

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

REGINALDO KELLER FERNANDES

MICHELLE C. SORIANI

**EFEITO DO TRATAMENTO COM AVELÓS (*Euphorbia
titucalli* L.) SOBRE O TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich**

BAURU
2010

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

REGINALDO KELLER FERNANDES

MICHELLE C. SORIANI

**Efeito do tratamento com avelós (*Euphorbia titucalli* L.) sobre
o tumor ascítico de Ehrlich**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
Biológicas e Profissões da Saúde como
parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Ciências Biológicas,
sob orientação da Prof.^a Dr.^a Dulce Helena
Jardim Constantino.

**BAURU
2010**

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a Deus e a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho, principalmente a Universidade Sagrado Coração.

EFEITO DO TRATAMENTO COM AVELÓS (*Euphorbia titucalli* L.) SOBRE O
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

Michelle C. Soriani*¹, Dulce H. J. Constantino¹

¹Universidade Sagrado Coração - USC, Rua Irmã Arminda 10-50, Jardim Brasil, CEP:
17011-160, Bauru-SP, Brasil

RESUMO: “Efeito do tratamento com Avelós (*Euphorbia titucalli* L.) sobre o Tumor Ascítico de Ehrlich.” Atualmente há interesse em estudar novas terapias até então utilizadas de forma empírica, na busca de novas alternativas de combate ao câncer. Neste estudo utilizou-se 14 camundongos machos, distribuídos em grupo experimental e controle, inoculados com 10^3 células tumorais via intraperitoneal. O grupo experimental foi tratado durante 3 dias consecutivos com o látex de Avelós diluído em água destilada, via intraperitoneal, com início 4 dias após a inoculação do tumor, sendo sacrificados 12h após o último tratamento. No grupo controle administrou-se água destilada seguindo o mesmo procedimento do grupo experimental. Após eutanásia, recolheu-se o lavado peritoneal para a determinação do número de células tumorais em câmara de Neubauer. A mensuração do NO foi realizada através de nitritos existentes nos sobrenadantes dos lavados e determinada pelo método de Griess com leitura da densidade óptica a 540 nm. O tratamento com látex não apresentou diferença significativa sobre o número de células tumorais (controle: $2,1 \times 10^5 \pm 1,8$ células tumorais/mL; teste: $3,1 \times 10^5 \pm 1,1$ células tumorais/mL), porém podemos sugerir uma tendência em favorecer o crescimento tumoral. Com relação à produção de NO constatamos uma tendência na indução à produção do mesmo.

UNITERMOS: Avelós, Tumor de Ehrlich, medicina popular.

*E-mail: michelle.soriani@usc.br, tel. +55-14-2107 7000

ABSTRACT: Currently there is interest in studying therapies hitherto used empirically in the search for new alternatives in fighting cancer. In this study used 14 mice males, distributed in experimental and control group, inoculated with 10^3 intraperitoneal tumor cells. The experimental group was treated for 3 consecutive days with the latex aveloz diluted in distilled water, intraperitoneal, beginning 4 days after inoculation of tumor, being sacrificed after the last treatment. In the control group administered pure distilled water by following the same procedure of experimental group. After euthanasia, collected the peritoneal washed for determining the number of tumor cells in chamber of Neubauer. The measurement of nitric oxide (NO) was performed through existing nitrites in supernatants of washed and determined by Griess method with reading of optical density at 540 nm. Treatment with latex not presented significant difference on the number of tumor cells, but we can suggest a trend in favor the tumor growth. With respect to production we see a trend in the induction to the production of the same.

Keywords: Avelós, Tumor of Ehrlich, folk medicine.

INTRODUÇÃO

O Avelós (*Euphorbia tirucalli* L.), planta da família Euphobiaceae, nativa de Madagascar, sul do continente africano, foi introduzido inicialmente no nordeste brasileiro em 1892, passando a ser cultivado na maioria dos estados do nordeste como cercas-vivas para a proteção contra invasores nas propriedades particulares (Oliveira & Nepomuceno, 2004). Atualmente sendo encontrado com facilidade nas diversas regiões do país é utilizado principalmente em paisagismo. A planta possui folhas e flores muito pequenas que geralmente passam despercebidas, deixando apenas galhos verde-brilhantes (Caseiro et al., 2006).

Podendo chegar a 6 metros é conhecido popularmente por árvore-do-lápis, dedo-de-moça, coroa-de-cristo (Granja, 2003), entre outros. Nas diferentes plantas desta família, verifica-se um látex cáustico (Granja, 2003) com efeito de alta irritabilidade da pele e olhos, podendo provocar conjuntivite gravíssima além de queimaduras (Oliveira & Nepomuceno, 2004). A intoxicação aguda por via oral leva a diarreia, vômitos e sensação de queimação nas mucosas (Varrichio et al., 2008), em doses elevadas pode acorrer à coagulação do sangue e até mesmo hemorragia podendo ser letal (Caseiro et al., 2006). Na *E. tirucalli* foram isolados componentes bioativos identificados como forbol éster e seus diterpenos similares (Granja, 2003; Rojas et al., 2008) estes são estudados como sendo promotores do linfoma de Burkitt e carcinoma nasofaríngeo (Caseiro et al., 2006). Outras plantas do gênero *Euphorbia* e também de gêneros diferentes cujas quais têm em sua constituição os diterpenos tem provado grande eficácia contra o crescimento tumoral principalmente através da despolimerização dos microtúbulos necessário para a replicação celular fazendo assim com que não ocorra a divisão (Souza, 2004).

O conhecimento relacionado ao uso de plantas na medicina popular vem desde os

povos indígenas, e ainda perdura pelos dias de hoje acompanhando a evolução do ser humano (Rezende et al., 2004).

O presente trabalho fez uso da seiva de Avelós no tratamento do Tumor Ascítico de Ehrlich, descrito pela primeira vez por Eherlich (Ehrlich & Apolant, 1905 apud. Granja, 2003) como sendo um adenocarcinoma de mama de origem espontânea encontrado em camundongos caracterizado por crescimento bastante rápido, tanto em sua forma sólida como na forma ascítica e teve como objetivos avaliar os efeitos do emprego do látex de Avelós sobre o Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) com relação ao crescimento tumoral, toxicidade hepática e produção de óxido nítrico (NO), um mediador químico com ação pró-inflamatória.

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2000 relataram que 80% da população mundial já fez uso de algum tipo de planta medicinal para o alívio de alguma doença (Cabral & Carnielo, 2004).

O emprego de plantas na medicina é feito de forma alternativa ou complementando medicamentos tradicionais e seus resultados benéficos vêm despertando o interesse dos cientistas em comprovar seu potencial curativo relatado pelo conhecimento popular (Rezende, 2004). Por razões socioeconômicas, sua utilização se dá devido ao fato da facilidade na obtenção das plantas, o baixo custo e a eficiência que demonstra no tratamento e prevenção de doenças (Carneiro et al., 2008).

Pesquisas realizadas a cerca do tema vem avaliando os efeitos farmacológicos das plantas conhecidas popularmente como medicinais, assim como o isolamento dos componentes e seu potencial no tratamento de doenças (Granja, 2003).

Segundo Granja (2003), além da *E. tirucalli*, outras plantas do gênero *Euphorbia*, são utilizadas na medicina popular como anticarcinogênicas, empregadas no tratamento de cancróides, sarcomas, etc. No Brasil a *E. tirucalli* é utilizada popularmente com posologia

empírica como fitoterápico no tratamento de úlceras, cânceres e tumores (Rezende, 2004).

Desde 1987 são utilizadas pelo Instituto Hahnemanniano do Brasil soluções aquosas (homeopáticas) obtidas a partir do extrato total do caule (Varrichio et al., 2009).

Em pesquisa realizada com pacientes que fazem o uso do método caseiro com látex de Avelós existem relatos de melhora nos sintomas da doença ou nos desconfortos provocados pelos tratamentos com quimio e/ou radioterapia (Caseiro et al., 2006).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para a realização deste estudo foram empregados 14 camundongos Balbi/c, machos com 2 meses de idade, fornecidos pelo Instituto Lauro de Sousa Lima - Bauru. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com ingestão de água “ad libitum” e ração comercial específica para camundongos.

Obtenção do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

As células tumorais foram isoladas de camundongos portadores do TAE e mantidas “in vivo” através de passagens sucessivas intraperitoneais em animais de mesma linhagem por repiques semanais através do implante de 10^7 células tumorais. Para o repasse, retirou-se o líquido ascítico do peritônio dos animais doadores através de punção e a suspensão obtida foi lavada por duas vezes em solução fisiológica a 1500 rpm por 10 minutos, sendo o número de células determinado através de contagem em câmara de Neubauer por microscopia óptica. A concentração desejada foi obtida mediante diluição em PBS estéril.

Teste de viabilidade celular

Para que ocorresse a determinação da viabilidade celular foi acrescido um volume de Azul de Trypan na concentração de 0,2%. A seguir, uma gota de suspensão foi colocada entre a lâmina e a lamínula, e procedida à contagem percentual, considerando-se vivas as células que excluíram o corante e mortas aquelas que o incorporaram. Na maior parte dos protocolos são empregadas somente as suspensões que apresentarem viabilidade superior a 95%.

Obtenção da Euphobia tirucalli

A solução de E. tirucalli foi preparada a temperatura ambiente, através da diluição do látex da planta fresca na concentração de 50 µl por 100 ml de água destilada estéril.

Tratamento

Os animais foram distribuídos em 2 grupos de 7 animais, sendo estes o grupo experimental e o grupo controle. Ambos os grupos foram inoculados com 10^3 células tumorais por via intraperitoneal.

Os animais do grupo experimental foram tratados com o extrato de E. tirucalli na dose de 1mL por animal uma vez ao dia, com início 4 dias após a inoculação do tumor, tratados então durante 3 dias consecutivos e sacrificados 12h após o último dia de tratamento.

No grupo controle foi administrada apenas água destilada estéril seguindo o mesmo procedimento descrito para o grupo experimental.

A administração de ambas as soluções foi feita por via intraperitoneal.

Eutanásia

Os animais foram eutanasiados com dose letal de ketamina (0,1mL) e xylasina (0,2mL), administrada por via intraperitoneal com auxílio de seringa hipodérmica. Durante todo o desenvolvimento experimental e no momento da eutanásia foram tomados todos os cuidados para que o animal fosse submetido ao mínimo de sofrimento.

Obtenção do lavado peritoneal e coleta de fígado para análise histopatológica.

Após eutanásia dos animais, limpou-se a pele com álcool 70% onde foi introduzido na cavidade peritoneal com o auxílio de uma seringa descartável 3 ml de solução fisiológica. O

abdome foi massageado e posteriormente realizada uma incisão para introdução de pipeta de Pasteur recolhendo o lavado peritoneal.

Foram coletados então, fragmentos do fígado dos animais imediatamente colocados em solução de formol a 10% para posterior análise histopatológica.

Avaliação do crescimento tumoral

A suspensão de células obtidas a partir do lavado peritoneal foi diluída na proporção de 1:10, uma alíquota de 0,5ml foi separada. Posteriormente as células tumorais foram contadas em câmara de Neubauer através de microscopia óptica.

Avaliação da produção de óxido nítrico

A determinação da concentração de nitrito é uma forma indireta de se determinar a concentração de óxido nítrico (NO). Este procedimento foi realizado utilizando-se o método de Griess, que consiste em adicionar 500 µl do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naphtylenediamina a 0,1% em água destilada) a 500 µl do lavado peritoneal. Posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm, e a concentração de nitrito será expressa em uM.

Análise estatística

Inicialmente foi empregado o teste de normalidade de Komogorov-Smirnov. Posteriormente, utilizou-se o teste de hipótese T de Student no modo pareado e de médias independentes, no sentido de analisar comparativamente os valores médios de células tumorais. No estudo estatístico foi considerado um nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

Neste estudo, nosso principal objetivo foi avaliar o efeito do tratamento com látex de Avelós no desenvolvimento do TAE. Para tanto os animais foram inoculados com o tumor por via intraperitoneal e tratados por 3 dias. O início do tratamento deu-se após 4 dias da inoculação para a verificação dos efeitos após a implantação e início do crescimento tumoral. O grupo controle foi tratado com 0,1 ml de água destilada estéril e o grupo experimental recebeu a mesma proporção da solução do látex de Avelós. Posteriormente, o lavado obtido foi removido e realizou-se a contagem total do número de células em câmara de Neubauer. Parte do lavado foi utilizado para a avaliação da produção de NO através do método de Griess.

Pudemos através dos resultados obtidos neste estudo, constatar que o tratamento com látex de Avelós não apresentou diferença estatisticamente significativa sobre o número total de células tumorais presentes no lavado peritoneal em ambos os grupos. O grupo controle, tratado com água destilada estéril, apresentou uma média de $2,1 \times 10^5 \pm 1,8$ células tumorais/mL enquanto o grupo teste tratado com a solução de látex de aveloz, apresentou um discreto crescimento no número de células tumorais com média de $3,1 \times 10^5 \pm 1,1$ células tumorais/mL. Portanto podemos sugerir uma tendência do mesmo em favorecer o crescimento tumoral. Tais dados podem ser observados na Tabela 1 e Gráfico 1. Com relação à produção de NO constatamos também uma tendência do tratamento com Avelós na indução a produção do mesmo. Os resultados podem ser vistos na Tabela 2 e Gráfico 2.

A análise dos cortes histológicos de fígado corados pela Hematoxilina-Eosina revelou apenas alterações discretas em relação ao grupo controle. Observou-se discreta vacuolização do citoplasma e ausência de necrose ou esteatose hepáticas. A vacuolização é

compatível com lesão por acúmulo intracelular de água (degeneração hidrópica), porém discreta e reversível. Com base em nossos resultados podemos inferir que o tratamento com Avelós estimula a produção de NO e que, este estaria relacionado à facilitação do crescimento do TAE. Estudos posteriores são necessários com intuito de ampliar a amostra e esclarecer tais efeitos.

DISCUSSÃO

O uso popular do Avelós se baseia na ingestão de aproximadamente 2 gotas do látex em um copo de água uma vez ao dia. Neste estudo a dose empregada foi de 50 µl do látex diluído em 100 ml de água destilada estéril por via intraperitoneal.

Constatamos que o tratamento com Avelós não promoveu efeitos significativos sobre o crescimento das células tumorais, mas notamos uma tendência ao aumento no número das mesmas.

A respeito da toxicidade do látex, observamos que não houve grandes alterações presentes nos cortes histológicos, com bases nos resultado de Camargo, et al. (1998) o uso dos extratos de diferentes espécies de Euphorbia, apresentam baixa toxicidade e o extrato “in natura” foi considerado o menos tóxico.

Constatamos também que ocorreu um aumento na produção do NO, o qual podemos inferir ser o responsável pelo sutil aumento na quantidade de células tumorais observado nos animais do grupo experimental, tendo em vista que o NO é citotóxico e vasodilatador que modula as reações inflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo podendo também pode ser responsável pela vasodilatação e pela angiogênese (Cerqueira & Yoshida, 2002; Costa et al., 2003), podendo assim estes fatores terem influenciado na ocorrência de hemólise na amostra. O NO é capaz de modular “in vivo” a produção do VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) um potente mediador angiogênico, porém se mostra reduzido frente à elevação na produção de NO, mas por um mecanismo diferente, o NO estimula a angiogênese relacionada ao FGF-β (Fibroblast Growth Factor - β) (Ziche et al., 1999). Outro ponto importante e alvo de estudo recente é de que o NO selecionaria populações de células neoplásicas resistentes à apoptose induzida por linfócitos T citotóxicos, mais uma vez favorecendo o crescimento tumoral (Su et al., 2006). Os dados na literatura são

antagônicos em relação ao papel do NO, é variável em função do tipo tumoral e também em função da fase evolutiva em que se encontra o mesmo.

O extrato etanólico obtido de plantas do gênero *Euphorbia* apresentam em sua constituição diterpenos que afetariam a divisão celular impedindo a progressão da fase G2 para M na anáfase (Camargo et al., 1998) por serem capazes de atuarem na estabilização dos microtúbulos, podendo ocorrer a morte celular ou a resistência das células, assim continuariam a se multiplicar (Souza, 2004).

Segundo Yoshida et al. (1996) os diterpenos tem efeito antiproliferativo in vivo, o que nos faz acreditar que não atue diretamente mas que há interação com alguma substância do organismo para produzir seu efeito.

Para Roe e Peirce (2004), o látex de diferentes espécies de *Euphorbia* não apresentam efeito pro- carcinogênico, ou seja, a capacidade de induzir à proliferação cancerosa de células mutantes.

Como foi avaliado apenas um curto período não podemos afirmar se em um tratamento mais precoce os mesmos efeitos seriam constatados sobre a produção de NO e quantidade de células tumorais, visto que em outro estudos sob diferentes formas de administração e diferentes tipos de tumor obteve-se um efeito anti-tumor. Estudos posteriores são necessários com intuito de ampliar a amostra e esclarecer tais efeitos.

REFERÊNCIAS

CABRAL C D O, CARNIELO M A 2004. Formas de uso medicinal da aroeira, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., em Porto Limão, Cáceres, MT. IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio Econômicos do Pantanal. Corumbá, Brasil.

Camargo M et al. 1998. Efecto sobre el ciclo celular de extratos de *Euphorbia aphylla*. *Actual Biol* 69:121-130.

Carneiro M J C 2008. A diversidade de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do bairro Brasília, Altamira-PA. <http://www.fvpp.org.br/fotos/biblioteca/pv02.pdf>, acesso em novembro 2010.

Caseiro B M et al. 2006. Estudo do potencial de cura de formas de câncer utilizando Aveloz (*Euphorbia Tirucalli*). I Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (I MICTI). Camburiú, Brasil.

Cerqueira N F, Yoshida W B 2002. Óxido Nítrico: Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira* 6: 417-423. Costa M T et al. 2003. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Ciência Rural* 5: 967-974.

Ehrlich P, Apolant T 1905. Beobachtungen wiber maligne mausetumoren. *Berliner Klunisch Wochenschrift* 28: 871-874, apud Efeito do estrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli* sobre a resposta hematopoiética em camundongos portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich. 76 p. 2003.

Granja S 2003. Efeito do estrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli* sobre a resposta hematopoiética em camundongos portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich. Campinas, 76 p. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Oliveira A P, Nepomuceno J C 2004. Avaliação dos efeitos genotóxicos e antígenotóxicos do Aveloz (*Euphorbia Tirucalli*) em *Drosophila Melanogaster*. *Jornal de biociência* 2:179-186.

Rezende J R et al. 2004. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. *Acta Scientiarum* 4: 481-484.

Roe F J C, Peirce E H W 2004. Tumor Promotion by *Euphorbia Latices**. *Cancer Research* 21: 338-345.

Souza M V N 2008. Novos produtos naturais capazes de atuar da estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova* 2:308-312.

Su et al. 2006. Nitric Oxide Promotes Resistance to Tumor Suppression by CTLs¹. *The Journal of immunology* 176: 3923-3930.

Varrichio M C B N et al. 2008. Efeitos toxicológicos crônicos do látex bruto de E. Tirucalli (Aveloz) sobre peso de fígado e baço conforme uso tradicional: Um estudo preliminar. Revista de Biologia e Farmácia (BioFar) 2: 6.

Varrichio M C B N, Silva S, Varrichio M T 2009. Euphorbia Tirucalli: Redimensionamento clínico e contribuição à graduação e a pós-graduação após pesquisa em biotecnologia vegetal. Revista de Biologia e Farmácia (BioFar) 1: 71.

Varrichio M CB N et al. 2008. O uso de Euphorbia Tirucalli (Aveloz) em medicina tradicional e as evidências científicas. Revista de Biologia e Farmácia (BioFar) 3:84.

Yoshida M et al. 1996. Antitumor activity of daphnane-type diterpene gnidimacrin isolated from *Stellera chamaejasme* L. International Journal of Cancer 66: 268-273.

Ziche M et al. 1997. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor- induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. The Journal of Clinical Investigation 11: 2625-2634.

APÊNDICES

Tabela 1. Efeito do tratamento com látex de Avelós sobre o número de células tumorais presentes no lavado peritoneal de animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich.

Tratamento^a	Número de células tumorais ($\times 10^5$)
Água destilada estéril	21,00 \pm 18,63 ^{b, c}
Látex de Avelós	31,20 \pm 11,63

a- Animais foram tratados com água destilada estéril (0,1ml, ip, 1x/dia) ou com látex de Avelós (50 μ l diluídos em 100mL de água destilada, 01mL, ip., 1x/dia), durante 4 dias;

b- Resultados expressos em media \pm desvio padrão;

c- n= 7 animais por grupo

Tabela 2. Efeito do tratamento com látex de Avelós sobre a produção de óxido nítrico (NO) em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Tratamento^a	O (ug/mL)
Água destilada estéril	2,15 \pm 1,07 ^{b, c}
Látex de Avelós	5,70 \pm 1,80*

a- Animais foram tratados com água destilada estéril (0,1ml, ip, 1x/dia) ou com látex de Avelós (50 μ l diluídos em 100mL de água destilada, 01mL, ip., 1x/dia), durante 4 dias;

b- Resultados expressos em media \pm desvio padrão;

c- n= 7 animais por grupo;

* P < 0,005 na comparação com o grupo tratado com água destilada estéril.

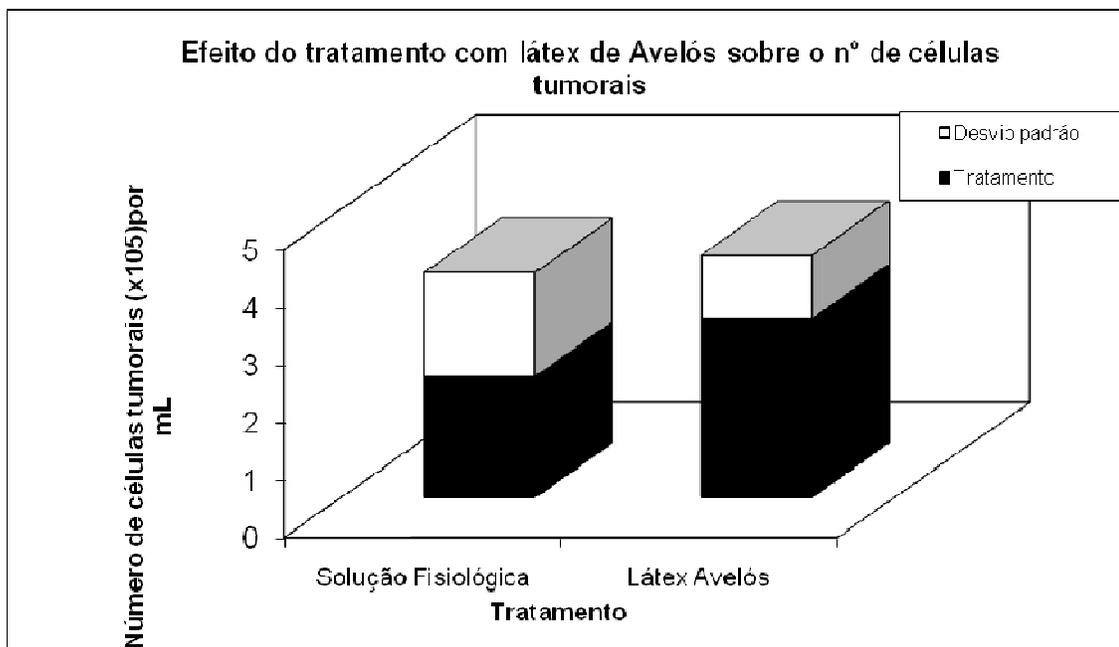


Gráfico 1. Efeito do tratamento com Avelós sobre o número total de células presentes no lavado peritoneal de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

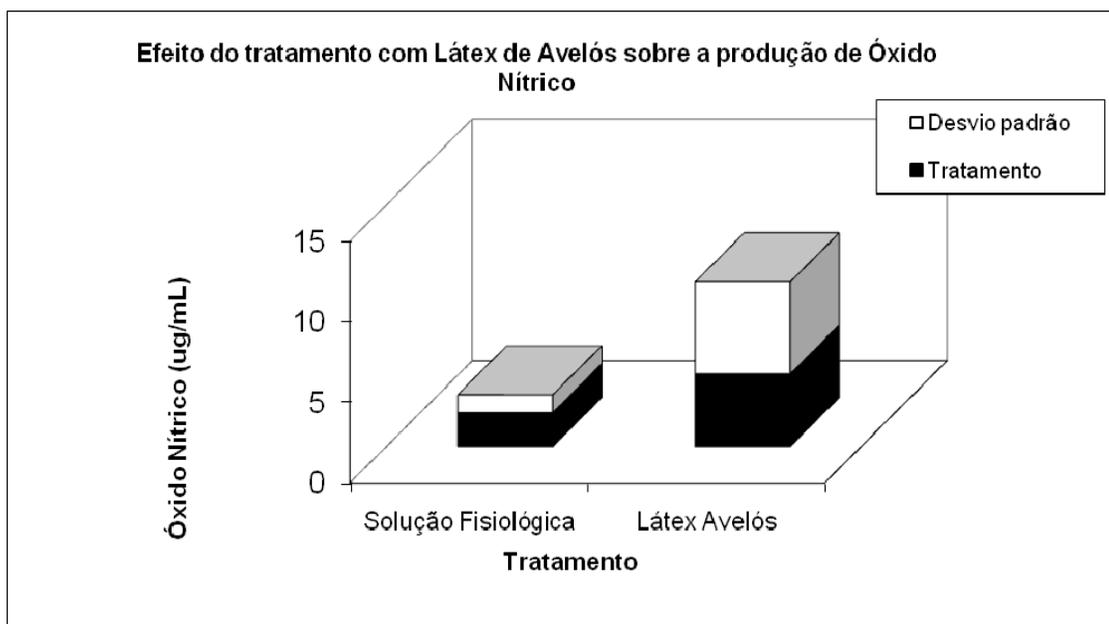


Gráfico 2. Efeito do tratamento com Avelós sobre a produção de NO em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.