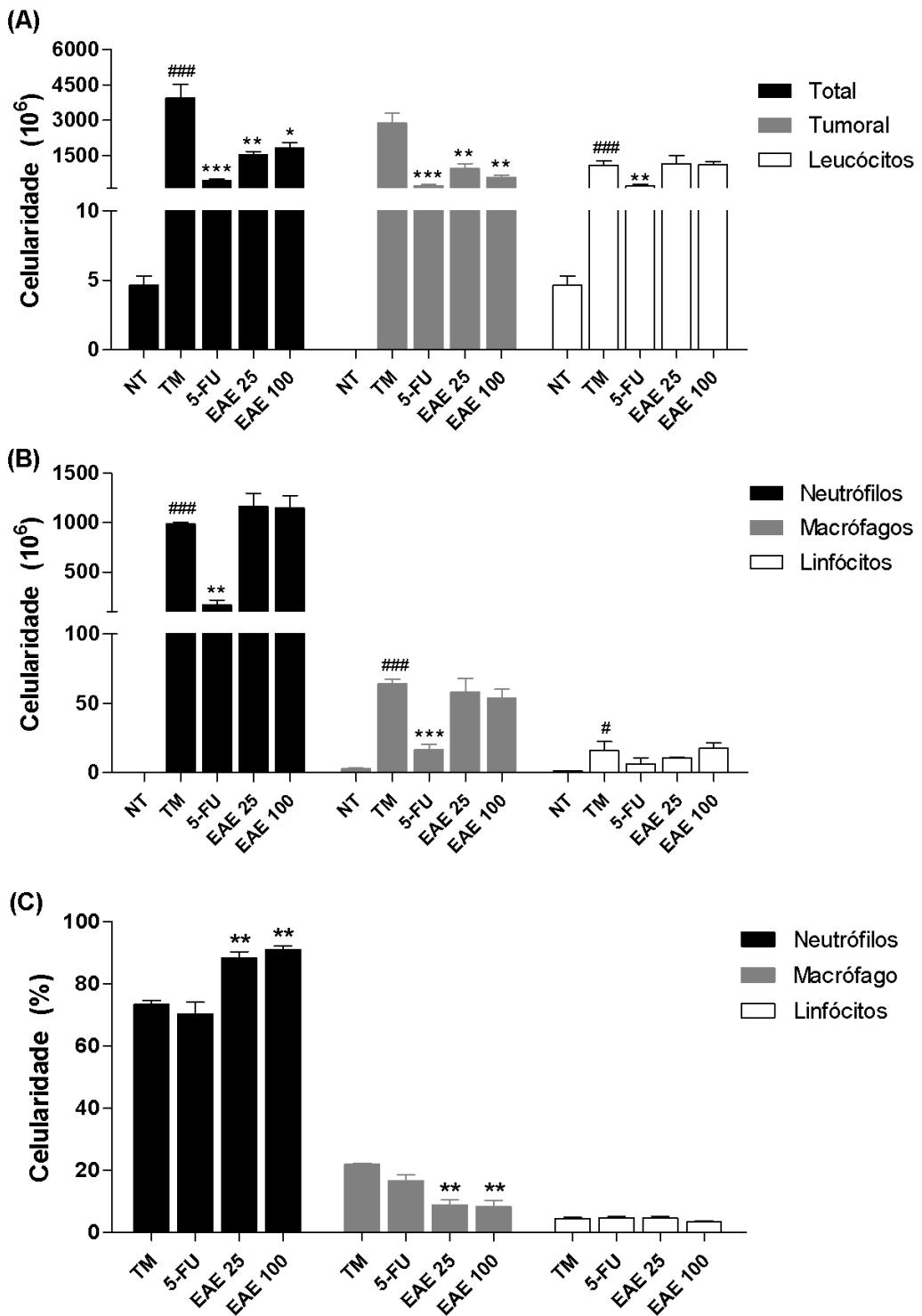


Análise quantitativa dos parâmetros de desenvolvimento tumoral em camundongos Swiss fêmeas portadores do carcinoma de Ehrlich ascítico. Em (A) cinética do ganho de peso dos animais, (B) circunferência abdominal, (C) volume tumoral, (D) peso do conteúdo ascítico, (E) área peritoneal e (F) acompanhamento macroscópico por imagens fotográficas e radiográficas. As linhas e barras representam a média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância Two-Way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni, considerando-se como significativos os valores de $p<0,05$, onde ** $p<0,001$ e *** $p<0,0001$ em relação ao grupo controle tumoral, e ### $p<0,0001$ em comparação ao grupo controle não tumoral. NT refere-se ao grupo não tumoral, TM ao grupo tumoral, 5-FU ao 5-fluorouracil e EAE ao grupo tratado com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus*.

O efeito do extrato do quiabo sobre a celularidade da ascite recuperada da cavidade peritoneal dos animais foi avaliado por meio da contagem total e diferencial das células. Os resultados indicaram um aumento significativo de leucócitos totais nos animais do grupo controle tumoral em relação aos animais do grupo controle não tumoral ($4,65 \pm 0,6690$ NT e $3931,75 \pm 586,2$ TM) (Figura 15 A, p. 61). Além

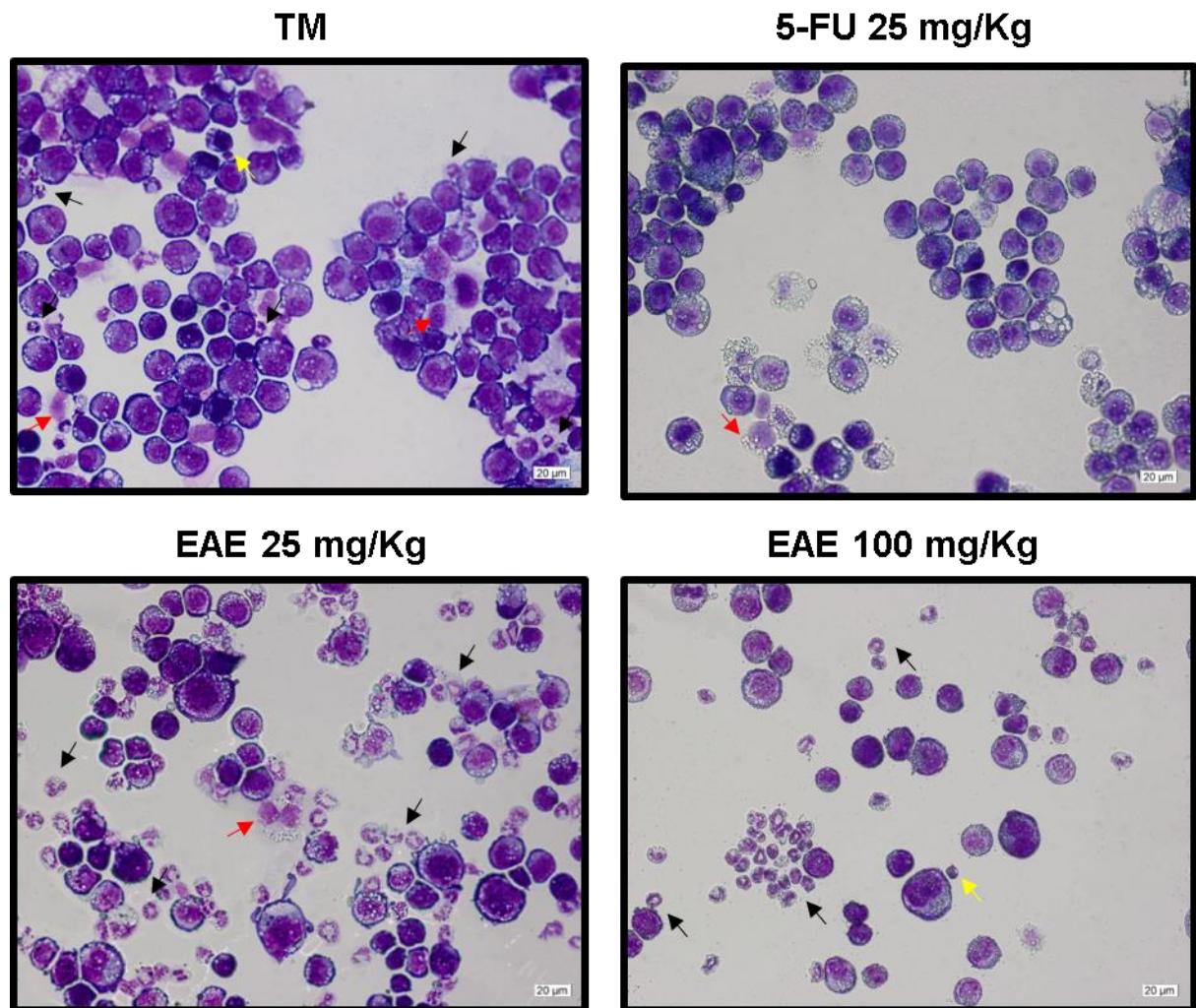
disso, o tratamento com EAE reduziu 39% do número total de células na cavidade peritoneal, resultado da diminuição do quantitativo de células tumorais presentes no tumor (Figura 15 A, p. 61) sem alterar o quantitativo dos diferentes leucócitos no microambiente tumoral (Figura 15 B, p. 61). Entretanto, avaliando o percentual do perfil de leucócitos intratumorais, foi observada uma alteração no perfil de neutrófilos e macrófagos, com aumento de 20% e 24% no percentual de neutrófilos e da redução de 40% no percentual de macrófagos no microambiente tumoral, EAE 25 e 100 mg/Kg respectivamente (figura 15 C, p. 61). Esses dados são evidenciados na análise macroscópica do perfil de células imunes no microambiente tumoral na figura 16 (p. 62) em que é possível observar uma maior presença de neutrófilos nos grupos tratados com EAE em comparação aos animais não tratados. Em contraste, o tratamento com o 5-FU, quimioterápico utilizado como controle, reduziu de forma significativa o número de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais ($1086,36 \pm 185,6$ TM e $206,617 \pm 62,07$ 5-FU) (Figura 15 A e B, p. 61). A taxa de inibição do crescimento tumoral nos animais tratados com EAE foi de 67,5% e 80,8% para as doses de 25 mg/Kg e 100 mg/Kg, respectivamente. Além disso, os animais tratados com 5-fluorouracil apresentaram uma taxa de inibição do crescimento tumoral de 92,2% (Tabela 2, p. 62).

Figura 15 – Efeito do EAE no perfil de células em animais portadores do tEa.



Análise quantitativa da celularidade total presente na cavidade peritoneal de animais portadores do tEa tratados com EAE. Em (A) quantitativo de células totais, tumorais e de leucócitos recuperadas da cavidade peritoneal dos animais, em (B) o perfil de leucócitos e (C) percentual de leucócitos. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância Two-Way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni, considerando-se como significativos os valores com $p < 0,05$, onde ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle tumoral, e *** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle não tumoral. NT refere-se ao grupo não tumoral, TM ao grupo tumoral, 5-FU ao 5-fluorouracil e EAE ao grupo tratado com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus*.

Figura 16 – Efeito do EAE no perfil de leucócitos no tEa



Análise qualitativa dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais portadores do tEa. As setas indicam: neutrófilos (preta), macrófagos (vermelha) e linfócitos (amarela). TM refere-se ao grupo tumoral, 5-FU ao grupo 5-fluorouracil e EAE ao grupo tratado com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus*.

Tabela 2 – Efeito do EAE na inibição tumoral de animais portadores do tEa.

Grupos	% ICT
TM	-
5-FU 25 mg/Kg	92,2
EAE 25 mg/Kg	67,5
EAE 100 mg/Kg	80,8

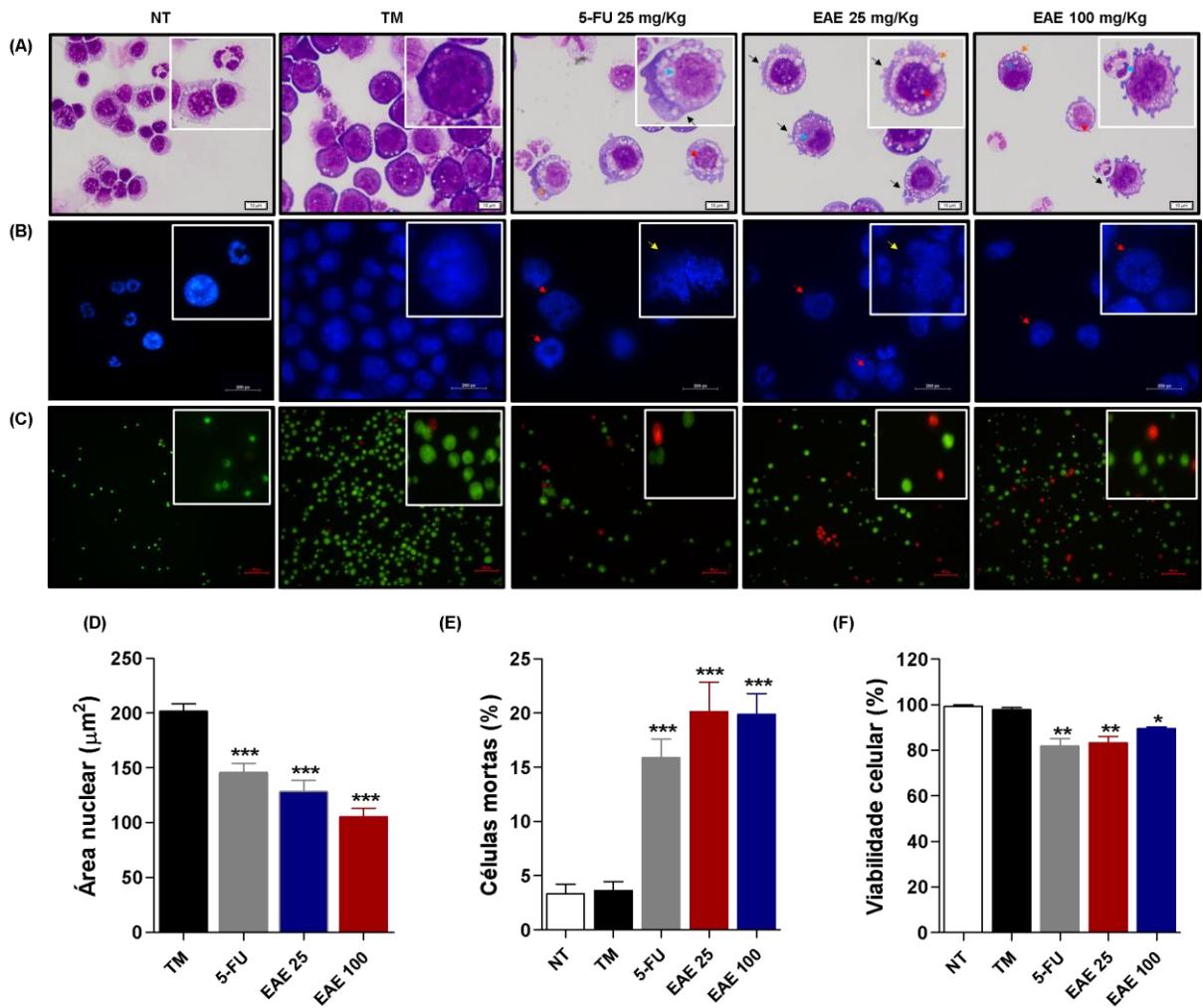
Percentual (%) de inibição do crescimento tumoral (ICT) em animais portadores do tEa. TM refere-se ao grupo tumoral, 5-FU ao 5-fluorouracil e EAE ao grupo tratado com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus*.

5.2 O EAE induz a morte celular e promove alterações morfológicas nas células tumorais

Para avaliar o efeito do EAE em células do tumor de Ehrlich na sua forma ascítica, as células coradas com Panótico Rápido e marcadas com DAPI foram fotografadas e analisadas. Em comparação às células do grupo controle tumoral, as células recuperadas da ascite tumoral de animais tratados com EAE apresentaram alterações compatíveis com as observadas em células no processo de apoptose conforme ilustrado na figura 17 (p. 64). Essas alterações incluem modificações na membrana celular (*blebbing*), condensação da cromatina, pleomorfismo nuclear, aumento da vacuolização celular e fragmentação nuclear. Além disso, a análise morfométrica das células de animais tratados com EAE indicou uma redução de 63,7% e 52,4%, nos grupos EAE25 e EAE100, respectivamente, na área do núcleo das células tumorais em relação ao grupo controle tumoral (Figura 17 D, p. 64).

A análise de morte celular, realizada através da dupla marcação com laranja de acridina e iodeto de propídeo, revelou um aumento de 20% e 16,4% de células inviáveis nos grupos tratados com EAE em comparação ao grupo controle tumoral (Figura 17 C e E, p. 64). Corroborando esses resultados, a análise de viabilidade celular utilizando o corante azul de Tripan indicou uma redução de 17% e 8,4% no quantitativo de células viáveis no tumor dos animais tratados com EAE em comparação ao grupo controle tumoral (Figura 17 F, p. 64). De forma semelhante, o tratamento com o controle quimioterápico 5-FU aumentou o número de células mortas em 16% no ensaio de LA/IP e reduziu 18% do percentual de células viáveis em relação ao grupo controle tumoral.

Figura 17 – Efeito do EAE sobre os parâmetros de morfologia e morte celular em células de animais portadores do tEa.



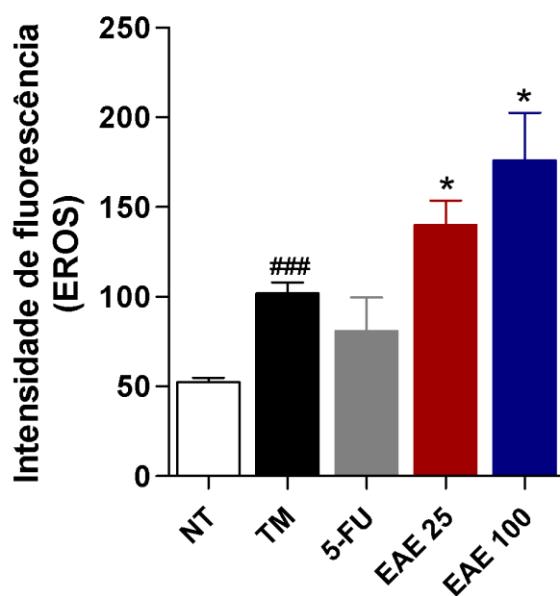
Análise morfológica e de viabilidade de células recuperadas da cavidade peritoneal de animais portadores do tEa. Em (A) análise morfológica das células peritoneais de animais saudáveis ou tumorizados, (B) marcação fluorescente com DAPI, (C) dupla marcação fluorescente com LA/IP, (D) quantificação da área nuclear, (E) quantificação das imagens de LA/IP e (F) análise de viabilidade celular com o corante azul de Tripan. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância One-Way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni, considerando-se como significativos os valores com $p < 0,05$, onde $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ em relação ao grupo controle tumoral. As setas representam: condensação da cromatina (seta azul), fragmentação nuclear (seta vermelha), núcleo pleomórfico (seta amarela), vacuolização (seta laranja), blebbing de membrana (seta preta). NT refere-se ao grupo não tumoral, TM ao grupo tumoral, 5-FU ao 5-fluorouracil e EAE ao grupo tratado com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus*.

5.3 O EAE acentua a produção de EROs em células do tEa

Para investigar o efeito do EAE na modulação de mecanismos envolvidos na progressão tumoral, foi investigado o potencial do extrato na regulação de mediadores envolvidos no estresse oxidativo. As células tumorais de Ehrlich ascítico foram separadas de acordo com o tamanho e granulosidade, e marcadas com a

sonda H₂DCFH-DA para análise da produção de EROs por citometria de fluxo. Os dados mostraram que as células recuperadas dos animais tumorizados apresentaram um aumento significativo na produção de EROs em comparação aos animais saudáveis. Além disso, o tratamento com o extrato aumentou em média 38% e 66%, nas doses de 25 mg/Kg e 100 mg/Kg, respectivamente, a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular em comparação às células de animais não tratados (Figura 18).

Figura 18 – Efeito do EAE na produção de EROs intracelular no tEa.



Análise quantitativa dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular de células recuperadas na cavidade peritoneal dos animais. As barras representam a média de intensidade de fluorescência \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância One-Way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni, considerando-se como significativos os valores com $p<0,05$, onde * $p<0,05$ em relação ao grupo controle tumoral e *** $p<0,0001$ em relação ao grupo controle não tumoral.

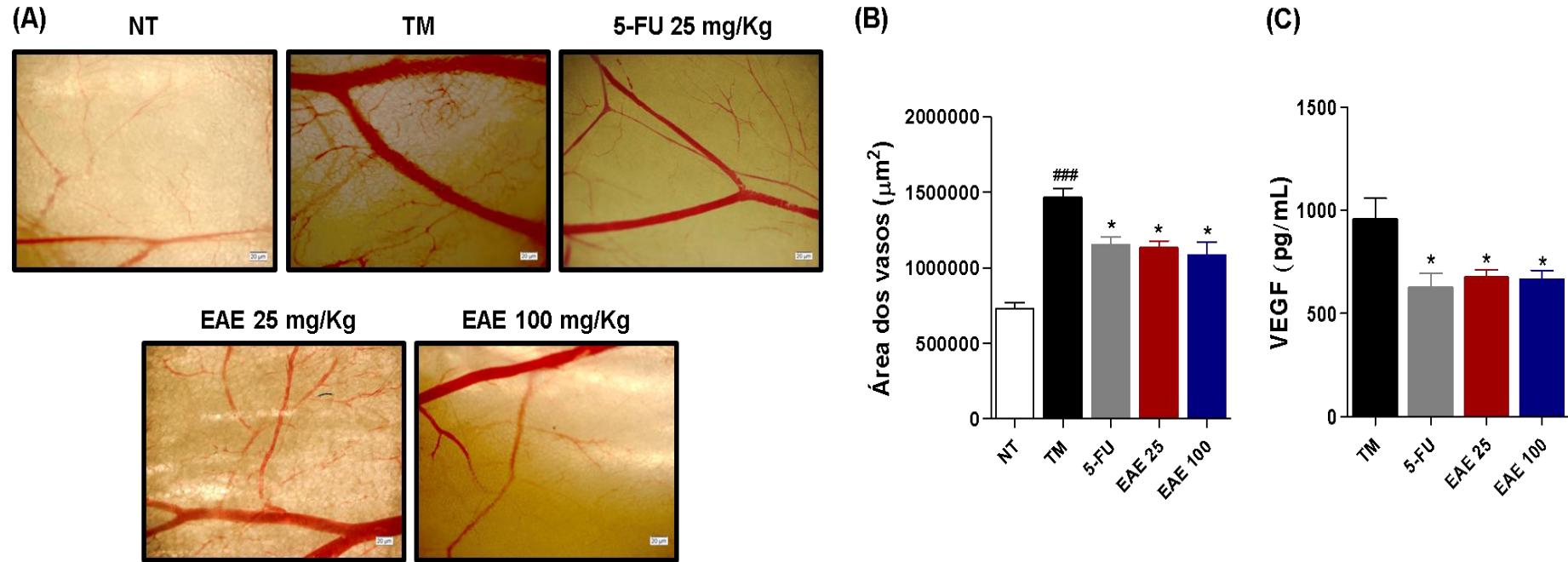
5.4 O EAE reduz a área dos vasos sanguíneos no modelo de tEa

Para avaliar o efeito do extrato do quiabo na angiogênese associada ao desenvolvimento do tumor, a pele da região peritoneal dos animais foi fotografada e a área dos vasos sanguíneos dos animais foi mensurada. Os resultados indicam um aumento significativo na área dos vasos sanguíneos dos animais tumorizados em comparação aos animais saudáveis (729471 ± 38865 NT e 1466706 ± 59758 TM). Além disso, os resultados indicaram que, de maneira semelhante ao controle quimioterápico 5-fluorouracil, o tratamento com EAE, em ambas as doses avaliadas,

reduziu 26% a área dos vasos em comparação ao grupo controle tumoral (Figura 19 A e B, p. 67).

Para mensurar os níveis de VEGF, o sobrenadante tumoral livre de células foi avaliado pelo ensaio imunoenzimático ELISA. O resultado indicou uma redução média de 29% nos níveis de VEGF no sobrenadante de animais tratados com EAE em comparação aos animais não tratados. De forma semelhante, o tratamento com 5-fluorouracil atenuou 34% nos níveis de VEGF no sobrenadante tumoral (Figura 19 C, p. 67).

Figura 19 – Efeito do EAE na angiogênese tumoral em animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico.

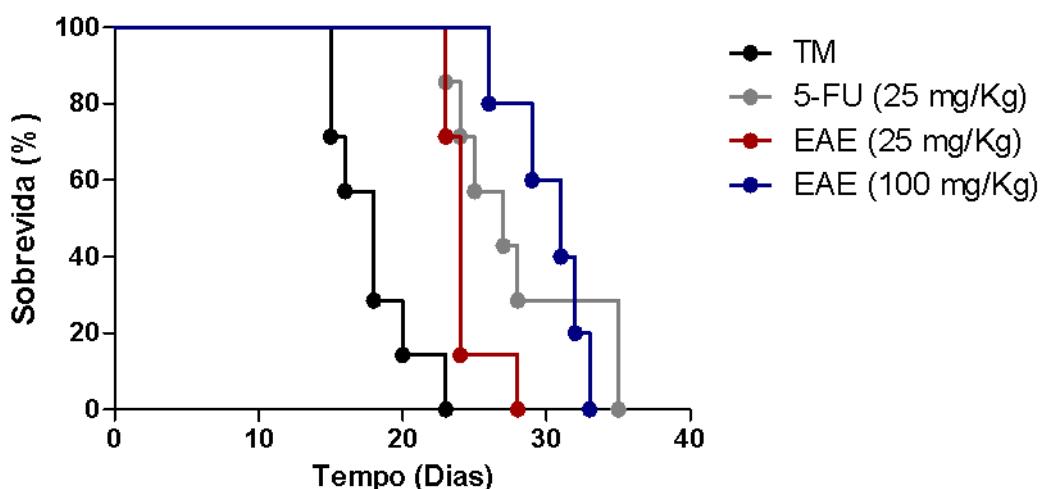


Análise quantitativa da área dos vasos sanguíneos da região peritoneal de animais tumorizados e tratados com EAE. Em (A) fotomicrografias dos vasos sanguíneos, (B) quantificação da área dos vasos e (C) quantificação de VEGF por ELISA. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância One-Way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni, considerando-se como significativos os valores com $p<0,05$, onde * $p<0,05$ em relação ao grupo controle tumoral, e *** $p<0,0001$ em comparação ao grupo controle não tumoral.

5.5 O EAE promove um aumento no tempo de sobrevida de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico

Para avaliar o efeito do tratamento com EAE no tempo de sobrevida, os animais induzidos com o tumor foram tratados e observados diariamente quanto ao óbito não induzido. Como resultado, observou-se um aumento no tempo médio de sobrevivência dos animais tratados com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus* que atingiu 33 dias de vida no grupo EAE100 após a indução do tumor, em comparação ao grupo controle tumoral não tratado, com um tempo máximo de sobrevivência de 23 dias (Figura 20). Vale ressaltar que, semelhantemente aos animais tratados com o controle quimioterápico 5-fluorouracil, os animais tratados com EAE apresentaram um aumento na taxa de expectativa de vida de 34,21% e 55,26% nos grupos EAE25 e EAE100, respectivamente, em comparação aos animais do grupo controle tumoral (Tabela 3, p. 69).

Figura 20 – Efeito do EAE no tempo de sobrevida de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico.



Curva de Kaplan-Meier representando os dias de morte não induzida de animais portadores do tEa. TM refere-se ao grupo tumoral, 5-FU ao 5-fluorouracil e EAE ao grupo tratado com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus*.

Tabela 3 – Efeito do EAE na expectativa de vida de animais portadores do tEa.

Grupos	TMS (dias)	% (IEV)
TM	19	-
5-FU 25 mg/Kg	29	52,63
EAE 25 mg/Kg	25,5	34,21
EAE 100 mg/Kg	29,5	55,26

Tempo médio de sobrevida (TMS) e taxa de incremento na expectativa de vida (IEV) em animais portadores do tEa. TM refere-se ao grupo tumoral, 5-FU ao 5-fluorouracil e EAE ao grupo tratado com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus*.

5.6 O tratamento com EAE não promove toxicidade sistêmica em animais portadores do tEa

Para avaliar os possíveis efeitos sistêmicos do tratamento com EAE em animais portadores do tumor, o consumo hídrico e alimentar foram avaliados. Os resultados demonstraram que não houve diferença no consumo de água e ração dos animais dos grupos avaliados (Tabela 4, p. 70).

Os leucócitos circulantes e da medula óssea também foram avaliados. O tratamento com o EAE não alterou o quantitativo de leucócitos na circulação periférica em comparação aos animais do grupo controle tumoral. Em contraste, os animais tratados com o 5-fluorouracil apresentaram uma considerável redução do quantitativo total de leucócitos periféricos (Figura 21 A, p. 71). O monitoramento do perfil de leucócitos revelou uma redução média de 29% e 58% número de neutrófilos circulantes nos animais tratados com EAE 25 e 100 mg/Kg, respectivamente, em comparação aos animais tumorizados não tratados, sem alterar o perfil de linfócitos e monócitos do sangue dos animais. Em contrapartida, os animais tratados com o controle quimioterápico apresentaram alteração no perfil dos leucócitos, com redução média de 96%, 47% e 76% de neutrófilos, linfócitos e monócitos, respectivamente.

Além disso, o tratamento com EAE na dose de 100 mg/Kg aumentou de forma significativa o quantitativo de células na medula óssea em comparação aos animais não tratados ($3013 \pm 688,8$ TM e 9358 ± 2242 EAE100), enquanto que o 5-FU atenuou de forma significativa o número de leucócitos presentes no isolado da

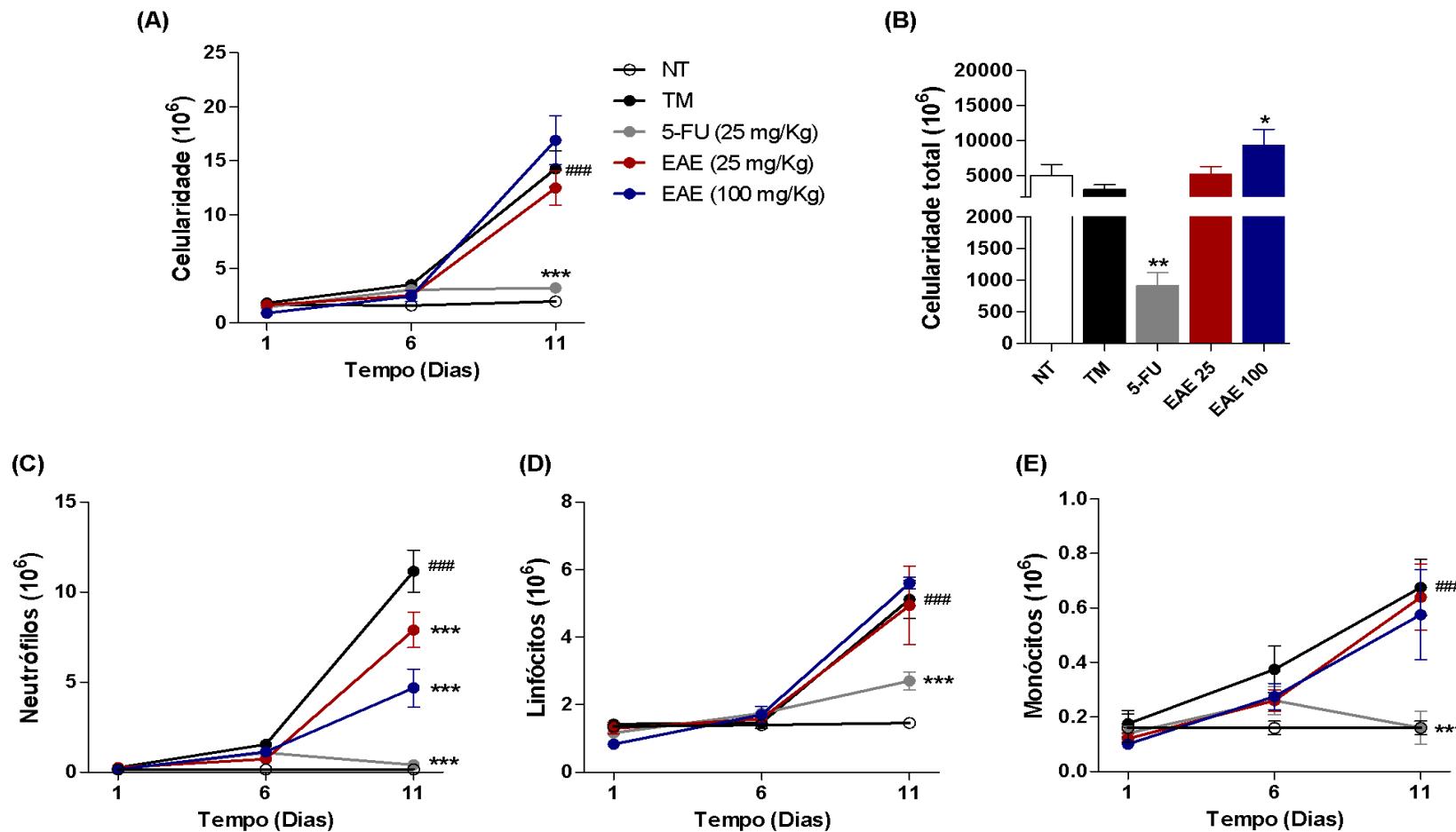
medula óssea dos animais ($3013 \pm 688,8$ TM e $911,9 \pm 212,3$ 5-FU) (Figura 21 B, p. 71).

Tabela 4 – Efeito do tratamento com EAE no consumo hídrico e alimentar de animais portadores do tEa.

Grupos	Água (mL)	Ração (mg)
NT	$68,13 \pm 0,9816$	$37,22 \pm 0,9166$
TM	$60,33 \pm 0,8819$	$34,14 \pm 0,5738$
5-FU 25 mg/Kg	$64,33 \pm 4,177$	$34,15 \pm 0,5766$
EAE 25 mg/Kg	$63 \pm 4,041$	$33,5 \pm 0,7638$
EAE 100 mg/Kg	$63,2 \pm 4,051$	$34 \pm 0,9122$

Consumo de água e ração de animais portadores do tEa. TM refere-se ao grupo tumoral, 5-FU ao 5-fluorouracil e EAE ao grupo tratado com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus*.

Figura 21 – Efeito do EAE nos leucócitos do sangue periférico e da medula óssea de animais portadores do tEa.



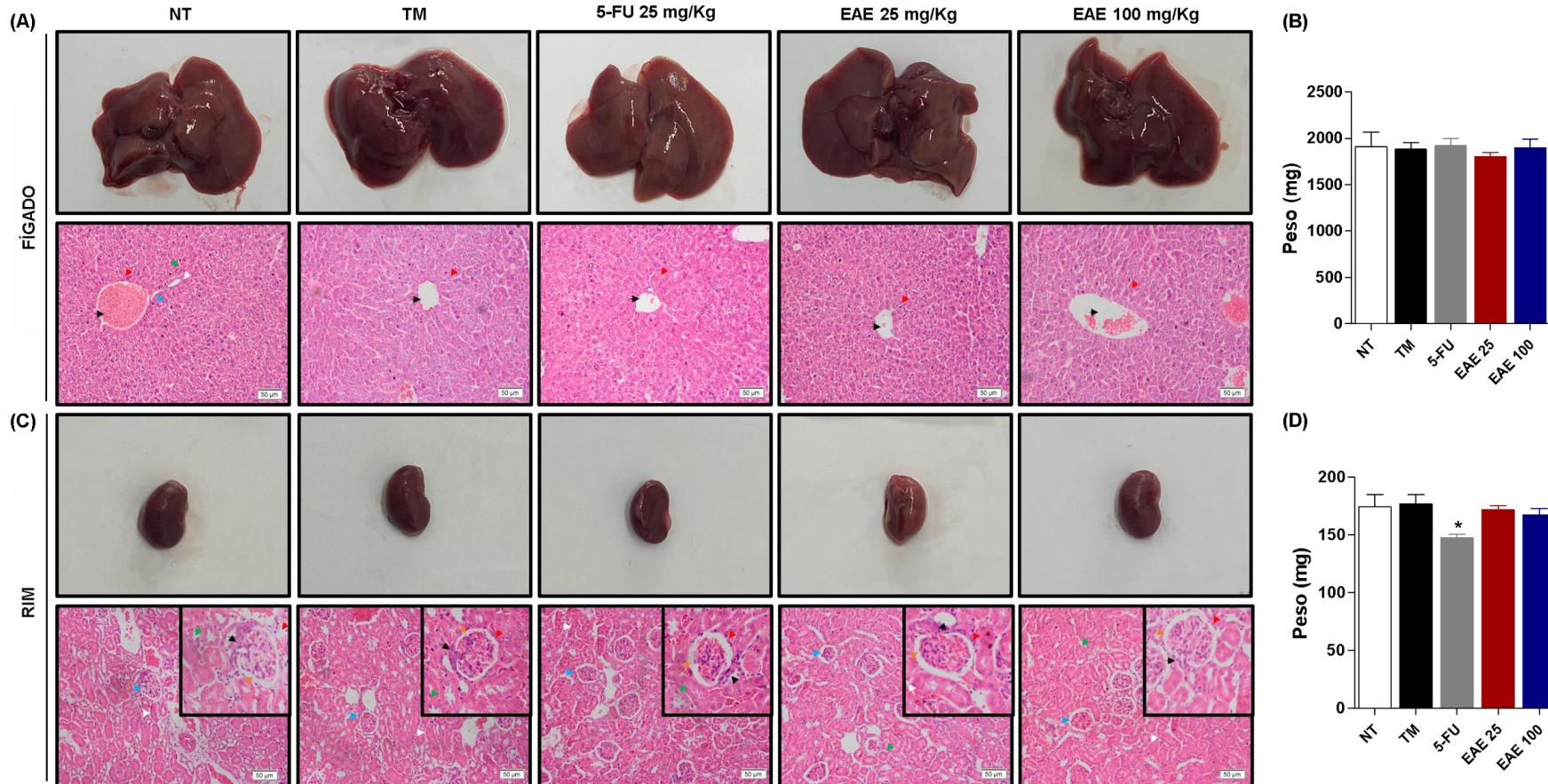
Avaliação do efeito do EAE sobre o quantitativo de leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de animais portadores do tEa. Em (A) número de leucócitos totais no sangue periférico, (B) número de leucócitos totais na medula óssea, (C) número de neutrófilos, (D) número de linfócitos e (E) número de monócitos. As linhas representam a média ± EPM. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni, considerando-se como significativos os valores com $p<0,05$, onde * $p<0,05$, ** $p<0,001$ e *** $p<0,0001$ em relação ao grupo controle tumoral, e ##### $p<0,0001$ em comparação ao grupo controle não tumoral.

A fim de investigar o efeito do tratamento do EAE nos principais órgãos envolvidos na metabolização e na excreção de substâncias e em órgãos linfoides, o fígado, o rim, o timo e o baço dos animais foram coletados e analisados. Os resultados indicaram ausência de alterações macroscópicas e histológicas no fígado dos animais de todos os grupos avaliados, preservando-se a microarquitetura normal do fígado, com a presença de cordões de hepatócitos circulando a veia centro lobular (Figura 22 A, p. 73) e sem alterações no tamanho e no peso do órgão (Figura 22 B, p. 73).

De forma semelhante, o tratamento com EAE não alterou os aspectos macroscópicos, histológicos e do peso do rim dos animais, preservando-se a microarquitetura normal do rim com corpúsculos renais bem evidentes com a presença de cápsula de Bowman e os túbulos contorcidos distais e proximais bem preservados na região cortical. Entretanto, o tratamento com o quimioterápico controle 5-fluorouracil reduziu de forma significativa o tamanho e o peso do rim dos animais (Figura 22 C e D, p. 73).

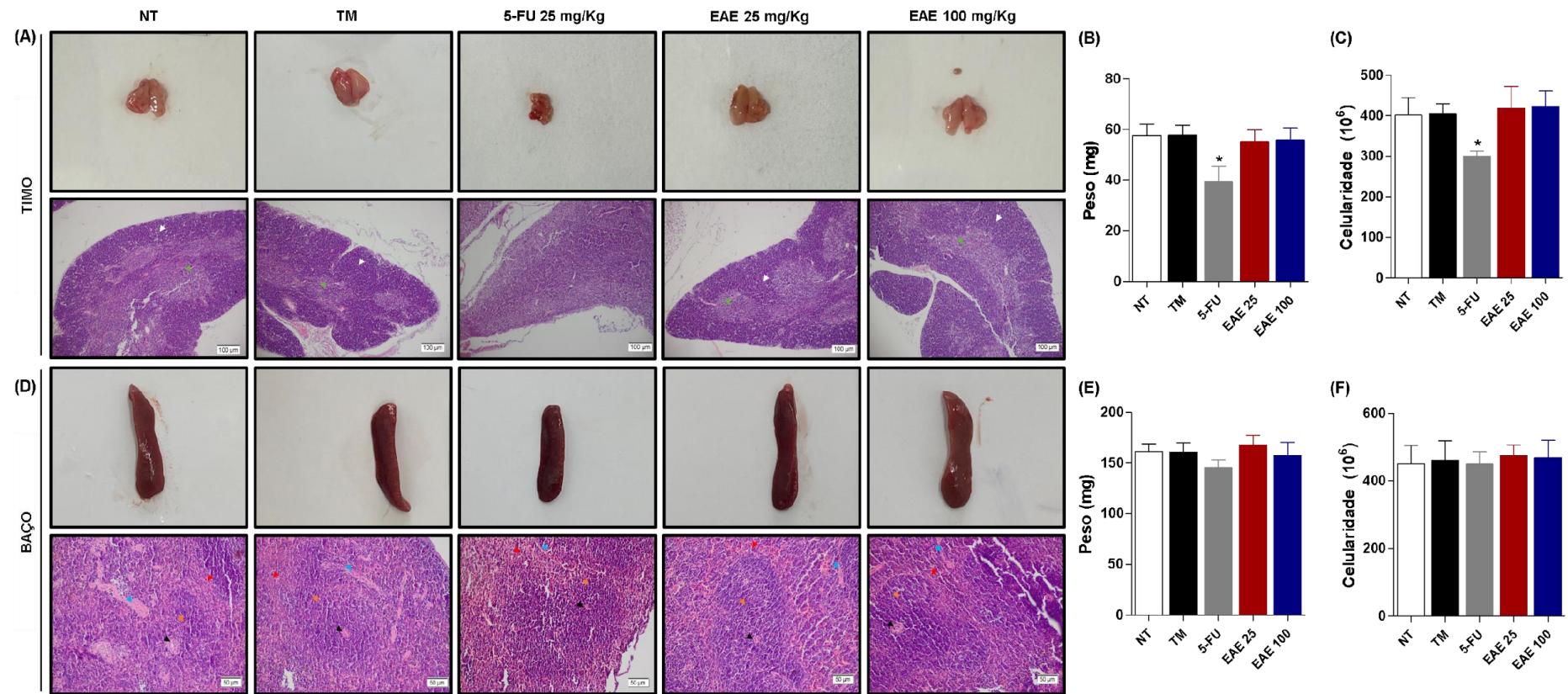
A avaliação dos órgãos linfoides de animais portadores do tEa tratados com EAE não evidenciou alterações nos aspectos macroscópicos, histológicos, no peso e na celularidade dos órgãos avaliados, com a manutenção da estrutura normal do timo com as regiões medular e cortical bem definidas, e do baço com as polpas branca e vermelha bem evidenciadas. Entretanto, o tratamento com o 5-fluorouracil causou alterações no tamanho dos órgãos, além de uma redução significativa no peso e na celularidade do timo, e alterações na microarquitetura normal do órgão, com um desarranjo na delimitação das regiões cortical e medular (Figura 23, p. 74).

Figura 22 – Efeito do EAE no fígado e no rim de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico.



Análise do efeito sistêmico do EAE em animais portadores do tEa. Em (A) imagens macroscópica e histológica do fígado, (B) peso do fígado, (C) imagens macroscópica e histológica do rim e (D) peso do rim. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância One-Way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni, considerando-se como significativos os valores com $p < 0,05$, onde * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle tumoral. Nas imagens histológicas do fígado as setas representam: veia central (seta preta), hepatócitos (seta vermelha), ramo da veia porta (seta verde), ramo da artéria hepática (seta azul), ducto biliar (seta branca). Nas imagens histológicas do rim as setas representam: corpúsculo renal (seta azul), mácula densa (seta preta), espaço capsular (seta laranja), cápsula de Bowman (seta vermelha), túbulo contorcido distal (seta verde) e túbulo contorcido proximal (seta branca).

Figura 23 – Efeito do EAE nos órgãos linfoideos de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico.



Análise do efeito sistêmico do EAE em animais portadores do tEa. Em (A) imagens macroscópica e histológica do timo, (B) peso do timo, (C) celularidade do timo, (D) imagens macroscópica e histológica do baço, (E) peso do baço (F) celularidade do baço. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância One-Way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni, considerando-se como significativos os valores com $p<0,05$, onde $*p<0,05$ em relação ao grupo controle tumoral. Nas imagens histológicas do timo as setas representam: região cortical (seta branca) e a região medular (seta verde). Nas imagens histológicas do baço as setas representam: arteríola central (seta preta), polpa branca (seta laranja), polpa vermelha (seta vermelha) e trabécula (seta azul).

6 DISCUSSÃO

O crescente interesse por estudos farmacológicos que utilizam compostos de origem natural tem sido intensificado globalmente, especialmente em relação aos efeitos farmacológicos de substâncias extraídas de espécies vegetais. No presente estudo, investigou-se o efeito antitumoral do extrato aquoso obtido do fruto da espécie *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, conhecido popularmente como quiabo, sobre o modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico. Essa pesquisa focou na avaliação do impacto do extrato na progressão tumoral, com um protocolo de tratamento estabelecido em um período tardio, após o estabelecimento da doença, simulando de forma mais assertiva o que acontece na maioria dos casos na prática clínica da terapia anticâncer. Esta pesquisa investigou o desenvolvimento tumoral observando indicadores como ganho de peso e circunferência abdominal, volume tumoral formado, perfil de células presentes no conteúdo ascítico, análise de morte celular, níveis de espécies reativas e angiogênese associada ao tumor. Também foram avaliados os efeitos do extrato sobre a sobrevivência e possíveis impactos sistêmicos do extrato em animais portadores do tumor.

Os resultados indicaram que animais que receberam as células do tumor de Ehrlich ascítico apresentaram um aumento nos parâmetros de medida do desenvolvimento tumoral avaliados neste trabalho quando comparados a animais não tumorizados, com aumento significativo do ganho de peso, circunferência abdominal, área peritoneal, aumento nos níveis de EROs e da angiogênese associada ao tumor. Esses achados foram evidenciados pela formação de ascite tumoral na cavidade abdominal dos animais, com a presença de células tumorais e aumento das células inflamatórias tanto no tecido tumoral quanto na circulação periférica. Essas observações confirmam o desenvolvimento do tumor de Ehrlich, que é conhecido por provocar alterações nos parâmetros do desenvolvimento tumoral avaliados neste trabalho, devido a formação da ascite tumoral quando os camundongos são inoculados com células do tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal, onde o crescimento tumoral é evidenciado a partir do 6º dia da indução tumoral (Segura; Barbero; Márquez, 2000).

Os resultados deste estudo indicam que o tratamento com o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus*, nas doses de 25 mg/Kg e 100 mg/Kg, foi capaz de reduzir significativamente o crescimento tumoral. Essa redução foi observada

através de parâmetros como imagens macroscópicas de acompanhamento da progressão tumoral, medida da circunferência abdominal, peso dos animais, além do volume e do peso do conteúdo ascítico coletado. O extrato também diminuiu a contagem total de células, bem como a contagem de células tumorais presentes no líquido ascítico, sem causar redução significativa na contagem de leucócitos, o que indica um possível efeito seletivo dos compostos presentes no extrato. Observou-se ainda que, em ambas as doses testadas, embora sem diferença significativa entre elas, o tratamento com EAE prejudicou a contagem de células tumorais e o número de células viáveis, conforme avaliado pelo teste de exclusão com o corante azul de Tripan.

A análise da morfologia das células coradas com panótico rápido e a marcação com DAPI para a análise nuclear, revelaram alterações celulares consistentes com as observadas em células no processo de apoptose (Kashyap; Garg; Goel, 2022), como a formação de bolhas de membrana, o aumento no número de vacúolos e as alterações nucleares como condensação da cromatina, redução do tamanho do núcleo, pleomorfismo e fragmentação nuclear. Esses resultados foram corroborados pelo aumento do número de células marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo em células recuperadas de animais tratados com o EAE em comparação ao grupo controle tumoral tratado com PBS, reforçando a indução de morte celular. Os resultados obtidos são refletidos no tempo de sobrevida dos animais, com aumento de 34,21% e 55,26% na taxa de expectativa de vida dos animais tratados com EAE nas doses de 25 mg/Kg e 100 mg/Kg, respectivamente. A redução nos parâmetros de desenvolvimento tumoral, a indução de morte celular, as alterações morfológicas compatíveis com a apoptose e o aumento da sobrevida dos animais são achados que sustentam o potencial terapêutico anticâncer do extrato aquoso do quiabo.

A atenuação dos parâmetros de medida do desenvolvimento tumoral observada no tratamento com o EAE é consistente com a literatura que aponta para as propriedades anticancerígenas de extratos vegetais (Monte *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014; Musthafa *et al.*, 2021). A diminuição do volume do tumor e dos marcadores associados ao crescimento tumoral sugerem que os compostos bioativos presentes no extrato do fruto de *Abelmoschus esculentus* podem atuar de maneira eficaz na inibição do crescimento tumoral. Estudos anteriores demonstraram que componentes como flavonoides, lectinas e polifenóis encontrados em diversas

plantas, podem contribuir para esse efeito, possivelmente através do controle de vias de sinalização celular relacionadas a proliferação celular (Montané *et al.*, 2020; Pyo; Kwon; Jung, 2024), evidenciando o potencial terapêutico dos compostos naturais.

O efeito antitumoral observado neste trabalho é corroborado nos estudos de Musthafa e colaboradores (2021) que observaram o efeito citotóxico e antiproliferativo *in vitro* de uma lectina isolada da semente de *Abelmoschus esculentus* na linhagem celular humana de glioblastoma (U84), em que foi observado a indução da apoptose celular e a parada do ciclo celular nas fases G0/G1 a partir da indução de alterações no potencial de membrana mitocondrial resultando no aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e na ativação de caspases efetoras. Em outro trabalho, o efeito antitumoral de uma lectina também isolada da semente da mesma espécie vegetal foi capaz de promover a ativação da maquinaria apoptótica em células de câncer de mama (MCF-7), regulando positivamente moléculas envolvidas na cascata de sinalização da apoptose, levando ao aumento da razão das proteínas Bcl2/Bax, importantes reguladoras do processo de morte celular programada (Monte *et al.*, 2013). Esses estudos reforçam a ideia de que substâncias presentes nessa espécie vegetal possuem efeito antitumoral a partir da indução da morte celular programada, corroborando os dados apresentados neste estudo.

O modelo de tumor de Ehrlich tem sido empregado com sucesso na investigação farmacológica de compostos de origem natural e nanotecnológicos, sendo uma importante ferramenta amplamente aceita na comunidade científica para estudos pré-clínicos de potenciais antitumorais (Matsuzaki, 2004; Feitosa *et al.*, 2021). O modelo ascítico de tumor de Ehrlich leva a proliferação de células tumorais na cavidade peritoneal do animal, com desregulação da sinalização de morte e aumento da sinalização antiapoptótica, além de modular a liberação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento que contribuem com a formação de um microambiente propício ao crescimento tumoral, como as interleucinas (IL) IL-6 e IL-1 β , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (Gorrini, Harris, Mak, 2013; Feitosa *et al.*, 2021).

Alterações no microambiente tumoral favorecem a sobrevivência e o crescimento tumoral, sendo o escape do mecanismo de apoptose um fator importante na biologia dos tumores (Kashyap; Garg; Goel, 2022). A indução de morte

celular nas células tumorais, acompanhada de alterações morfológicas compatíveis com a apoptose, é um resultado importante que reforça a capacidade do EAE em promover a morte programada de células cancerígenas. As análises morfológicas, incluindo bolhas de membrana e fragmentação nuclear, corroboram os mecanismos apoptóticos e são indicativos de que o extrato pode desencadear a apoptose (Bhutia *et al.*, 2019). Esses achados estão alinhados com outras pesquisas que relatam que compostos de origem vegetal induzem apoptose em células tumorais, o que sugere uma possível estratégia de tratamento para cânceres resistentes a terapias convencionais.

Dentre os mecanismos de indução de apoptose celular, o estresse oxidativo presente no microambiente tumoral tem um importante papel nesse processo. A fim de garantir o equilíbrio redox, respostas adaptativas ao estresse oxidativo, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, permitem que as células cancerígenas mantenham o equilíbrio entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes, promovendo a sobrevivência, a proliferação celular e a mutagênese (Lee; Yang; Hong, 2025). Entretanto, níveis desregulados de espécies reativas podem levar a danos em macromoléculas e agirem como sinalizadores intracelular ocasionando lesões à membranas e a ativação de moléculas ativadoras da apoptose (Dong *et al.*, 2022). O aumento dos níveis de EROs intracelular após o tratamento com o EAE reforça um possível mecanismo de ação do extrato a partir da morte celular oxidativa. Esse dado é corroborado com o estudo de Musthafa e colaboradores (2021) em que foi descrito a atividade pró-apoptótica mediada por caspases de uma lectina isolada das sementes do quiabo em células de glioblastoma humano mediada por danos oxidativos em ensaios *in vitro*.

Em seus estudos, Pramudya e colaboradores (2022) indicaram um potencial antitumoral mediado por efeitos imunomodulatórios do extrato etanólico do fruto de *Abelmoschus esculentus* em modelo de câncer de mama sólido induzido em ratos por *N*-methyl-*N*-nitrosourea. Em outro estudo, o efeito antitumoral e imunomodulador do extrato foi observado a partir do aumento da função de macrófagos após o tratamento com um polissacarídeo isolado da mesma espécie vegetal em uma co-cultura de macrófagos da linhagem RAW264.7 com células de câncer de fígado (HepG-2) (Zhen *et al.*, 2014). De forma semelhante, Guebebia e colaboradores (2023) verificaram que os extratos da semente, da folha e do fruto de *Abelmoschus esculentus* não causaram alterações na viabilidade e aumentaram a capacidade

fagocítica de leucócitos isolados de peixes, reforçando que o efeito antitumoral do extrato pode ser mediado ainda pela regulação da resposta imunológica sem causar danos às células imunes.

As células imunológicas têm papel crucial no desenvolvimento, na manutenção e na progressão do câncer, podendo estar relacionadas a resposta imune antitumoral ou na progressão da doença (Xia *et al.*, 2021). Um outro mecanismo que pode colaborar com a morte das células cancerosas é a ativação de células imunes como os linfócitos T CD8. Essas células têm um importante papel ao induzir o killing direto de células tumorais a partir da indução da morte celular via perforinas e granzimas (Cao *et al.*, 2007). Já os linfócitos T CD4 também possuem um importante papel ao orquestrar o recrutamento e a ativação de células imunes para o local do tumor (Malyshkina *et al.*, 2023). A alteração no perfil de neutrófilos no microambiente tumoral observada em animais tratados com o EAE, embora sem alteração do número absoluto de neutrófilos, associada a redução do quantitativo de neutrófilos circulantes pode indicar um recrutamento de células imunes mediada pela ação de citocinas e quimiocinas inflamatórias no microambiente tumoral devido a morte de células cancerígenas ou via ativação de células imunes. Esses resultados reforçam que o EAE pode atuar ainda na resposta imune promovendo a morte celular imunomediada.

Como importante parâmetro a ser avaliado no microambiente tumoral, a angiogênese é um processo fisiopatológico altamente envolvido no desenvolvimento e na progressão de diferentes neoplasias (Lorenc *et al.*, 2024). É descrito que a angiogênese é um mecanismo essencial para a formação e para a progressão do tumor de Ehrlich ascítico, sendo crucial para um maior aporte sanguíneo local, possibilitando a chegada de componentes inflamatórios celulares e solúveis, maior disponibilidade de oxigênio, além de fatores de crescimento e do aumento da permeabilidade dos vasos que contribuem para a formação da ascite, bem como da manutenção do microambiente tumoral (Luo *et al.*, 1998).

Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) são uma classe de citocinas produzidas por células tumorais, que são reguladores-chave para a angiogênese patológica. Eles são ativados por oncogenes, fatores de crescimento e durante a hipóxia (Zhang *et al.*, 2024). É descrito que células do tumor de Ehrlich secretam VEGF, levando a proliferação de células endoteliais para a formação de novos vasos na região peritoneal dos animais (Luo *et al.*, 1998). A redução da área

dos vasos sanguíneos da região abdominal associada a redução dos níveis de VEGF nos resultados deste estudo indicam que o EAE pode atuar de forma a inibir a angiogênese, e que os fitoquímicos presentes na espécie vegetal já descritos na literatura, podem interferir em fatores de crescimento angiogênico, como VEGF (Chaemsawang *et al.*, 2019). Dentre estes fitoquímicos, tem-se a isoquercitrina, principal molécula presente no extrato obtido das sementes de quiabo indicada pela ação de atenuar a secreção de VEGF em linhagens celulares de cânceres humanos, incluindo MCF-7, HepG2 e HeLa (Chaemsawang *et al.*, 2019).

Esses dados indicam que o EAE pode estar atuando em vias de sobrevivência celular e de mecanismos de progressão tumoral, como a exemplo na via das Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs), conhecidas por serem desreguladas na tumorigênese atuando em vários estímulos para regular a proliferação e a sobrevivência celular, em respostas inflamatórias, na apoptose e na metástase (Dhillon *et al.*, 2007). No modelo de câncer associado à colite em camundongos, extratos ricos em polissacarídeos e flavonoides, extraídos das flores de *Abelmoschus esculentus*, foram capazes de reduzir a inflamação e de atenuar a progressão tumoral a partir da inibição de Quinases N-terminais c-Jun (JNK), p-ERK, e PI3K/Akt/Mtor (Deng *et al.*, 2023), o que reforça a atuação de diferentes compostos na ativação de vias importantes na progressão da doença.

O aumento significativo no tempo de sobrevida dos animais tratados com EAE destaca o impacto positivo do extrato no prolongamento da vida dos animais portadores do tumor. Esse resultado é crucial, pois não apenas indica a eficácia do tratamento, mas também sugere que o EAE pode ter um papel importante na melhoria da qualidade de vida dos animais tumorizados. A redução do crescimento tumoral e a indução da morte celular nas células cancerosas são fatores que contribuem para o aumento da sobrevida dos animais.

A escolha do método de extração de compostos fitoquímicos é um processo essencial para garantir a obtenção satisfatória dos compostos de interesse (Zhang; Lin; Ye, 2018). Diferentes métodos de extração de compostos do quiabo foram relatados na literatura, com a utilização ou não de solventes como o etanol e o metanol (Fatima *et al.*, 2024). Peter e colaboradores (2021) descreveram a atividade anti-hiperglicêmica do extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus* em um modelo experimental de ratos induzidos com diabetes mellitus tipo 2. Nesse extrato aquoso obtido de quiabos da Uganda, os autores relataram a presença de alcaloides,

carboidratos, fenol, taninos, proteínas, saponinas, esteroides e flavonoides. Entre esses compostos, a presença de queracetina foi indicada pelos efeitos observados no estudo. De forma semelhante, dados preliminares da caracterização fitoquímica do extrato utilizado no presente estudo indicam a presença de flavonoides (8,23 mg catequina / grama), em quantidade semelhante à observada no estudo de Peter e colaboradores (2021) (12,4 mg queracetina / 100 gramas). Esses achados reforçam o potencial dos flavonóides presentes no extrato em diferentes atividades biológicas, como verificado no presente estudo.

O potencial de alcançar uma dosagem terapêutica eficaz com efeitos adversos mínimos tem sido um foco central nas pesquisas sobre agentes antitumorais. Contudo, os tratamentos predominantes para o câncer, como a quimioterapia, ainda exigem muitas rotas refinadas para atingir melhores resultados em relação aos efeitos adversos que apresentam. Um dos aspectos relevantes deste estudo é a demonstração de que o tratamento com EAE não promove toxicidade sistêmica em animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico nas condições avaliadas, preservando-se a circulação de leucócitos, sem prejudicar o quantitativo total de células na medula óssea e sem alterar o consumo hídrico e alimentar dos animais.

Os principais órgãos envolvidos na metabolização e na excreção de substâncias e órgãos importantes do sistema imunológico foram avaliados quanto aos possíveis efeitos deletérios do tratamento com o EAE, entretanto, não foram observadas alterações a nível macroscópico e microestrutural nos órgãos avaliados. Esses dados estão em concordância com os relatados na literatura, que indicam que o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Abelmoschus esculentus* (em doses de 100 a 5000 mg/kg) não apresentou efeitos nocivos em camundongos Swiss no teste de toxicidade aguda, assim como na histologia de órgãos de ratos e camundongos (Ortaç *et al.*, 2018; Wahyuningsih *et al.*, 2020; Alblihd *et al.*, 2023). Além disso, em ensaios clínicos, não foram observadas alterações na função hepática e renal de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 (Tavakolizadeh *et al.*, 2023), o que reforça a segurança do uso do extrato do quiabo.

O tratamento com EAE não alterou o quantitativo de células totais presentes nos órgãos linfoides, sendo um indicativo de que o EAE não apresenta imunotoxicidade. Esses dados são corroborados pelos estudos de Pramudya e colaboradores (2022) onde foi visto que o tratamento com o extrato etanólico de

Abelmoschus esculentus aumentou o quantitativo de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no tecido mamário de ratas com indução química do tumor de mama, sendo esses resultados atribuídos a presença de quercetinas no extrato que tem função conhecida em aumentar a proliferação e a função dessas células, além de atuar na prevenção da proliferação de células cancerosas modulando negativamente vias de sobrevivência celular atuando em moléculas envolvidas na proliferação celular, na transição epitelial-mesenquimal e na progressão tumoral como p-PI3K, Akt, vimentina, N-caderina, MMP-2, MMP-9, p-EGFR e VEGFR-2 (Chien *et al.*, 2009).

Essa relação à possível ausência de toxicidade em células saudáveis é um ponto favorável para a aplicação clínica de segurança de extratos vegetais como terapias complementares, uma vez que muitas opções de tratamentos oncológicos convencionais têm efeitos adversos graves. Neste estudo, utilizou-se o fármaco 5-fluorouracil, onde o tratamento com o quimioterápico controle causou alterações nos órgãos dos animais, sendo esses achados corroborados com os efeitos adversos conhecidos do 5-fluorouracil devido ao seu mecanismo de ação principal em bloquear a ação da timidilato sintase, uma enzima importante no processo de formação da timidina monofosfato (TMP), um nucleotídeo essencial para a síntese do DNA, que leva a danos no material genético das células que estão no processo de divisão celular, afetando por sua vez, também células saudáveis (Elghareeb *et al.*, 2021; Alzahrani *et al.*, 2022). A ausência de toxicidade nos órgãos avaliados neste estudo sugere que o EAE pode ser uma alternativa viável para estudos que visem o tratamento do câncer, permitindo um manejo mais seguro e menos agressivo da doença.

As limitações deste estudo envolvem a não realização de ensaios para avaliar o efeito do extrato aquoso do quiabo na apoptose celular, bem como em outros mediadores constituintes do microambiente tumoral que podem estar envolvidos no efeito antitumoral do extrato contribuindo para a diminuição da progressão da doença. Além disso, a não realização de ensaios de toxicidade aguda e crônica limita afirmar a ausência de toxicidade nos órgãos avaliados às condições de tratamento desse estudo, sendo necessário compreender ainda o efeito do extrato aquoso de *Abelmoschus esculentus* em animais saudáveis, bem como investigar o seu impacto em outros órgãos, com análise histopatológica, bioquímica e hematológica dos animais, tumorizados ou não, tratados com o extrato. No entanto, reforça-se que os achados com o tratamento nas doses de 25 e 100 mg/Kg por 5

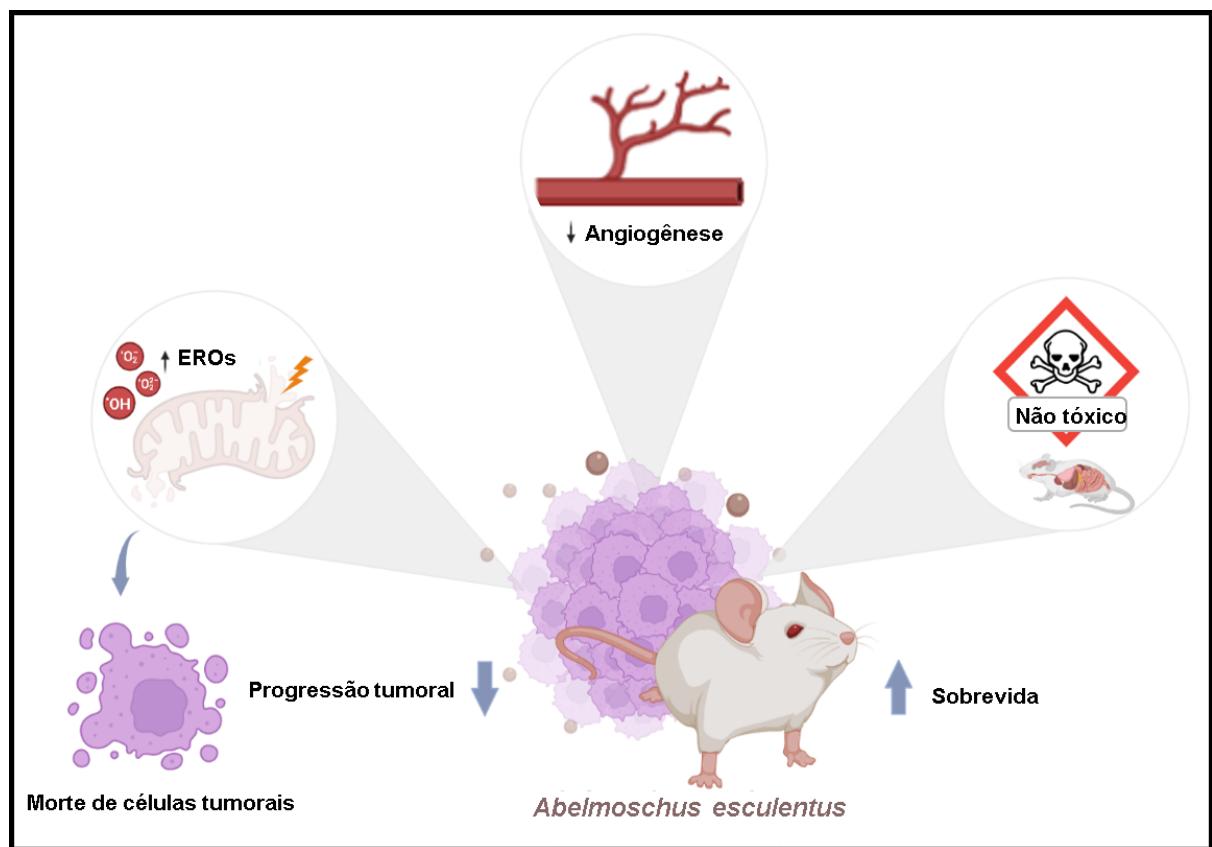
dias consecutivos, não revelaram efeitos tóxicos nos ensaios realizados neste trabalho.

Em suma, os resultados deste estudo indicam que o extrato aquoso obtido do fruto de *Abelmoschus esculentus* apresenta um perfil promissor como agente antitumoral. A combinação de efeitos antitumorais, indução de morte celular, modulação de componentes do microambiente oxidativo do tumor, inibição da angiogênese e a segurança em relação à toxicidade sistêmica oferece uma base sólida para futuras investigações. Como ponto relevante, ensaios estão sendo realizados para identificar os compostos ativos presentes no extrato utilizado neste trabalho, que possam explicar esses efeitos observados, que possibilite identificar os mecanismos de ação e explorar o potencial de tais compostos presentes no extrato aquoso do quiabo. Recomenda-se que estudos adicionais sejam realizados para identificar os mecanismos de ação e para explorar o potencial do extrato aquoso do quiabo em modelos clínicos, buscando validar seus benefícios terapêuticos em humanos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que o extrato aquoso do fruto de *Abelmoschus esculentus* exerce efeito antitumoral promissor no modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico, a partir da atenuação da progressão tumoral por induzir a morte celular possivelmente por mecanismo relacionados ao estresse oxidativo, além de atenuar em mecanismos de progressão tumoral sem causar efeitos tóxicos sistêmicos (Figura 24). Esses dados contribuem para a compreensão das propriedades antitumorais do quiabo, reforçando o seu potencial terapêutico. Contudo, estudos adicionais são necessários para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na resposta antitumoral do extrato do quiabo frente ao modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico.

Figura 24 – Resumo gráfico dos efeitos do EAE frente ao tEa.



EROs: espécies reativas de oxigênio. Imagem criada na plataforma BioRender.com.

8 PERSPECTIVAS

As perspectivas deste estudo incluem a realização da contagem diferencial de precursores de células hematológicas na medula óssea e a investigação do seu impacto no recrutamento e atividade de células imunes tanto no sítio tumoral quanto em nível sistêmico. Além disso, pretende-se avançar nas investigações dos mecanismos envolvidos na indução da morte de células tumorais pelo extrato, e melhor explorar o seu efeito sistêmico por meio de análises de hemograma e de marcadores bioquímicos para a avaliação da função renal e hepática.

Outro desdobramento relevante desta pesquisa é a avaliação do efeito antitumoral do extrato de quiabo como adjuvante ao fármaco 5-fluorouracil em testes pré-clínicos, destacando-se seu potencial para a geração de patente. Além disso, a publicação de um artigo científico com os dados obtidos na dissertação encontra-se em andamento.

REFERÊNCIAS

- ABDIN, Amany A.; SOLIMAN, Nema A.; SAIED, Eman M. Effect of propranolol on IL-10, visfatin, Hsp70, iNOS, TLR2, and survivin in amelioration of tumor progression and survival in Solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 6, p. 1114-1121, 2014.
- AGRAWAL, S. S. *et al.* Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life sciences**, v. 89, n. 5-6, p. 147-158, 2011.
- AHMED, Hafiz Ejaz *et al.* Green synthesis of CeO₂ nanoparticles from the *Abelmoschus esculentus* extract: evaluation of antioxidant, anticancer, antibacterial, and wound-healing activities. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4659, 2021.
- ALBLIHD, Mohamed A. *et al.* Okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] improved blood glucose and restored histopathological alterations in splenic tissues in a rat model with streptozotocin-induced type 1 diabetes through CD8+ T cells and NF-κ_B expression. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1268968, 2023.
- AL-SHAWI, Ali AA *et al.* Review on the “biological applications of okra polysaccharides and prospective research”. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 102, 2021.
- ALZAHIRANI, Shiekah M. *et al.* 5-Fluorouracil and capecitabine therapies for the treatment of colorectal cancer. **Oncology Reports**, v. 50, n. 4, p. 175, 2023.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS).** About Basal and Squamous Cell Skin Cancer. Atlanta, 2016.p. 9. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8818.00.pdf>> Acesso em: 15 novembro de 2024.
- AN, Xiaoqin *et al.* Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. **Cell Death & Disease**, v. 15, n. 8, p. 556, 2024.
- BAHCECIOGLU, Gokhan *et al.* Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. **Acta biomaterialia**, v. 106, p. 1-21, 2020.
- BAIREY, Osnat *et al.* Bcl-2, Bcl-X, Bax, and Bak expression in short-and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2860-2866, 1999.
- BANK, Harvey L. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. **In vitro cellular & developmental biology**, v. 24, n. 4, p. 266-273, 1988.
- BERGAMI-SANTOS, Patrícia C.; MARIANO, Mário; BARBUTO, José Alexandre M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.
- BERGHOLZ, Johann S. *et al.* Integrating immunotherapy and targeted therapy in

cancer treatment: mechanistic insights and clinical implications. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 21, p. 5557-5566, 2020.

BHUTIA, Sujit K. *et al.* Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological research**, v. 144, p. 8-18, 2019.

BOBROVNIKOVA-MARJON, Ekaterina *et al.* PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. **Oncogene**, v. 29, n. 27, p. 3881-3895, 2010.

BULLEN, John W. *et al.* Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. **Science signaling**, v. 9, n. 430, p. ra56-ra56, 2016.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.

CAO, Xuefang *et al.* Granzyme B e perforina são importantes para a supressão regulatória mediada por células T da depuração tumoral. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 635-646, 2007.

CHAEMSAWANG, Watcharaphong *et al.* The effect of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) seed extract on human cancer cell lines delivered in its native form and loaded in polymeric micelles. **International Journal of Biomaterials**, v. 2019, n. 1, p. 9404383, 2019.

CHEN, Huricha *et al.* *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) polysaccharides. **Journal of medicinal food**, v. 19, n. 3, p. 253-265, 2016.

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

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.

CRAWFORD, Jeffrey R.; PILLING, Darrell; GOMER, Richard H. Improved serum-free culture conditions for spleen-derived murine fibrocytes. **Journal of immunological methods**, v. 363, n. 1, p. 9-20, 2010.

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

DE VISSER, Karin E.; JOYCE, Johanna A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer cell**, v. 41, n. 3, p. 374-403, 2023.

- DENG, Yuanle *et al.* Chemopreventive effects of polysaccharides and flavonoids from okra flowers in azomethane/dextran sulfate sodium-induced murine colitis-associated cancer. **Nutrients**, v. 15, n. 22, p. 4820, 2023.
- DEVITA JR, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer research**, v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 2008.
- DHILLON, Amardeep Singh *et al.* MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-3290, 2007.
- DIZDAROGLU, Miral; JARUGA, Pawel. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free radical research**, v. 46, n. 4, p. 382-419, 2012.
- DONG, Shuhui *et al.* ROS/PI3K/Akt and Wnt/β-catenin signalings activate HIF-1α-induced metabolic reprogramming to impart 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, p. 15, 2022.
- DUTRA, Rafael C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- ELGHAREEB, Mona M. *et al.* Synergistic effects of Ficus Carica extract and extra virgin olive oil against oxidative injury, cytokine liberation, and inflammation mediated by 5-Fluorouracil in cardiac and renal tissues of male albino rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 4558-4572, 2021.
- ELIA, I.; HAIGIS, M. C. Metabolites and the tumour microenvironment: from cellular mechanisms to systemic metabolism. **Nat Metab.** 3: 21–32, 2021.
- ELKHALIFA, Abd Elmoneim O. *et al.* Okra (*Abelmoschus esculentus*) as a potential dietary medicine with nutraceutical importance for sustainable health applications. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 696, 2021.
- ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- EL-SAYED, Ashraf SA *et al.* Aspergillus flavipes L-methionine γ-lyase-β-cyclodextrin conjugates with improved stability, catalytic efficiency and anticancer activity. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 27715, 2024.
- EL-TANANI, Mohamed *et al.* Unraveling the tumor microenvironment: insights into cancer metastasis and therapeutic strategies. **Cancer Letters**, p. 216894, 2024.
- EULBERG, Dirk *et al.* The prospect of tumor microenvironment-modulating therapeutical strategies. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 1070243, 2022.
- FADEEL, Bengt; ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **Journal of internal medicine**, v. 258, n.

6, p. 479-517, 2005.

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

FARNSWORTH, Norman R. *et al.* Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the world health organization**, v. 63, n. 6, p. 965, 1985.

FATIMA, Mehak *et al.* Okra: Mucilage extraction, composition, applications, and potential health benefits. **European Polymer Journal**, p. 113193, 2024.

FECCCHIO, Denise *et al.* Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, p. 125-132, 1990.

FEITOSA, Ivan Brito *et al.* What are the immune responses during the growth of Ehrlich's tumor in ascitic and solid form?. **Life Sciences**, v. 264, p. 118578, 2021.

FERLAY, J. *et al.* Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2022.

FERRARA, Napoleone; GERBER, Hans-Peter; LECOUTER, Jennifer. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) USA, 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-bevacizumab-combination-chemotherapy-ovarian-cancer>> Acesso em: 09 de novembro de 2024.

GAMAL-ELDEEN, Amira M. *et al.* Sulfated Extract of *Abelmoschus esculentus*: A Potential Cancer Chemo-preventive Agent. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 988-997, 2022.

GARCIA, Josep *et al.* Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. **Cancer treatment reviews**, v. 86, p. 102017, 2020.

GENG, Xue-Qing *et al.* Structural characterization of a polysaccharide from *Abelmoschus esculentus* L. Moench (okra) and its hypoglycemic effect and mechanism on type 2 diabetes mellitus. **Food & Function**, v. 13, n. 23, p. 11973-11985, 2022.

GERL, Robert; VAUX, David L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 263-270, 2005.

GHALEHBANDI, Seyedehdelaram *et al.* The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. **European Journal of Pharmacology**, v. 949, p. 175586, 2023.

GOODMAN, L. S. *et al.* Use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. **Jama**, v. 132, p. 126-132,

1946.

GLOBOCAN. Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1). Disponível em: < <https://gco.iarc.who.int> > Acesso em: 20 de novembro de 2024.

GORRINI, Chiara; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-947, 2013.

GREEN, D.R. Cell Death. Apoptosis and Other Means to an End; **Cold Spring Harbor Laboratory Press**: New York, NY, USA, 2018.

GUEBEBIA, Salma *et al.* Effects of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) leaves, fruits and seeds extracts on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) leukocytes, and their cytotoxic, bactericidal and antioxidant properties. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 138, p. 108799, 2023.

GUO, Beibei *et al.* GIP attenuates neuronal oxidative stress by regulating glucose uptake in spinal cord injury of rat. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 30, n. 6, 2024.

HALDAR, Pallab Kanti *et al.* Antitumor activity of *Sansevieria roxburghiana* rhizome against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 12, p. 1337-1343, 2010.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HAQUE, Md Uzzal *et al.* Unveiling the apoptotic potential of antioxidant-rich Bangladeshi medicinal plant extractives and computational modeling to identify antitumor compounds. **Helion**, v. 10, n. 20, 2024.

HEINRICH, Michael *et al.* (Ed.). Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy E-Book: Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy E-Book. **Elsevier Health Sciences**, 2023.

HOFER, Tim *et al.* Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. **Biological Chemistry**, 2005.

HONKALA, Alexander *et al.* Harnessing the predictive power of preclinical models for oncology drug development. **Nature reviews Drug discovery**, v. 21, n. 2, p. 99-114, 2022.

HU, Qian *et al.* Elevated cleaved caspase-3 is associated with shortened overall

survival in several cancer types. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 8, p. 5057, 2014.

HUANG, Manru *et al.* Anti-tumor pharmacology of natural products targeting mitosis. **Cancer Biology & Medicine**, v. 19, n. 6, p. 774, 2022.

HUANG, Tsui-Chin; CHEN, Jyh-Yih. Proteomic analysis reveals that pardaxin triggers apoptotic signaling pathways in human cervical carcinoma HeLa cells: cross talk among the UPR, c-Jun and ROS. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 8, p. 1833-1842, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSE DE ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA) (2022). Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer/> > Acesso em: 11 de novembro de 2024.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2024). Disponível em: <<https://www.iarc.who.int>>. Acesso em: 20 de novembro de 2024.

ISLAM, Muhammad Torequl. Phytochemical information and pharmacological activities of Okra (*Abelmoschus esculentus*): A literature-based review. **Phytotherapy research**, v. 33, n. 1, p. 72-80, 2019.

JELIC, Marija Dragan *et al.* Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 17, n. 1, p. 22-28, 2021.

JIN, Ming-Zhu; JIN, Wei-Lin. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 166, 2020.

JUAN, Celia Andrés *et al.* The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 4642, 2021.

KALYANARAMAN, Balaraman *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free radical biology and medicine**, v. 52, n. 1, p. 1-6, 2012.

KARATI, Dipanjan; KUMAR, Dileep. A Comprehensive Review on Targeted Cancer Therapy: New Face of Treatment Approach. **Current Pharmaceutical Design**, v. 29, n. 41, p. 3282-3294, 2023.

KASHYAP, Dharambir; GARG, Vivek Kumar; GOEL, Neelam. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 125, p. 73-120, 2021.

KHALID, El Bairi *et al.* Natural products against cancer angiogenesis. **Tumor Biology**, v. 37, p. 14513-14536, 2016.

KIM, Changmin; KIM, Bonglee. Produtos naturais anticâncer e seus compostos bioativos induzindo apoptose mediada por estresse de ER: Uma revisão. **Nutrients** ,

v. 10, n. 8, p. 1021, 2018.

KUWANA, Tomomi *et al.* BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. **Molecular cell**, v. 17, n. 4, p. 525-535, 2005.

KWOK, Carsten Tsun-Ka *et al.* An Overview of the Current Scientific Evidence on the Biological Properties of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench (Okra). **Foods**, v. 14, n. 2, p. 177, 2025.

ANGLEY, Robert R.; FIDLER, Isaiah J. The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. **International journal of cancer**, v. 128, n. 11, p. 2527-2535, 2011.

LEE, Eunsun; YANG, Dongki; HONG, Jeong Hee. Prominent Naturally Derived Oxidative-Stress-Targeting Drugs and Their Applications in Cancer Treatment. **Antioxidants**, v. 14, n. 1, p. 49, 2025.

LI, Y. *et al.* The Interplay Between Inflammation and Stromal Components in Pancreatic Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 850093-850093, 2022.

LIN, Hui-Yi; PARK, Jong Y. Epidemiology of Cancer. In: **Anesthesia for Oncological Surgery**. Cham: Springer International Publishing, p. 11-16, 2024.

LINGARAJU, Gejjalagere S. *et al.* Synthesis of new coumarin tethered isoxazolines as potential anticancer agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 28, n. 23-24, p. 3606-3612, 2018.

LO, Yuan-Hung; KARLSSON, Kasper; KUO, Calvin J. Applications of organoids for cancer biology and precision medicine. **Nature Cancer**, v. 1, n. 8, p. 761-773, 2020.

LORENC, Patryk *et al.* Physiological and tumor-associated angiogenesis: Key factors and therapy targeting VEGF/VEGFR pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 180, p. 117585, 2024.

LUGANO, Roberta; RAMACHANDRAN, Mohanraj; DIMBERG, Anna. Angiogênese tumoral: causas, consequências, desafios e oportunidades. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, p. 1745-1770, 2020.

LUO, Jin Cai *et al.* Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. **Cancer research**, v. 58, n. 12, p. 2652-2660, 1998.

MALYSHKINA, Anna *et al.* Células T CD4+ citotóxicas em infecções virais crônicas e câncer. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1271236, 2023.

MANDAL, Debaprasad *et al.* Tumor-induced thymic involution via inhibition of IL-7Ra and its JAK-STAT signaling pathway: protection by black tea. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 433-444, 2006.

- MARTEMUCCI, Giovanni *et al.* Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. **Oxygen**, v. 2, n. 2, p. 48-78, 2022.
- MARIN-HERNANDEZ, Alvaro *et al.* HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 9, p. 1084-1101, 2009.
- MASOUD, Georgina N.; LI, Wei. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 378-389, 2015.
- MATSUZAKI, Patrícia *et al.* Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata*. **Cancer Letters**, v. 238, n. 1, p. 85-89, 2006.
- Ministério da Saúde.** Brasil (2024). Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/plantas-medicinais-e-fitoterapicos> > Acesso em: 15 de novembro de 2024.
- MISHRA, Gyan P. *et al.* Biotechnological advancements and begomovirus management in okra (*Abelmoschus esculentus* L.): status and perspectives. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 360, 2017.
- MISHRA, Rosalin *et al.* PI3K inhibitors in cancer: clinical implications and adverse effects. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 7, p. 3464, 2021.
- MONTANÉ, Xavier *et al.* Current perspectives of the applications of polyphenols and flavonoids in cancer therapy. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3342, 2020.
- MONTE, Leonardo G. *et al.* Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor effects in human breast cancer cells. **Biotechnology letters**, v. 36, p. 461-469, 2013.
- MORANA, Ornella; WOOD, Will; GREGORY, Christopher D. The apoptosis paradox in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1328, 2022.
- MORSI, Dalia S. *et al.* Anti-proliferative and immunomodulatory potencies of cinnamon oil on Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11839, 2022.
- MOYEN UDDIN PK, Md *et al.* Investigating the Anticancer Effects of *Pleurotus ostreatus* Polysaccharide on G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. **Chemistry & Biodiversity**, p. e202400897, 2024.
- MULLARD, Asher. Addressing cancer's grand challenges. **Nat Rev Drug Discov**, v. 19, n. 12, p. 825-826, 2020.
- MUSTHAFA, Shazia Anjum *et al.* Lectin isolated from *Abelmoschus esculentus* induces caspase mediated apoptosis in human U87 glioblastoma cell lines and modulates the expression of circadian clock genes. **Toxicon**, v. 202, p. 98-109, 2021.

- NASCIMENTO, Flávia RF *et al.* Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, n. 22, p. 2650-2653, 2006.
- NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.
- NICOL, B. M.; PRASAD, S. B. The effects of cyclophosphamide alone and in combination with ascorbic acid against murine ascites Dalton's lymphoma. **Indian journal of pharmacology**, v. 38, n. 4, p. 260-265, 2006.
- NOREEN, Sobia *et al.* pH responsive *Abelmoschus esculentus* mucilage and administration of methotrexate: in-vitro antitumor and in-vivo toxicity evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2725, 2022.
- ONAKPA, Monday Michael. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of genus *Abelmoschus*. **Phytopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 648-663, 2013.
- ORŠOLIĆ, Nada *et al.* Natural phenolic acid, product of the honey bee, for the control of oxidative stress, peritoneal angiogenesis, and tumor growth in mice. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5583, 2020.
- ORTAÇ, Deniz *et al.* In vivo anti-ulcerogenic effect of okra (*Abelmoschus esculentus*) on ethanol-induced acute gastric mucosal lesions. **Pharmaceutical biology**, v. 56, n. 1, p. 165-175, 2018.
- OZASLAN, Mehmet *et al.* Ehrlich ascites carcinoma. **African journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.
- PERILLO, Bruno *et al.* ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & molecular medicine**, v. 52, n. 2, p. 192-203, 2020.
- PETER, Emanuel L. *et al.* Total polyphenols and antihyperglycemic activity of aqueous fruits extract of *Abelmoschus esculentus*: Modeling and optimization of extraction conditions. **PLoS one**, v. 16, n. 4, p. e0250405, 2021.
- PETERS, Jeffrey M.; GONZALEZ, Frank J. The evolution of carcinogenesis. **Toxicological sciences**, v. 165, n. 2, p. 272-276, 2018.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.
- PRAMUDYA, Manikya *et al.* Anti-cancer activity of an ethanolic extract of red okra pods (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) in rats induced by N-methyl-N-nitrosourea. **Veterinary World**, v. 15, n. 5, p. 1177, 2022.
- PYO, Yeonhee; KWON, Ki Han; JUNG, Yeon Ja. Anticancer Potential of Flavonoids: Their Role in Cancer Prevention and Health Benefits. **Foods**, v. 13, n. 14, p. 2253, 2024.

RADULSKI, Débora Rasec *et al.* Features and applications of Ehrlich tumor model in cancer studies: a literature review. **Translational Breast Cancer Research**, v. 4, 2023.

SANTOS, E. L. E. **Efeito antitumoral do triterpeno pentacíclico friedelina no modelo murino de carcinoma de Ehrlich ascítico.** 2023. 102 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023.

SCHWARTZ, Stephen M. Epidemiology of cancer. **Clinical Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 140-149, 2024.

SEGURA, Juan A.; BARBERO, Laura G.; MÁRQUEZ, Javier. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunology letters**, v. 74, n. 2, p. 111-115, 2000.

SEMENTZA, Gregg L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 2, p. 167-171, 2001.

SHIOMI, Nahoko *et al.* Suppression of Ehrlich ascites tumor cell proliferation via G1 arrest induced by dietary nucleic acid-derived nucleosides. **Plos one**, v. 19, n. 7, p. e0305775, 2024.

SIDDIQUE, Muhammad Hussnain *et al.* Antidiabetic and antioxidant potentials of *Abelmoschus esculentus*: *In vitro* combined with molecular docking approach. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 101418, 2022.

SIEGEL, Rebecca L.; GIAQUINTO, Angela N.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2024. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 1, 2024.

SOUZA, Tayhana Priscila Medeiros. **Efeitos in vivo e in vitro do isoflavonoide trifolirizina sobre o tumor de Ehrlich na sua forma ascítica.** 2022. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022.

SMITH, Edwin. **The Edwin Smith Surgical Papyrus.** University of Chicago Press, 1930.

SORDO-BAHAMONDE, Christian *et al.* Chemo-immunotherapy: a new trend in cancer treatment. **Cancers**, v. 15, n. 11, p. 2912, 2023.

STEINMETZ, Michel O.; PROTA, Andrea E. Microtubule-targeting agents: strategies to hijack the cytoskeleton. **Trends in cell biology**, v. 28, n. 10, p. 776-792, 2018.

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

SUN, Baocun *et al.* Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, p. 30502, 2016.

SUN, Jiagui *et al.* Chemical Constituents, Anti-Tumor Mechanisms, and Clinical Application: A Comprehensive Review on *Scutellaria barbata*. **Molecules**, v. 29, n. 17, p. 4134, 2024.

SUNG, Hyuna *et al.* Global cancer statistics 2020: **GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TANG, Shuiying *et al.* Ozone induces BEL7402 cell apoptosis by increasing reactive oxygen species production and activating JNK. **Annals of Translational Medicine**, v. 9, n. 15, 2021.

TAVAKOLIZADEH, Mahdi *et al.* Clinical efficacy and safety of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. **Acta Diabetologica**, v. 60, n. 12, p. 1685-1695, 2023.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2002. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2002/summary/> Acesso em 15 de novembro de 2024.

VENKATAKRISHNAN, Gayathri; PARVATHI, Venkatachalam Deepa. Decoding the mechanism of vascular morphogenesis to explore future prospects in targeted tumor therapy. **Medical Oncology**, v. 39, n. 11, p. 178, 2022.

VIALLARD, Claire; LARRIVÉE, Bruno. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 409-426, 2017.

WAHYUNINGSIH, Sri Puji Astuti *et al.* Hepatoprotective activity of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) in sodium nitrite-induced hepatotoxicity. **Veterinary World**, v. 13, n. 9, p. 1815, 2020.

WANI, Atif Khurshid *et al.* Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials. **Biomolecules**, v. 13, n. 2, p. 194, 2023.

WEI, Xiaoxu *et al.* Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments. **Molecular cancer**, v. 20, p. 1-18, 2021.

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

WYLD, Lynda; AUDISIO, Riccardo A.; POSTON, Graeme J. The evolution of cancer

surgery and future perspectives. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 12, n. 2, p. 115-124, 2015.

XIA, Fangbo *et al.* Antioxidant and anti-fatigue constituents of okra. **Nutrients**, v. 7, n. 10, p. 8846-8858, 2015.

XIA, Longzheng *et al.* The cancer metabolic reprogramming and immune response. **Molecular cancer**, v. 20, p. 1-21, 2021.

YUAN, Meng *et al.* The role of bioactive compounds in natural products extracted from plants in cancer treatment and their mechanisms related to anticancer effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, n. 1, p. 1429869, 2022.

ZANOTELLI, Matthew R.; ZHANG, Jian; REINHART-KING, Cynthia A. Mechanoresponsive metabolism in cancer cell migration and metastasis. **Cell metabolism**, v. 33, n. 7, p. 1307-1321, 2021.

ZHANG, Cen *et al.* Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. **Journal of molecular cell biology**, v. 12, n. 9, p. 674-687, 2020.

ZHANG, Jing *et al.* Natural products and derivatives for breast cancer treatment: From drug discovery to molecular mechanism. **Phytomedicine**, p. 155600, 2024.

ZHANG, Qing-Wen; LIN, Li-Gen; YE, Wen-Cai. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese medicine**, v. 13, p. 1-26, 2018.

ZHENG, Wei *et al.* Purification, characterization and immunomodulating activity of a polysaccharide from flowers of *Abelmoschus esculentus*. **Carbohydrate polymers**, v. 106, p. 335-342, 2014.

ANEXO 1 – Aprovação do comitê de ética



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

CERTIFICADO - 6ª Via

Certificamos que a proposta intitulada *"Avaliação do efeito antitumoral do extrato obtido a partir da espécie *Abelmoschus esculentus* em modelo de tumor de Ehrlich"*, registrada com o nº 20/2019, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Jamylle Nunes de Souza Ferro**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 14 de novembro de 2019.

Vigência da autorização	26.11.2019 a 31.09.2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	420
Peso/idade	25-35 g / 8-12 sem
Sexo	Fêmeas
Origem/Local de manutenção	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório – CEMIB da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP / Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular do ICBS/UFAL
Colaboradores	Tayhana Souza, Julianderson Carmo, Maria Eduarda Santos, Juliane Silva, Everlaine Silva, Jennifer Souza, Liliâne Tenório; James Almeida; Débora dos Santos, Marvin Lins, Maria Cleidiane dos Santos, Fernanda da Silva, Ellen Lourenço e Cecília
	Figueiredo

Maceió, 19 de abril de 2023.

Documento assinado digitalmente
 LÁZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS
 Data: 19/04/2023 10:08:29-0300
 Verifique em <https://validar.uf.gov.br>

Lázaro Wender Oliveira de Jesus
 Coordenador da CEUA
 Siape nº 126558

Revogada 5ª via do parecer emitido em 22/11/2022 e aprovado em 22/10/2022.

ANEXO 2 – Produtos gerados a partir dos dados da dissertação

Artigo oriundo da dissertação de mestrado (em processo final de ajustes para submissão):

Evaluating the Antineoplastic Potential of *Abelmoschus esculentus* Extract in a Murine Model of Ehrlich Ascites Carcinoma

Autores: Everlaine Leite Estevam dos Santos¹, Tayhana Priscila Medeiros Souza¹, Julianderson de Oliveira dos Santos Carmo¹, Jonata Felix Flor¹, Cecília Gomes Figueiredo¹, Fernanda Alexandre Silva¹, José Yago Rodrigues Silva², Emiliano de Oliveira Barreto¹, Ivone Antônia de Souza², Severino Alves Júnior², Jamylle Nunes de Souza Ferro¹.

¹Federal University of Alagoas (UFAL), s/n, 57072-970, Maceió, AL; ²Federal University of Pernambuco (UFPE), 1235, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Revista: Journal Ethnopharmacology

*Corresponding author E-mail address: jamylle.ferro@icbs.ufal.br (Ferro JNC)

Tel/Fax: +55 (82) 32141704

Dados apresentados em congressos internacionais:

1. The Aqueous Extract Obtained from *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench has an Antitumor Effect in the Ascitic Ehrlich Tumor Model

Trabalho apresentado no 54th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE). Agraciado com menção honrosa.

2. The aqueous extract obtained from *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench exhibits antitumor effects without causing immunotoxicity in mice with ehrlich ascites carcinoma

Trabalho apresentado no 3rd Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry. Agraciado com menção honrosa.

Dados apresentados em evento local:

1. Efeito do extrato aquoso obtido a partir de *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench sobre órgãos linfoides de camundongos portadores do tumor de Ehrlich ascítico

Trabalho apresentado na XXXVIII Semana de Biologia – ICBS/UFAL. Agraciado com menção honrosa.