

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

MARIA CAROLINA DE MORAES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DE EXTRATOS METANÓLICOS E
ETANÓLICOS DE *Melissa officinalis*,
ADMINISTRADOS EM DIFERENTES FASES DO DIA**

BAURU
2016

MARIA CAROLINA DE MORAES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DE EXTRATOS METANÓLICOS E
ETANÓLICOS DE *Melissa officinalis*,
ADMINISTRADOS EM DIFERENTES FASES DO DIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

BAURU
2016

Pereira, Maria Carolina de Moraes

P4366a

Avaliação de citotoxicidade e mutagenicidade de extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officianalis*, administrados em diferentes fases do dia / Maria Carolina de Moraes Pereira.-- 2016.

57f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)
- Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Erva-cidreira. 2. Citotoxicidade. 3. Mutagenicidade. 4. Tumor de Ehrlich. 5. Ritmos biológicos. I. Bellini, Marilanda Ferreira. II. Título.

MARIA CAROLINA DE MORAES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE
EXTRATOS METANÓLICOS E ETANÓLICOS DE *Melissa officinalis*,
ADMINISTRADOS EM DIFERENTES FASES DO DIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro de Ciências da Saúde como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina, sob orientação da
Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

Banca examinadora:

Profa Dra Marilanda Ferreira Bellini
Universidade do Sagrado Coração (Orientadora)

Profa Dra Lucimara Teixeira das Neves
Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP
Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP

Mestranda Thaís Bernardes de Queiroz
Programa de Biologia Aplicada
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Bauru, 22 de novembro de 2016.

Dedico este trabalho a Deus por ter me sustentado até aqui e aos meus pais, pelo incentivo para concretização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus que me concedeu a graça de concluir mais esta etapa em minha vida, por ter me dado saúde e força para superar os desafios.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me deram todo o suporte durante esses anos da graduação. Obrigada pelo amor, dedicação e confiança.

À minha querida orientadora Profa Dra. Marilanda Ferreira Bellini pelo empenho e pelos ensinamentos transmitidos em todo este período acadêmico. Gratidão pelos conselhos, correções, incentivos e por ter feito este papel com tamanha dedicação. Foi um privilégio trabalhar durante este período com você.

À professora Rita Luiza Peruquetti por colaborar com este trabalho durante toda a fase experimentação e por sempre estar pronta para ajudar.

Às professoras Angela Kinoshita e Márcia Marcelino pelo empréstimo das cânulas de gavagem.

Às alunas Patrícia Morais Pereira e Mayume Yonashiro, por terem dividido muitos momentos no Biotério e nos Laboratórios da Universidade do Sagrado Coração, e principalmente, pelo auxílio que permitiram que este projeto fosse concluído.

À Thaís Bernardes de Queiroz e Jéssica Cristina dos Santos pela ajuda nas análises de viabilidade celular.

À professora Dulce Helena Constantino pela manutenção, repique e inóculo do tumor.

Ao Professor Fernando Neves pelo auxílio no preparo dos extratos. À Veterinária Daniela Farias da Nóbrega pelo auxílio na análise de CDLT. Ao técnico do Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética, Wilson Orcini, por todo suporte técnico.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por financiar este projeto.

À Universidade do Sagrado Coração e todo o corpo docente, pelo ensino de qualidade que me foi oferecido.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma.

“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

RESUMO

Para investigar citotoxicidade e mutagenicidade de extratos etanólicos (EEMO) e metanólico (EMMO) de *Melissa officinalis* – espécie de erva-cidreira- (MO), em diferentes fases do dia, camundongos swiss foram divididos em 8 grupos, distribuídos em 2 salas-Fase Clara (FC) e Fase escura (FE): G1- (FC) saudáveis; G2- (FC) Controle Negativo inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich (CNTE); G3 - (FC) administração de EEMO, inoculados com TE; G4 - (FC) administração de EMMO, inoculados com TE ; G5 - (FE) saudáveis; G6(FE) Controle Negativo inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich (CNTE); G7(FE) administração de EEMO, inoculados com TE; G8 (FE) administração de EMMO, inoculados com TE. 100 mg dos extratos/kg de peso foram administrados, diariamente, 14 dias, via gavagem. No 7º dia, inoculou-se TE (10^3 células). Pesaram-se os animais nos dia 0, 7 e 15; não havendo diferença significativa entre as pesagens. A contagem das células de lavado peritoneal permitiu verificar que FC apresentou em média $4,34 \times 10^6$ células tumorais, indicando o crescimento do tumor, mesmo padrão nos grupos EE e EM. Nos animais do Grupo CNTE-FE houve um aumento ($1,53 \times 10^7$) de células tumorais, e quando se compara aos extratos, observa-se a inibição da progressão do tumor. Todos os tratamentos foram viáveis, tanto em eritrócitos (> 97%) quanto em células tumorais de lavado peritoneal (>82%)(Método de Exclusão de Azul de Trypan).A coloração diferencial de leucócitos indica aumento de resposta inflamatória mediada por linfócitos na FE e por macrófagos na FC. A frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos de medula óssea diminuiu significativamente ao comparar EEMO-FC com EEMO-FE; na FC não houve diminuição da indução de danos, como também não houve potencialização; na FE o EM assemelham-se ao controle, indicando diminuição da frequência de MN. Em esfregaço de sangue periférico, o horário de administração dos extratos não interferiu na atividade dos mesmos. As células tumorais dos grupos EEMO e EMMO na FE apresentaram frequência média dano elevada, sugerindo que esses extratos causaram danos no material genético, direcionando as células tumorais para apoptose (Teste do Cometa); em material de sangue periférico, foi possível identificar aumento significativo de danos nos EEMO e EMMO, administrados em ambas as salas.

Palavras-chave: Erva-cidreira. Mutagenicidade. Citotoxicidade. Tumor de Ehrlich. Ritmos biológicos

ABSTRACT

To investigate cytotoxicity and mutagenicity of ethanol (EEMO) and methanol extracts (EMMO) of *Melissa officinalis* (MO), at different phases of the day, swiss mice were divided in 8 groups, distributed in 2 different rooms - light phase (LP) and dark phase (DP). G1- (NHC-LP) healthy; G2- (NETC-LP) inoculated with Ehrlich ascitic tumor (ET); G3- (ETEEMO- LP) administration of EEMO and inoculated with ET; G4 - (EEMMO- LP) administration of EMMO and inoculated with ET; G5- (NHC-DP) healthy; G6- (NETC-DP) inoculated with Ehrlich ascitic tumor (ET); G7- (ETEEMO-DP) administration of EEMO and inoculated with ET; G8 (EEMMO-DP) administration of EMMO and inoculated with ET. 100 mg of extracts/kg were administrated, daily, 14 days, by gavage. On the 7th day were inoculated ET (10^3 cells). Animals were weighed on 0, 7 and 15 days, there was no significant difference between. The count of peritoneal lavage cells showed that FE presented $4,34 \times 10^6$ tumor cells/mL; indicating tumor growth, same pattern in the EE and EM groups. The CNTE-DP group animals showed a significant increase (1.53×10^7) of tumor cells, and when compared to extracts, inhibition of tumor progression is observed. It was found that all treatments were viable, both in erythrocytes (> 97%) and in tumor cells from peritoneal lavage (> 82%) (Trypan blue exclusion test). The leukocyte differential staining indicates increasing of inflammatory response mediated by lymphocytes in DP and by macrophages in LP. The micronuclei's (MN) frequency in erythrocytes of bone marrow suggests that extracts decrease the induction of MN when comparing EEMO-LP with EEMO-DP; In LP there was no decrease the induction of damage, nor was there any potentiation. In FE the MS resemble control, indicating a decrease in MN frequency. . In slides containing peripheral blood smear was observed that administration of the extracts did not interfere in their activity. Tumor cells of the EEMO and EMMO groups in DP showed high medium damage frequency, suggesting that these extracts have caused damage to the genetic material, directing the tumor cells to apoptosis (Comet assay); in peripheral blood material it was possible to identify an increase in the induction of damage by extracts. In peripheral blood material it was possible to identify an increase in the induction of damage EEMO and EMMO, administered in both rooms.

Key words: Lemon balm. Mutagenicity. Citotoxicity. Ehrlich Tumor. biological rhythms

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Farmacoterapia e Farmacocinética do Tratamento da Ansiedade.....	11
1.2 <i>Melissa officinallis</i>	11
1.3 Tumor de Ehrlich	13
1.4 Ritmos biológicos	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivo específico.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Material Botânico.....	18
3.2 Testes In Vivo.....	18
3.2.1 Grupos experimentais	18
3.2.2 Obtenção, contagem, viabilidade e inóculo das células tumorais	20
3.2.3 Obtenção do lavado peritoneal.....	21
3.2.4 Avaliação do crescimento do tumor.....	21
3.2.5 Contagem de células inflamatórias presentes no lavado peritoneal.....	21
3.2.6 Teste do Micronúcleo em Medula Óssea e Sangue Periférico de Roedores	21
3.2.7 Teste do Cometa.....	23
3.3 Análise Estatística	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1 Acompanhamento massa dos camundongos.....	26
4.6 Teste do Cometa: células tumorais e leucócitos	42
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO: Parecer CEUA	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Farmacoterapia e Farmacocinética do Tratamento da Ansiedade

O homem contemporâneo convive diariamente com agentes estressores, causando ansiedade. Com tantas disparidades, este mundo moderno e competitivo, atrai as pessoas no vazio, na ansiedade, no estresse, na depressão e nas doenças e, muitas vezes a pessoa não consegue reverter este quadro sem a ajuda de profissionais e intervenções farmacoterapêuticas. (ESTEVES, 2009).

É crescente a busca da população brasileira por alternativas naturais, de baixo custo e fácil acesso, para o tratamento de doenças, prevenção e melhoria na qualidade de vida. Nesse cenário, surgem as plantas medicinais, largamente comercializadas, empregadas na tradicional medicina popular, sem que haja uma fiscalização. Por se tratarem de produtos naturais, pensa-se, erroneamente, serem completamente saudáveis, não possuírem contra indicações ou qualquer componente capaz de trazer malefícios ao organismo. (MEIRA; SOUZA; MARTINS, 2010). No entanto, dependendo da dosagem empregada pode ocorrer uma intoxicação ou efeitos adversos, em casos de altas dosagens; ou, em quantidades muito baixas, a ausência dos resultados desejados. (RIGOTTI, 2010). Além disso, algumas medidas adotadas pelos usuários e comerciantes dessas plantas, alteram sua eficácia e segurança na administração. (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005).

Dentre as plantas medicinais utilizadas como ansiolíticas, podemos citar a erva-cidreira, nome popularmente empregado para a espécie *Melissa officinalis* L. (família Lamiaceae), dentre outras. (SIMOES et al., 2001). Variações no óleo essencial destas plantas fizeram com que alguns autores agrupassem-nas em quimiotipos, de acordo com o (s) componente (s) principal (is) de seu óleo, como por exemplo, citral-mirceno e citra-limoneno, ambos com propriedades ansiolíticas. (JEZLER et al., 2012).

1.2 *Melissa officinalis*

Popularmente conhecida como cidreira, erva-cidreira, melissa, chá-de-tabuleiro, cidreira-verdadeira, a *Melissa officinalis* (Figura 1) é uma herbácea perene

e aromática, nativa de regiões da Europa e Ásia e cultivada no Brasil. As folhas são usadas em chás como calmante, e para bronquite crônica, cefaleia, enxaqueca, dores reumáticas e no tratamento de manifestações virais. (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 1 – Espécie de erva-cidreira - *Melissa officinalis*



Fonte: LORENZI; MATOS, 2002, pag 245

Tradicionalmente, o extrato aquoso e alcoólico da planta também é eficaz contra febres e resfriados, indigestão desencadeada por tensão nervosa, hipertireoidismo, depressão, epilepsia, dores de cabeça e dores de dente. (CARVALHO et al., 2011).

Os principais compostos químicos do óleo essencial de *M. officinalis* são citronelol, citral, linalol e geranial. (ADINEE; PIRI; KARAMI, 2008; REIS, 2009). Segundo relatos, o óleo essencial apresenta cerca de 0,5% compostos fenólicos em folhas sendo utilizados como antioxidantes, antiespasmódicos e nos distúrbios gastrintestinais e do sono. (MÜZELL, 2006). Por meio de ensaios farmacológicos descobriu-se que o óleo apresenta efeitos antifúngicos e antibacterianos, assim como a propriedade ansiolítica. Há também indícios das propriedades antioxidantes e antitumorais. (ANGELONI, 2010).

Análises realizadas *in vitro*, com cultura de linhagens de células de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-468 e MDA-MB-231), e *in vivo*, utilizando ratas *Wistar*, nas quais foi induzida carcinogênese mamária, mostraram que o tratamento com extratos de *M. officinalis* induziu apoptose nas células tumorais em ambos os testes. (SARAYDIN et al., 2012).

O tratamento com os extratos de *M. officinalis* em tecidos tumorais de ratos evitou o crescimento e proliferação de células tumorais, verificados pelo decréscimo da atividade do antígeno nuclear Ki-67, e induziu a apoptose, via cascata de caspase, evidenciada pela atividade de caspase-7 ativada por imuno-histoquímica. Foi constatado potencial de inibição de crescimento tumoral do extrato bruto de *M. officinalis*, com a redução em 40% do volume do tumor mamário de ratas que foram tratados com a planta. Contudo, não se sabe ainda quais são os componentes da planta responsáveis por essas atividades. (SARAYDIN et al., 2012).

Em estudo realizado por Carvalho et al. (2011), células sanguíneas periféricas de ratos receberam tratamento com extratos aquoso (1000 mg/kg) e etanólico (500 mg/kg) de *M. officinalis*, por 15 dias, para verificar a manifestação de danos no DNA dessas células. Ao final, deduziu-se que os efeitos genotóxicos a essas células foram nulos. A avaliação do potencial antigenotóxico do extrato etanólico de *M. officinalis* (250 mg/kg) e (500 mg/kg) em ratos, utilizando os testes de micronúcleo (MN) e cometa (SCGE, *single cell gel eletrophoresis*), evidenciaram efeito antimutagênico pelo teste MN, seja pela diminuição da indução do dano ou pelo aumento no reparo do DNA; e atividade antigenotóxica, com redução de lesões primárias causadas ao DNA pelo agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS), através de SCGE. Desta forma, *M. officinalis* mostrou-se efetiva na prevenção de lesões no DNA. (CARVALHO et al., 2011).

Na literatura não houve o relato de danos no DNA causados pela *M. officinalis*; por outro lado, diversos estudos relatam atividade citotóxica seletiva, antimutagênica e anticarcinogênica desses ansiolíticos naturais. (SIMÕES, 2001; CARVALHO, 2011; SARADYNI, 2012; QUEIROZ, 2012).

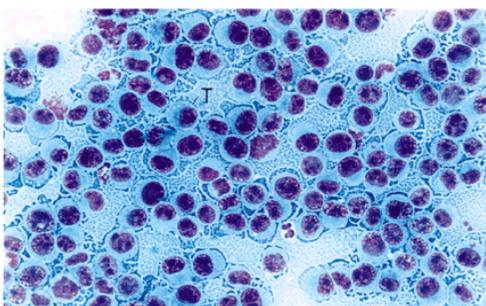
1.3 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich, descrito por Paul Ehrlich em 1906, é uma neoplasia de camundongos, transplantável, constituída de células de origem epitelial, um adenocarcinoma de mama. (EHRlich; APOLANT, 1906).

Quando inoculado na cavidade abdominal, as células tumorais crescem na sua forma ascítica desenvolvendo uma carcinomatose peritoneal (Figura 2). Essa forma tem como característica grande acúmulo de fluidos no abdome (ascite) e uma

baixa resposta inflamatória, com pequena infiltração de macrófagos e um influxo tardio de células polimorfonucleares para a cavidade (a partir de sexto dia após a inoculação). (FECCHIO, 1990; HOSSNE, 2002). O tumor de Ehrlich sólido pode ser descrito morfológicamente com células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais. (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992).

Figura 2 – Células tumorais



Fonte: HOSSNE et. al. 2003

O tumor de Ehrlich é bom modelo para estudos envolvendo citologia, por crescer na forma ascítica, o que permite a obtenção de células tumorais isoladas. (HOSSNE, 2002).

1.4 Ritmos biológicos

Ritmos biológicos podem ser definidos como alterações biológicas ou comportamentais que se repetem regularmente, sendo que os mais estudados são os ciclos circadianos, aqueles se repetem a cada 24 horas. (MARQUES; MENNA-BARRETO, 1997). Segundo Pereira et al. (2009), ritmos circadianos podem ser eventos fisiológicos, bioquímicos ou comportamentais essenciais para a sobrevivência. Podem ser gerados endogenamente, como também controlados por sincronizadores externos ambientais, como luz, alimentação e outros fatores.

Além disso, os ritmos circadianos são responsáveis pelo controle do metabolismo, transporte de drogas, progressão do ciclo celular, reparo no DNA e

apoptose (LEVI; SCHIBLER,2007), apresentando ligação com o desenvolvimento do câncer, por estar relacionado com desenvolvimento e progressão das células. O conjunto de proteínas denominadas *clock* é responsável por gerar controle de mecanismos circadianos, regulados por mecanismos transcricional, pós-transducional, inibindo ou induzindo processos de maneira cíclica. (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009).

A cronoterapia é uma técnica que relaciona ritmos biológicos com a administração de drogas para determinadas patologias, em dados momentos do dia, a partir de variações circadianas que influenciam na resposta terapêutica eficaz para o tratamento. (LIN; KAWASHIMA, 2012).

O aparecimento de uma patologia não necessariamente é influenciado pelo ritmo circadiano, porém cada patologia possui seu ritmo biológico, em que sinais e sintomas se agravam ou melhoram em determinadas horas do dia, ou até meses ou anos. No caso do câncer, a cronoterapia tem se mostrado promissora na melhora da tolerabilidade e eficácia da medicação a curto prazo. Estudos comprovam que alguns tipos de drogas para esta patologia se mostram menos tóxicas quando administradas em um determinado período (doxorrubicina - no período da manhã), outras se fixam melhor as proteínas plasmáticas (cisplatina - durante o período da noite), ou ainda um aumento de atividades enzimáticas de degradação em determinado horário. (ACÚRCIO; RORIGUES, 2009). Há também, estudos que indicam que alguns produtos químicos classificados como genotóxicos apresentaram toxicidade elevada, em termos de incidência de tumor, quando administrados no início da manhã. (SANCAR, 2014).

Apesar dos estudos já realizados utilizando-se os extratos e óleos de *Melissa officinalis*, há ainda poucos relatos na literatura sobre os potenciais genotóxicos desta espécie. Diante do exposto, um estudo comparativo acerca da citotoxicidade seletiva em células de tumor de Ehrlich e mutagenicidade de extratos de *M. officinalis*, torna-se relevante, tendo em vista o uso em larga escala deste ansiolítico, seja na medicina popular ou na alopática, no tratamento da ansiedade. Associando também, a importância extrema de se avaliar os efeitos da administração dos extratos em dois diferentes momentos do dia, já que estudos relatam que o ritmo

biológico dos animais possui relação com o metabolismo geral, além de direcionar a uma melhor resposta terapêutica aos fármacos com propriedades antitumorais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os potenciais citotóxicos e mutagênicos de extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis*, administrados em dois diferentes momentos do dia, *in vivo*.

2.2 Objetivo específico

- a) Testar citotoxicidade dos extratos etanólicos e metanólicos de *M. officinallis* em células de tumor de Ehrlich e células sanguíneas, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan;
- b) Avaliar atividade mutagênica dos extratos etanólicos e metanólicos de *M. officinallis*, através do Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores e sangue periférico; e Teste do cometa, em células tumorais e sangue periférico;
- c) Investigar o aparecimento de células inflamatórias do lavado peritoneal dos animais pela contagem diferencial de leucócitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

O material botânico de *Melissa officinalis* (partes aérea) foi obtido, já desidratado, do Laboratório Panizza Ltda (CNPJ: 01.807.328/0001-87), onde as plantas foram mantidas em ambiente climatizado, com rígido controle de qualidade, conforme determinado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os extratos metanólicos e etanólicos utilizados neste trabalho foram preparados no Laboratório de Controle Físico-químico de Medicamentos (USC- Universidade do Sagrado Coração), segundo Zelnick et. al. (1977), pela bióloga Thaís Bernardes de Queiroz em seu trabalho de conclusão de curso (QUEIROZ; BELLINI, 2013), sob supervisão do Prof. Me. Fernando T. A. Neves.

3.2 Testes *In Vivo*

Testes *in vivo* foram realizados com 40 camundongos suíços, machos, com idade entre 70 e 85 dias, procedentes do biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, sob coordenação da Prof.^a Dr.^a Dulce Helena Constantino. No decorrer dos experimentos, os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno, receberam água proveniente do sistema de distribuição de água da USC (*ad libitum*), ração comercial específica para camundongos, ciclos de 12h de claro/escuro, temperatura entre 24 ± 2 °C e $60 \pm 5\%$ umidade. Os animais foram observados, diariamente, para verificação de sinais clínicos de toxicidade como arrepios, relutância em se movimentar, respiração ofegante, convulsões e tremores.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Institucional (CEUA/USC N° 8706290315) e segue as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 8 grupos com 5 animais, sendo que os grupos 1, 2, 3 e 4 ficaram alojados em uma Fase clara (FC), enquanto que os grupos 5, 6, 7

e 8 ficaram em uma Fase Escura (LE). A sala FC possuía fotoperíodo convencional - luzes se acendiam as 7h e se apagavam as 19h. A sala FE possuía fotoperíodo invertido – luzes se apagavam as 7h e se acendiam as 19h.

1) Controle Negativo Saudável (Camundongos saudáveis, não-inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich, com administração de água autoclavada durante o dia, mantidos na Fase Clara);

2) Controle Negativo Tumoral (Camundongos inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich, com administração de água autoclavada, mantidos em fase Clara);

3) Camundongos inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich + administração de Extrato Etanólico de *M. officinallis*(EEMO), mantidos em fase Clara;

4) Camundongos inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich + administração de Extrato Metanólico de *M. officinallis*(EMMO) mantidos em fase Clara.

5) Controle Negativo Saudável (Camundongos saudáveis, não-inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich, com administração de água autoclavada), mantidos em Fase Escura;

6) Controle Negativo Tumoral (Camundongos inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich, com administração de água autoclavada), mantidos em Fase Escura;

7) Camundongos inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich + administração de Extrato Etanólico de *M. officinallis*(EEMO), mantidos em Fase Escura;

8) Camundongos inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich + administração de Extrato Metanólico de *M. officinallis*(EMMO), mantidos Fase Escura.

Passaram por um período de 7 dias de aclimatação. Durante 14 dias foram administrados, via gavagem 100 mg dos extratos diluídos em água destilada e autoclavada/kg de peso corpóreo (CARVALHO et al, 2011). A administração era feita uma hora após as luzes serem acessas, fase Clara e uma hora após as luzes serem apagadas na Fase Escura (Figura 3). No 7º dia após o início dos tratamentos, os animais foram inoculados com tumor ascítico de Ehrlich ($1,0 \times 10^3$ células).

Figura 3- Camundongo recebendo o tratamento, via gavagem



Fonte: Arquivo pessoal

No 15^o dia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, um método aceito com restrições pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), porém, necessário para que as drogas não interferissem sobre as células neoplásicas.

3.2.2 Obtenção, contagem, viabilidade e inóculo das células tumorais

O Tumor Ascítico de Ehrlich é repicado semanalmente, por meio de transplantes intraperitoneais, em camundongos mantidos no Biotério Central da Universidade do Sagrado Coração. Para a manutenção das células neoplásicas, camundongos com aproximadamente 7 dias de evolução do tumoral são eutanasiados por deslocamento cervical, para a manutenção do tumor “*in vivo*” através de repiques semanais. Aproximadamente, 3 mL do fluido ascítico foi aspirado com seringas e agulhas descartáveis, após laparotomia. Essas células foram ressuspensas em tampão fosfato-salino (PBS).

A viabilidade celular/citotoxicidade foi verificada pelo método de exclusão de Azul de Trypan, onde 0,8mL da suspensão celular foram adicionados a 0,2mL de corante Azul Trypan e 10 μ L desta solução foram depositados em câmara de Neubauer, encaminhadas para microscopia de luz, e procedeu-se a contagem de células viáveis (não coradas) e células não-viáveis (coradas).

Os camundongos foram inoculados, intraperitonealmente, com suspensão celular de Tumor Ascítico de Ehrlich ($1,0 \times 10^3$ células), que apresentaram viabilidade celular $\geq 95\%$, no 7º dia experimental.

3.2.3 Obtenção do lavado peritoneal

Após a eutanásia, o animal foi posicionado em decúbito ventral e foi realizada uma antissepsia do abdome com etanol a 70%. Com auxílio de seringa descartável, foram injetados 3 mL de PBS e, com o objetivo de desprender as células tumorais das vísceras, o abdome foi massageado cuidadosamente. Posteriormente, foi realizada uma incisão na parte superior do abdome e o líquido ascítico foi recolhido, com auxílio de pipeta automática de 1000 μ L, em tubos Falcon.

3.2.4 Avaliação do crescimento do tumor

Após homogeneização do lavado peritoneal, uma alíquota de 80 μ L foi incubada com 120 μ L de solução aquosa de Azul de Trypan. As suspensões celulares foram analisadas em câmara de Neubauer, tendo-se o cuidado de realizar a contagem de células tumorais e a viabilidade celular. A viabilidade celular de eritrócitos também foi realizada a partir do sangue periférico dos animais.

3.2.5 Contagem de células inflamatórias presentes no lavado peritoneal

Realizou-se esfregaço de 200 μ L do lavado peritoneal, corados com Giemsa 5%. Posteriormente realizou-se a contagem diferencial de leucócitos mono e polimorfonucleares, tendo-se o cuidado de avaliar um total de 100 células por lâmina em campos microscópicos não coincidentes, chegando ao percentual relativo de cada célula inflamatória pesquisada.

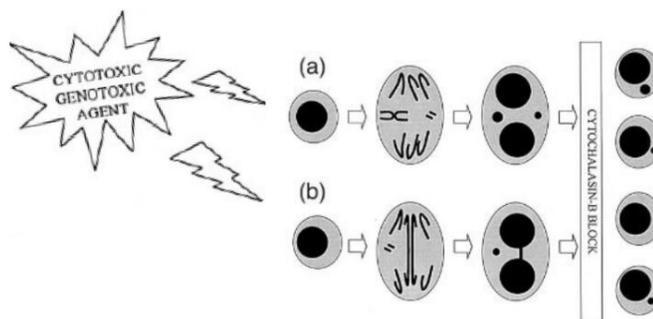
3.2.6 Teste do Micronúcleo em Medula Óssea e Sangue Periférico de Roedores

Mutação pode ser definida como toda e qualquer alteração no DNA (ALMEIDA; XAVIER, 2005), podendo ser transmitida aos descendentes, se forem

atingidas células germinativas, gerando indivíduos com uma ou mais características genéticas diferentes. (COSTA et al., 2005).

Schmid, em 1975 definiu o teste do Micronúcleo (Figura 4) como um modo de detectar danos cromossômicos ou cromatídicos. Foi desenvolvido por Matter e Schmid (1971), *in vivo*, em eritrócitos de medula óssea de camundongo. Micronúcleos (MN) são fragmentos de cromossomos acêntricos que não foram incorporados ao núcleo, ou ainda cromossomos inteiros que durante a anáfase não migraram para os pólos da célula. (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). A ANVISA, em seu Regulamento Técnico para medicamentos fitoterápicos recomenda o teste de micronúcleo *in vivo* para avaliação de genotoxicidade, pela detecção de danos em células hematopoiéticas de roedores.

Figura 4 – Formação de Micronúcleo



Fonte: FENECH 2002 com modificações

O teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores foi baseado em Salvadori, Ribeiro e Fenech (2003). Após eutanásia do animal, foi cortada a pele que cobre a perna e retirou-se o fêmur. A extremidade final e proximal do fêmur foi cortada para expor o canal da medula. A agulha de uma seringa de 1 mL, previamente preenchida com soro fetal bovino, foi inserida firmemente na abertura do fêmur, injetando-se o soro, de modo a empurrar a medula para dentro de um tubo cônico, previamente marcado com o código do animal. A suspensão celular foi centrifugada, por 5 minutos, a 1000 RPM, e o sobrenadante descartado com o auxílio da pipeta de Pasteur. Com esse material foram realizados os esfregaços de medula óssea.

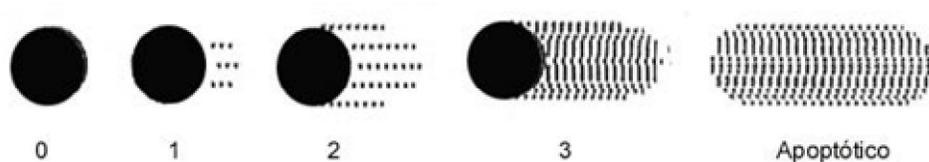
Esfregaços de sangue periférico também foram realizados, com sangue obtido da cavidade abdominal do animal.

Após secagem em temperatura ambiente, as preparações foram coradas com corante hematológico Leishman (1,5g Leishman-azul de metileno, diluído em 1000 mL de metanol) por 3 minutos, posteriormente as lâminas foram transferidas para uma cuba com corante Leishman, diluído em água destilada na proporção de 1:6, por 15 minutos. Após esse tempo, foram lavadas em água corrente e água destilada. A análise das lâminas foi realizada com a utilização do microscópio de luz, contando de 2000 eritrócitos policromáticos (em medula óssea) e normocromáticos (em sangue periférico) contabilizando-se as células micronucleadas por animal.

3.2.7 Teste do Cometa

Single Cell Gel Eletrophoresis (SCGE) ou Cometa tem como objetivo detectar lesões genômicas que podem causar mutação (ALBERTINI et al., 2000), sendo que aquelas células com DNA danificado se assemelham a um cometa, e sua cauda é formada por DNA extravasado. O tamanho do rastro observado é relacionado com a intensidade do dano ocorrido (TICE et al, 2000). Visualmente, lesões do DNA são classificadas de 0 à 4, onde zero indica ausência de danos e 4 indica que a célula entrou em apoptose (Figura 5).

Figura 5 – Esquema de classificação visual Teste do Cometa



Fonte: Luiz, 2002

O teste do cometa foi realizado de acordo com a técnica descrita por Singh et al. (1988) e Klaude et al. (1996), com modificações.

Em um microtubo, 10 µL de suspensão celular de tumor ascítico Ehrlich foram misturados a 120 µL de agarose LMP 5%, a 37 °C.

Em outro microtubo, 10 µL de sangue total, colhidos da cavidade abdominal, foram misturados a 120 µL de agarose LMP 5%, a 37 °C.

Ambas as misturas, foram depositadas sobre lâminas pré-gelatinizadas com agarose normal 1,5% e, em seguida, cobertas com lamínula. Após, foram levadas para refrigeração a 4°C, por 10 minutos, para endurecimento da agarose. Posteriormente, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas acondicionadas na solução de lise (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris [pH 10.0-10.5], N-lauroil-sarcosinato, 1% Triton X-100, 10% DMSO), em refrigerador (4° C), durante 10 dias. Após o período de lise celular, as lâminas foram acondicionadas em uma cuba horizontal de eletroforese (mergulhada em um recipiente com gelo) e cobertas com tampão alcalino (200 mM EDTA, 10N NaOH) para desnaturação por 20 minutos. A eletroforese ocorreu a 25 volts e 300 miliampère, por 20 minutos. Após eletroforese, as lâminas foram lavadas em 5 mL de tampão de neutralização (0,4 M Tris), durante 5 minutos. Após, as lâminas foram fixadas em metanol, por 5 minutos, e acondicionadas em geladeira para posterior coloração e análise.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com 100 µL de brometo de etídio (20µg/mL) e cobertas com lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 515 - 560 nm e filtro de barreira de 590 nm; aumento de 400x), contando-se 150 células por tratamento (foram montadas duas lâminas por animal, contando-se a primeira lâmina e se necessário procedia-se com a contagem da segunda), sendo classificadas de acordo com a intensidade da cauda, em: 0 - sem dano; 1 - dano pequeno; 2 - dano médio; e 3 - dano máximo; 4 - apoptótico. Após as análises microscópicas, foi determinado o escore, isto é, somatório do número de células identificadas em cada classe vezes o valor da classe.

3.3 Análise Estatística

Foi realizada análise estatística descritiva dos dados e as comparações entre os grupos foram realizadas por estaticista institucional. O acompanhamento da massa dos animais foi realizado pelo Friedman (Teste não paramétrico), resultados estatisticamnete significantes com $p \leq 0,05$. Análise da progressão tumoral foi analisada pelo Teste Kruskall-Wallis e Teste t-*Student*, bicaudal e pareado. Para verificação de viabilidade celular, os testes foram Mann Whitney e Teste Miller. Para a análise de coloração diferencial de leucócitos, foi realizado o Teste Mann

Whitney e Teste t-*Student*. Nas análises de micronúcleo e Teste do Cometa realizou-se o Teste t-*Student*, bicaudal e pareado, considerando resultados estatisticamente significantes com $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Acompanhamento massa dos camundongos

Os camundongos suíços adultos machos utilizados no período experimental foram pesados no dia 0, dia 7 (antes do inóculo do tumor) e dia 15 (antes da eutanásia), indicando que os tratamentos e os diferentes horários de administração dos extratos não interferiram no ganho de massa desses animais (Tabela 1). Embora o monitoramento do peso corporal seja um dado a ser considerado na avaliação do estado geral dos animais, como na associação a sinais de toxicidade, ou ainda uma melhora do quadro clínico do animal (JAHN; GÜNZEL, 1997), o presente estudo não demonstrou diferenças a serem consideradas pela estatística.

Tabela 1 – Acompanhamento do ganho de massa (g) de camundongos suíços adultos machos no período de administração dos extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis*, em diferentes fases do dia.

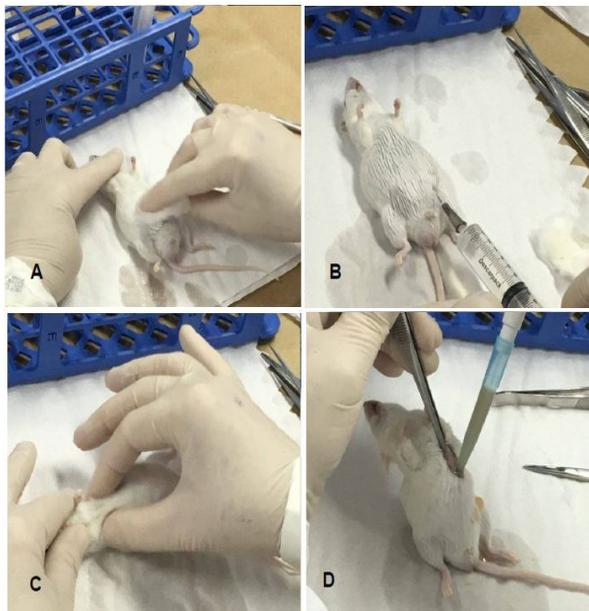
Tratamentos	Dia 0 ^{ns}				Dia 7 ^{ns}				Dia 15 ^{ns}			
	Fase Clara ^{ns}		Fase Escura ^{ns}		Fase Clara ^{ns}		Fase Escura ^{ns}		Fase Clara		Fase Escura ^{ns}	
	n	Média ± DM	n	Média ± DM	n	Média ± DM	n	Média ± DM	n	Média ± DM	n	Média ± DM
Controle (Água)	5	35,4± 1,614	5	35,2 ± 2,004	5	35,8 ± 2,211	5	35,3±1,742	5	35,6 ± 2,21	5	37,1 ± 2,357
CT (Água)	5	33,1± 2,892	5	30,4 ± 1,872	5	34,9±2,79	5	31,2 ± 2,412	5	33,7 ± 2,026	4	32,0± 0,903
EEMO + Tumor	5	32,8 ± 2,695	5	32,4 ± 1,839	5	33,6 ± 2,687	5	33,3 ±1,454	4	33,3±1,897	5	34,2 ± 1,820
EMMO + Tumor	5	36,3 ± 3,401	5	33,6 ± 3,471	5	35,6 ± 3,574	5	34,4 ± 3,266	5	36,33 ± 3,525	5	34,4 ± 3,266

CT, controle tumoral; MO, *Melissa officinalis*; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias) número amostral. ns, Teste não paramétrico de Friedman, tratamentos não diferem entre as salas normal e invertida, tratamentos não diferem entre as datas pesagem ($p>0,05$).

4.2 Evolução tumoral

Após a eutanásia o lavado peritoneal foi obtido para análise da evolução tumoral e realização de outros testes. (Figura 6)

Figura 7 – Obtenção do lavado peritoneal



(A) Assepsia do abdome; (B) Injeção de solução fisiológica; (C) Massagem para desprendimento celular; (D) Remoção do lavado peritoneal.

Fonte: Arquivo pessoal

A evolução tumoral foi observada após a contagem das células de lavado peritoneal em câmara de Neubauer (2 quadrantes), sendo que o grupo controle tumoral da Fase clara apresentou em média $4,34 \times 10^6$ células tumorais, indicando o crescimento do tumor, mesmo padrão de progressão tumoral foi observado nos grupos tratados com extratos de *M officinalis*. Já nos animais que estavam na sala de Fase escura foi observado $1,53 \times 10^7$ células tumorais no grupo controle tumoral, enquanto que os extratos apresentaram inibição da progressão tumoral. As comparações entre as salas indicam que não há diferença estatisticamente significativa nos grupos tratados com EE ou EM de *M officinalis*, entretanto, o tumor apresentou progressão estatisticamente significativa entre os grupos controles, sendo que na FE apresentou-se mais agressivo (Tabela 2). Na figura 7 é possível comparar a progressão tumoral através do gráfico.

Tabela 2- Avaliação da progressão tumoral em animais tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis*, em diferentes fases do ciclo circadiano, pela contagem de em células tumorais de lavado peritoneal, em câmara de Neubauer.

Tratamento	Fase Clara		Fase Escura	
	n	Média de células tumorais/mL ± DM	n	Média de células tumorais/mL ± DM
CT Negativo (Água)	5	$4,34 \times 10^6 \pm 3,89 \times 10^6$ ^{a+}	4	$15,3 \times 10^6 \pm 6,38 \times 10^6$ ^{b+}
EEMO + Tumor	4	$3,30 \times 10^6 \pm 9,47 \times 10^5$ ^{a+}	5	$4,25 \times 10^6 \pm 3,18 \times 10^6$ ^{a++}
EMMO + Tumor	5	$1,66 \times 10^6 \pm 8,04 \times 10^5$ ^{a+}	5	$2,15 \times 10^6 \pm 2,50 \times 10^6$ ^{a++}

CT, controle tumoral; MO, *Melissa officinalis*; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); n, número amostral. ^{a,b} Teste não paramétrico de Kruskal Wallis; tratamentos seguidos de letras diferentes, na mesma linha, apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).⁺ ⁺⁺ Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, tratamentos seguidos de símbolos diferentes, na mesma coluna, apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

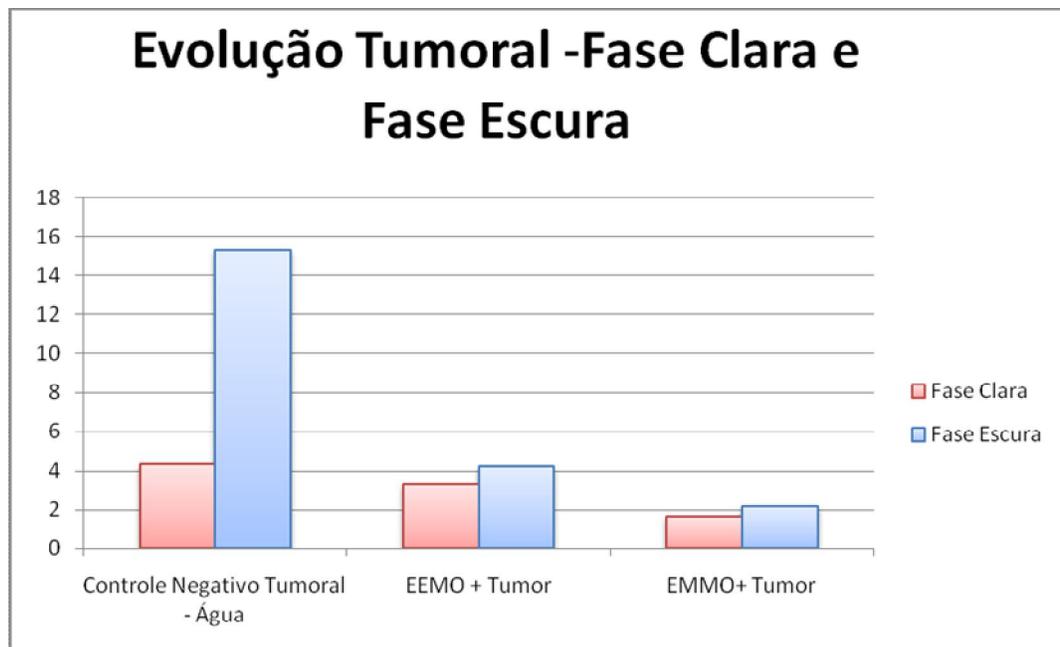


Figura 7 – Progressão tumoral – células obtidas de lavado peritoneal de animais tratados com extratos de erva-cidreira (100 mg/Kg durante 14 dias), EMMO, extrato metanólico de *Melissa officinalis*; EEMO, extrato etanólico de *Melissa officinalis*.

Fonte: Elaborado pelas autoras

No presente estudo pode-se verificar uma diferença significativa nos animais da Fase escura, quando se faz a comparação dos tratamentos de extratos com o CT Negativo, indicando que a atividade antitumoral da *Melissa officinalis* se mostra mais eficiente quando administrada no período da noite. Considerando que o modelo experimental estudado é noturno e a administração foi realizada uma hora após as luzes da sala serem apagadas, sugere-se que os animais metabolizaram melhor os extratos (estavam ativos), ao se comparar com os que receberam os extratos uma hora após as luzes serem acessas, levando em conta que o metabolismo estava entrando em níveis de repouso.

Esses dados sugerem que a atividade tumoricida dos EE e EM quando administrados em altos picos de atividade metabólica apresenta melhor eficiência. A atividade antitumoral de *Melissa officinalis* vem sendo citada na literatura. Souza et al (2004) apresentaram dados concordantes com o presente estudo, porém sem relacionar com os ritmos biológicos dos animais. Para o autor, o óleo essencial desta espécie se mostrou eficiente para a redução da viabilidade celular em neoplasias de mama, leucemias, pulmão e cólon; e concluiu que a propriedade antioxidante da espécie faria com que mesma apresentasse atividades antitumorais significativas. Pereira (2009) demonstrou a presença significativa de flavonóides nos extratos de *Melissa officinalis* e sua relação com a atividade antioxidante da planta, que segundo o autor, oferece benefícios a saúde, incluindo tanto a prevenção de doenças neurológicas, como o Alzheimer, como também a redução de alguns tipos de câncer. Saradyni (2012) induziu *in vivo*, a carcinogênese em ratas Wistar, que receberam tratamento com *Melissa officinalis* e observou a redução de células tumorais mamárias em 40% em comparação ao grupo controle. Portanto, o autor concluiu que o extrato de *Melissa officinalis* se apresentou como um agente antitumoral contra o câncer de mama e atribuiu essa ação ao fato de possuir propriedades antioxidantes em seu óleo essencial.

Ao comparar os dois grupos CT negativo (sala clara e sala escura), pode-se concluir que o grupo da fase escura apresentou-se mais agressivo (aumento do número de células tumorais). O inóculo do tumor foi realizado na parte da manhã, enquanto os animais da fase escura estavam com o metabolismo acelerado, assim sendo, as células tumorais apresentaram maior

capacidade de divisão/multiplicação quando comparado aos animais que estavam com o metabolismo em níveis basais. A interferência da agressividade dos tumores frente à alteração dos ritmos biológicos vem sendo relatada na literatura. Apesar de não ser atribuído a este trabalho, é importante considerar um aumento na ocorrência de tumores quando se relaciona a mudança do ciclo circadiano dos animais. Indivíduos expostos a luz a noite, além de se observar alterações no ritmo circadiano, também pode ocorrer desregulação de genes envolvidos no aparecimento do câncer. Pessoas que trabalham a noite são expostas a luz frequentemente causando alterações em seu ciclo circadiano, ocasionando um risco maior para o desenvolvimento de tumores, graças a diminuição dos níveis de melatonina e desregulação dos genes circadianos (*Per*) (IZU et al 2011). O presente estudo não alterou a quantidade de horas em que os camundongos foram expostos à luz, sendo necessário maiores investigações que permitam associar o aumento da exposição à luz com o comportamento da evolução tumoral.

4.3 Viabilidade celular: eritrócitos e células tumorais

A partir dos resultados obtidos pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan, pode-se verificar que todos os tratamentos foram viáveis, tanto em eritrócitos (> 97%) (Tabela 3) quanto em células tumorais de lavado peritoneal (>82%) (Tabela 4), sendo que apenas os grupos de controle tumoral apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as salas para viabilidade de eritrócitos. Ao fazer a comparação da viabilidade em eritrócitos entre grupos, na FE, observa-se uma diminuição da viabilidade no CT quando comparado ao Controle, indicando que o tumor atingiu células sanguíneas saudáveis. Entretanto, os animais que foram tratados com ambos os extratos e receberam o mesmo inóculo de tumor, foram capazes de aumentar a viabilidade dos eritrócitos, ou seja, atuaram como protetores das células normais. Associando ao fato descrito anteriormente sobre os potenciais tumoricidas dos extratos, pode-se relatar que houve o mecanismo de atividade citotóxica seletiva (capacidade de uma substância proteger células normais e atingir células tumorais) e foi descrito por Carvalho (2011), em que *M. officinalis* apresentou atividade seletiva, onde apesar de levar células tumorais a

apoptose, protegeu células normais dos danos causados pelo agente indutor de danos (MMS), assim como ausência de atividade genotóxica.

Tabela 3 - Avaliação de viabilidade celular de eritrócitos de sangue periférico, de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis* em diferentes fases do dia, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan

Tratamentos	Luz Clara		Luz Escura	
	n	Média ± DM	n	Média ± DM
Controle (Água)	5	98,235 ± 3,946 ^{ns, a}	5	100,00 ± 0,000 ^{ns, a}
CT (Água)	5	99,986 ± 0,029 ^{*,a}	4	97,866 ± 0,973 ^{*,b}
EEMO + Tumor	4	98,659 ± 0,654 ^{ns, a}	5	100,000 ± 0,000 ^{ns, a}
EMMO + Tumor	5	99,401 ± 1,337 ^{ns, b}	5	99,991 ± 0,019 ^{ns, a}

CT, controle tumoral; MO, *Melissa officinalis*; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); n, número amostral. Teste de Mann Whitney; tratamentos seguidos por * na mesma linha apresentam diferença estatisticamente significativa entre sala com luz normal e luz invertida ($p < 0,05$).^{ns}, não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Teste Miller para comparações individuais, ^{a, b} tratamentos seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

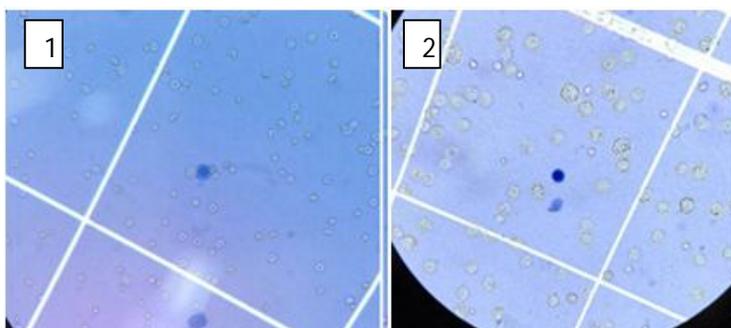
Tabela 4 - Avaliação de viabilidade de células tumorais de lavado peritoneal, de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis* em diferentes fases do dia, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan

Tratamentos	Fase Clara		Fase Escura	
	n	Média ± DM	n	Média ± DM
CT (Água)	5	90,415 ± 15,678 ^{ns, a}	4	97,780 ± 0,954 ^{ns, a}
EEMO + Tumor	4	98,659 ± 0,654 ^{ns, b}	5	97,337 ± 4111 ^{ns, a}
EMMO + Tumor	5	82,156 ± 24,455 ^{ns, a}	5	88,240 ± 20,453 ^{ns, a}

CT, controle tumoral; MO, *Melissa officinalis*; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); n, número amostral. Teste de Mann Whitney; tratamentos seguidos por * na mesma linha apresentam diferença estatisticamente significativa entre sala com luz normal e luz invertida ($p < 0,05$).^{ns}, não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Teste Miller para comparações individuais, ^{a, b} tratamentos seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Ao analisar a viabilidade de células tumorais fazendo a comparação entre as salas, pode-se observar que nenhum tratamento obteve-se diferença significativa. Porém, ao comparar os grupos entre si, na FC, observa-se que os extratos EM e CT, se diferenciam dos extratos EE, indicando que EE não atingiu células tumorais, ao contrário, observou-se um aumento da viabilidade neste tratamento, como efeito protetor. (Figura 8)

Figura 8-Teste de viabilidade celular de eritrócito e células tumorais



Teste de Azul de Trypan em extrato de *Melissa officinalis*, em câmara de Neubauer, eritrócitos e células tumorais respectivamente. Células incolores são viáveis e células coradas em azul são não-viáveis. Aumento final: 400x
Fonte: Elaborada pela autora

4.4 Coloração diferencial de leucócitos

O Tumor de Ehrlich, em sua forma ascítica, apresenta uma baixa resposta inflamatória, com pequena infiltração de macrófagos e um influxo tardio de células polimorfonucleares para a cavidade (a partir de sexto dia após a inoculação) (FECCHIO, 1990; HOSSNE, 2002). Os tumores expressam antígenos reconhecidos pelo sistema imunológico, porém, em sua maioria o que se observa é uma resposta imunossupressora ou fracamente imunogênica. (ABBAS, 2015). Entretanto os dados obtidos pela coloração diferencial de leucócitos (Tabela 5) indicam aumento de resposta inflamatória na FE, nos tratamentos com extratos metanólicos de *Melissa officinalis*, onde foi observado um aumento estatisticamente significativo de linfócitos, contudo, na FC, não foi possível verificar diferença significativa. Uma eficiente atividade

imunomoduladora foi observada na fase em que os animais estariam em metabolismo elevado.

Os linfócitos são componentes essenciais no desenvolvimento da resposta imune adquirida contra as células neoplásicas, inibindo a progressão tumoral. O aumento de linfócitos no líquido ascítico quando administrado o extrato é reflexo de uma resposta imune eficiente do animal contra o tumor, sendo considerada por Morantz e colaboradores (1979) como um bom prognóstico. A medula óssea dos camundongos que receberam o tratamento com os extratos aumentaram a produção de células inflamatórias que se direcionaram ao local de proliferação do tumor. Este evento é nomeado por Queiroz (1997) como mieloproliferação, sendo um importante aspecto para a atividade antitumoral de uma substância. Este achado contradiz o que se espera nos modelos de tumores de Ehrlich, portanto, que estes linfócitos sofreram quimiotaxia para combater o tumor por intermédio de ações pró-inflamatórias do extrato citado.

Igualmente ao estudo de Queiroz, o extrato de MO estimulou o sistema hematopoiético para a produção de células inflamatórias de combate ao tumor, associado à inibição de seu crescimento. Essas informações são relevantes, visto que a hematotoxicidade, seguida de mielosupressão – aplasia medular- é observada na maioria das substâncias que agem como quimioterápicos, inviabilizando o tratamento (QUEIROZ,1997), contudo propriedades da planta fizeram com que o padrão esperado para o câncer não fosse seguido.

O aumento da resposta antitumoral mediada por linfócitos foi observado por Mondal (2001), cujo experimento envolvia tumor ascítico de Ehrlich, em que constatou aumento de linfócitos CD4 e CD8, aumento de TNF- α , IFN- γ e produção de nitrito oxidase. Corroborando com o presente estudo, o autor anteriormente citado acredita que animais portadores de tumor, quando reagem positivamente com o agente testado, promovem aumento do número e da atividade de linfócitos e citocinas e um menor crescimento do tumor Ascítico de Ehrlich.

Os macrófagos são células que estão intimamente envolvidas com a resposta imune. Possuem funções relacionadas ao processo inflamatório, fagocitose, ativação de linfócitos T e B e também se faz importante contra células de tumores, sendo considerado um mediador da atividade antitumoral,

por sua atividade citotóxica contra estas células (CAVAILLON, 1994; WHITWORTH, 1990). Por se infiltrarem em células tumorais, levam-nas à apoptose causando a sua perda de viabilidade (CHATTOPADHYAY et al, 2002). Ao analisar macrófagos, o extrato de EMMO apresentou-se diminuídos em ambas as fases.

O presente estudo não avaliou a presença de células NK (Natural Killer ou Assassinas Naturais), porém segundo dados na literatura estas células eliminam muitos tipos de células tumorais, sendo consideradas importantes na execução de vigilância imune. Alguns tumores não expressão moléculas MHC classe I, o que as tornam bons alvos para células NK. (ABBAS, 2015)

A presença de neutrófilos segmentados em infiltrados tumorais não foi descrita, sendo citados que as células envolvidas na resposta imune se resumem em Linfócitos T, células NK e macrófagos ativados (ABBAS, 2015). Entretanto, na análise deste estudo os animais da FC apresentaram elevação de segmentados.

Tabela 5 - Avaliação da atividade inflamatória de extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis*, administrados em diferentes fases do dia, obtidas por coloração diferencial de leucócitos em esfregaço de lavado peritoneal.

Tratamentos	Fase Clara				Fase Escura					
	n	Tipo Celular (Média ± DM)				n	Tipo Celular (Média ± DM)			
		Macrófagos	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos		Macrófagos	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos
Controle (Água)	5	29,2± 6,378 ^{ns, a}	26,7± 11,031 ^{ns, a, b}	44,0± 11,229 ^{ns, a}	0 ^{ns, a}	0	0 - Baixa celularidade ^{ns, a}			
CT (Água)	5	26,0± 9,899 ^{ns, a}	15,0± 10,606 ^{ns, a}	42,0± 11,313 ^{ns, a}	17,0± 12,020 ^{ns, b}	1	38 ^{ns, b}	30 ^{ns, b}	32 ^{ns, b}	0 ^{ns, b}
EEMO + Tumor	4	16,0± 8,366 ^{ns, a}	35,0± 13,076 ^{ns, b}	46,0± 14,352 ^{ns, a}	3,0± 5,196 ^{ns, b}	5	30,4± 10,430 ^{ns, b}	26,0± 22,330 ^{ns, a, b}	47,2± 28,029 ^{ns, b}	2,8± 4,0 ^{ns, a, b}
EMMO+ Tumor	5	12,6 ± 7,127 ^{*, b}	35,4± 16,211 ^{ns, c}	50,4± 22,367 ^{ns, a}	1,2± 1,788 ^{ns, a}	5	16,5± 1,060 ^{*, c}	22,0± 15,556 ^{ns, b}	60,5± 17,324 ^{ns, c}	0,7± 1,0 ^{ns, c}

CT, controle tumoral; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); n, número amostral; DM, desvio-padrão. Teste de Mann Whitney; tratamentos seguidos por * apresentam diferença estatisticamente significativa entre fase clara e fase escura ($p < 0,05$); ^{ns}, não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). ^{a, b, c} Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa, na mesma coluna

4.5 Teste do Micronúcleo: medula óssea e sangue periférico

A frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleo, obtidos de medula óssea, foi estatisticamente significativa apenas no grupo EEMO, sendo que na fase clara a média \pm desvio médio foi de $90,4 \pm 13,78$ e na fase escura foi de $59,2 \pm 7,887$, indicando redução na frequência de MN. As comparações entre tratamentos na mesma sala indicam que os extratos de MO foram estatisticamente diferente do controle normal, se igualando à indução de danos do controle tumoral, não havendo diminuição de danos como também não houve potencialização. Entretanto, na sala escura, EMMO reduziu os índices de mutações, apresentando $53,6 \pm 7,701$, sendo estatisticamente semelhante ao controle normal (Tabela 6). A figura 9 mostra a Frequencia de MN em medula óssea.

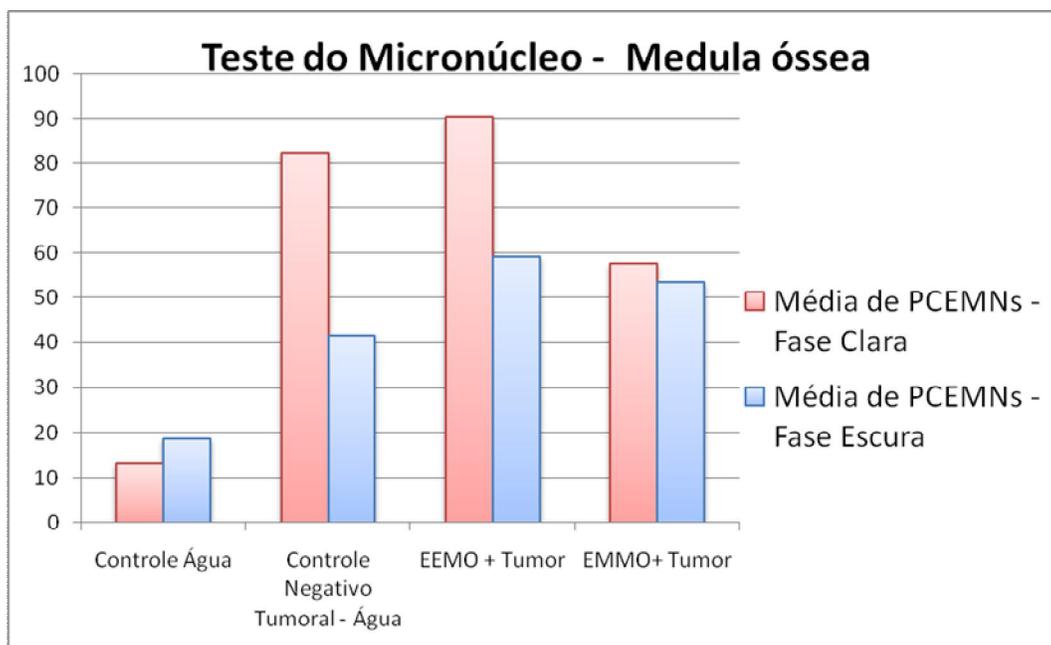
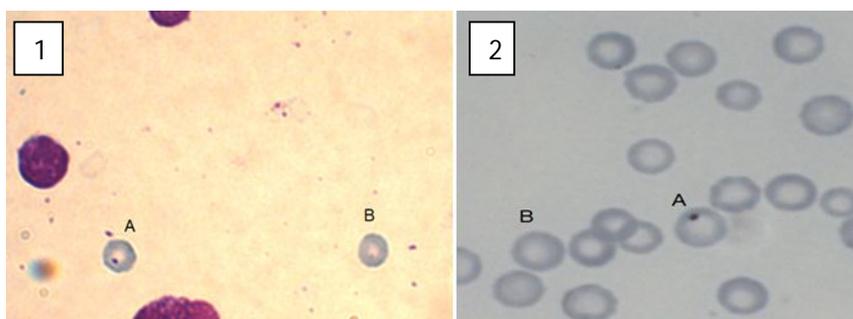


Figura 9 - Frequência média de eritrócitos obtidos de animais tratados com extratos de erva-cidreira (100 mg/Kg durante 14 dias), em medula óssea. EMMO, extrato metanólico de *Melissa officinalis*; EEMO, extrato etanólico de *Melissa officinalis*.
Fonte: Elaborado pelas autoras

Há muitos testes para a detecção de genotoxicidade de uma substância, porém o mais comum é o teste do Micronúcleo, para detecção de danos cromossômicos, ou no aparelho mitótico. (CASTRO, PERAZZO, MAISTRO; 2009).

O aumento de eritrócito com micronúcleo é explicado por Krishna et al (2000) em seu estudo envolvendo roedores, e segundo o autor, o aparecimento de MN se deve ao fato da ocorrência de danos cromossômicos, podendo estes ser estruturais ou numéricos. Neste trabalho, observou-se um aumento significativo de eritrócitos com micronúcleos nos grupos CT, indicando ocorrência de mutações, devido a presença do tumor. No caso do grupo EE, fase escura, houve uma diminuição da indução de micronúcleo, quando comparado ao mesmo grupo da sala normal, indicando que o extrato conseguiu atingir células tumorais para que não houvesse mutações a nível de medula. Corroborando com este estudo, Carvalho (2011) ao avaliar extratos etanólicos e aquosos de *Melissa officinalis*, pelo teste do micronúcleo em medula óssea de ratos, também observou a diminuição da frequência de células micronucleadas, concluindo a ausência de efeitos citotóxicos e mutagênicos.

Figura 3 – Lâminas obtidas através do teste do Micronúcleo



Teste do Micronúcleo em Medula óssea e sangue periférico, respectivamente, em microscopia de luz.

1 – Lâmina obtida material de medula óssea; A – PCEMNs (Eritrócito Policromático Micronucleado) e B- Eritrócito Policromático sem Micronúcleo

2 - Lâmina obtida de esfregaço de sangue periférico; A – NMEMNs(Eritrócito Normocromático Micronucleado) e B- Eritrócito Normocromático sem Micronúcleo.

Aumento final: 400x

Fonte: Elaborada pela autora

Para estimação de qualquer dano hematopoiético do tratamento, é realizado a proporção de eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) em medula óssea. Uma depressão dos níveis de PCE indicam citotoxicidade sistêmica, assim como para medula óssea. (MACGREGOR, 1987). No presente estudo não foi identificado sinais de toxicidade.

Na tabela 7 e na figura 10, podem-se observar os dados de micronúcleo em eritrócitos normocromáticos obtidos de sangue periférico, no qual o horário de administração dos extratos não interferiu na atividade dos mesmos. Os grupos na fase clara não apresentaram diferença na indução de danos em eritrócitos normocromáticos, sendo que mesmo o grupo controle tumoral se igualou aos níveis basais encontrados no controle saudável. Nos tratados na fase escura, os extratos de *Melissa officinalis*, se comportaram entre o controle e o controle tumoral.

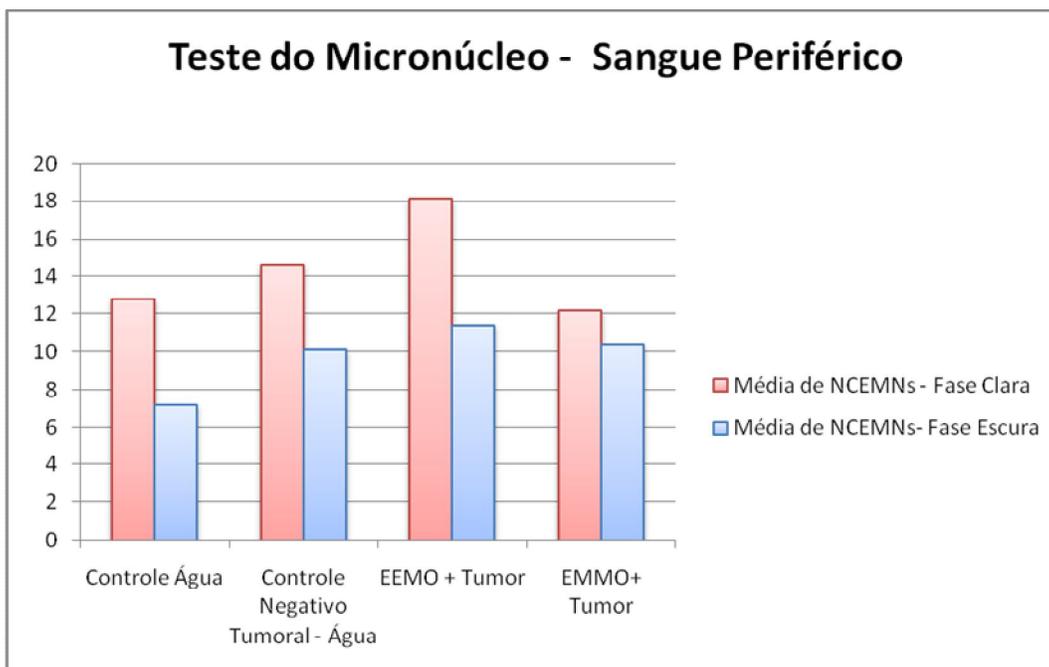


Figura 10 - Frequência média de eritrócitos obtidos de animais tratados com extratos de erva-cidreira (100 mg/Kg durante 14 dias), em medula óssea.EMMO, extrato metanólico de *Melissa officinalis*; EEMO, extrato etanólico de *Melissa officinalis*.

Fonte: Elaborado pelas autoras

Tabela 6 - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *M. officinalis* em diferentes fases do dia e inoculados com Tumor de Ehrlich no 7º dia de tratamento.

Tratamentos	Fase Clara					Fase Escura				
	n	Razão PCE/NME	PCEMNs			n	Razão PCE/NME	PCEMNs		
			Média ± DM	Frequência (%)				Média ± DM	Frequência (%)	
				Média ± DM	Total				Média ± DM	Total
Controle (Água)	5	0,7±0,717	13,2 ± 8,044 ^{ns, a}	2,0 ± 1,707	1,667	5	0,6±0,321	18,6 ± 31,56 ^{ns, a}	1,7 ± 1,07	2,591
CT (Água)	5	1,7±0,447	83,2 ± 49,9 ^{ns, b}	4,7 ± 2,584	4,604	4	1,2±0,733	41,7 ± 41,77 ^{ns, a, b}	3,7 ± 1,453	4,488
EEMO + Tumor	4	1,4±0,505	90,4 ± 13,78 ^{*, b}	4,5 ± 0,689	2,96	5	2,2±2,537	59,2 ± 7,887 ^{*, b}	2,9 ± 0,394	2,96
EMMO + Tumor	5	1,1±0,786	57,6 ± 20,38 ^{ns, b}	2,8 ± 1,019	2,88	5	0,6±0,300	53,6 ± 7,701 ^{ns, a}	2,6 ± 0,385	2,68

CT, controle tumoral; MO, *Melissa officinalis*; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); PCE, eritrócitos policromáticos; NME, eritrócitos normocromáticos; PCEMN, eritrócitos policromáticos com presença de micronúcleo; DM, desvio-padrão; n, número amostral. Teste Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, ^{ns}, não há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as salas; ^{*} há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as salas; ^{a,b,c} Tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa, na mesma coluna ($p < 0,05$). 2000 PCE/animal

Tabela 7 - Frequência de eritrócitos normocromáticos micronucleados (NMEMNs) em sangue periférico de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *M. officinalis* em diferentes fases do dia e inoculados com Tumor de Ehrlich no 7^o dia de tratamento.

Tratamentos	Fase Clara				Fase Escura			
	n	NMEMNs			n	NMEMNs		
		Média ± DM	Frequência (%)			Média ± DM	Frequência (%)	
			Média ± DM	Total			Média ± DM	Total
Controle (Água)	5	12,8 ± 6,301 ^{ns, a}	1,280 ± 0,630	1,280	5	7,20 ± 3,899 ^{ns, a}	0,720 ± 0,390	0,720
CT (Água)	5	14,6 ± 7,021 ^{ns, a}	1,440 ± 0,691	1,449	4	10,09 ± 3,271 ^{ns, b}	1,006 ± 0,323	1,007
EEMO + Tumor	4	18,16 ± 5,297 ^{ns, a}	1,816 ± 0,530	1,816	5	11,4 ± 5,683 ^{ns, a, b}	1,140 ± 0,568	1,14
EMMO + Tumor	5	12,20 ± 1,643 ^{ns, a}	1,212 ± 0,167	1,212	5	10,4 ± 5,128 ^{ns, a, b}	1,038 ± 0,511	1,038

CT, controle tumoral; MO, *Melissa officinalis*; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); PCE, eritrócitos policromáticos; NME, eritrócitos normocromáticos; PCEMN, eritrócitos policromáticos com presença de micronúcleo; DM, desvio-padrão; n, número amostral. Teste Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, ^{ns}, não há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as salas; [†] há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as salas; ^{a,b,c} Tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa, na mesma coluna (p<0,05). 1000 NME/animal

4.6 Teste do Cometa: células tumorais e leucócitos

O teste do cometa foi realizado em células tumorais de lavado peritoneal e em leucócitos de sangue periférico. Na Tabela 8 é possível verificar a frequência de danos em células tumorais. Fazendo uma comparação entre as fases (clara e escura) foi possível observar diferença significativa nos grupos Controle Tumoral, em que se pode observar uma frequência de danos mais elevada na FC, mostrando que na FE o tumor sofria poucos danos em seu DNA, provavelmente por ser mais agressivo (Figura 11).

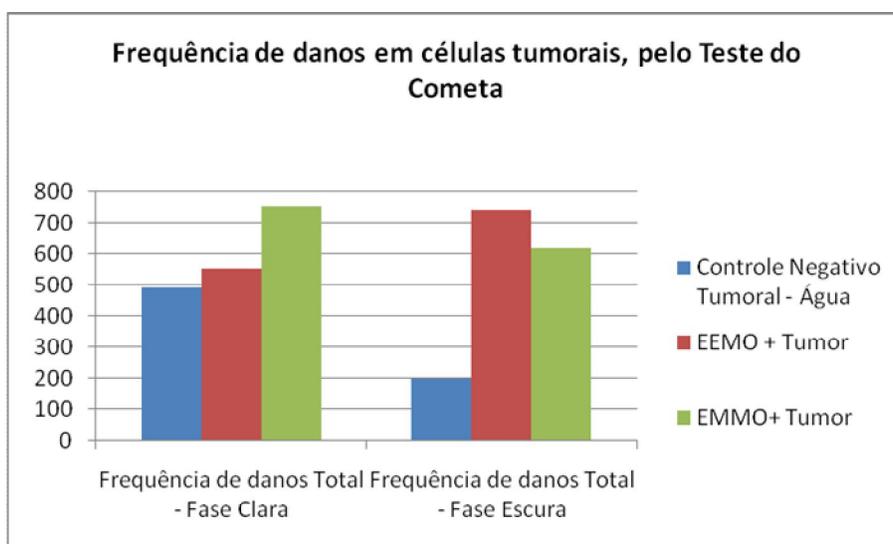


Figura 11 – Frequência de danos em células tumorais obtidos de animais tratados com extratos de erva-cidreira (100 mg/Kg durante 14 dias), EMMO, extrato metanólico de *Melissa officinalis*; EEMO, extrato etanólico de *Melissa officinalis*.

Fonte: Elaborado pelas autoras

Os grupos que receberam os tratamentos na FC, não foi identificado diferença estatística quanto a frequência de danos, sendo que os danos encontrados nos grupos controle tumoral foram estatisticamente semelhante aos encontrados em ambos os extratos. Em contrapartida, nos grupos EEMO e EMMO, que foram tratados na fase escura foi observado um aumento significativo na frequência de danos, sugerindo então, que os extratos causaram danos/lesões no DNA, e provavelmente encaminhando as células tumorais a apoptose.

Saraydin (2013) demonstrou a capacidade de inibição de tumores por *Melissa officinalis*, em ratas induzidas a tumor mamário, revelando o potencial da planta em produzir um composto antitumoral para câncer de mama.

Estudos indicam que os flavonóides são capazes de liberar fator de necrose tumoral alfa, conferindo o efeito protetor de *Melissa officinalis* contra células cancerígenas. Assim como, os taninos presentes na planta são os responsáveis pela prevenção contra estresse oxidativo e pela ação positiva na mutagenicidade quando as células são induzidas a danos, como por agentes químicos (SIMÕES, 2001).

Alguns estudos conseguem explicar a propriedade do citral como agente tumoricida, graças a sua capacidade de induzir a expressão do gene p53. (QUEIROZ, 2012). Este gene é codificador de uma proteína que quando ativa é capaz de detectar danos celulares. Portanto, é entendido como um gene de supressão de tumor, ou seja, se relaciona com o reparo de DNA, correções nos ciclos celulares e indução de ocorrências de apoptoses. Quando sofre mutação o gene deixa de executar a função de reparo da célula, com isso pode iniciar o desenvolvimento de tumores, (FETT-CONTE; SALES, 2002) por meio de células geneticamente instáveis graças a incapacidade de reparo pela p53 (CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002). O mesmo ocorre com substâncias que possuem a capacidade de degradar esta proteína, chamadas de carcinogênicas (STIX, 2007). Assim sendo, o contrário torna-se válido, substâncias que possuem a capacidade de manter os níveis da p53 estáveis, previnem o desenvolvimento tumoral, já que leva a célula à morte celular quando o DNA não é reparado. Desde modo, se os compostos encontrados nos extratos de *Melissa officinalis* possuem a capacidade de aumentar os níveis de p53 (DUERKSENHUGHES et al 1999), pode ser este o motivo pelo qual a planta atua em células cancerígenas e se mostrou como um eficiente tumoricida para células de Tumor de Ehrlich do lavado peritoneal dos camundongos. Além disso, há na literatura proteínas que quando induzidas à se expressarem, levam a célula a apoptose. Como é o caso da proteína Caspase-7, que segundo Saraydin (2012) em seu estudo *in vitro*, células tumorais mamárias foram encaminhadas para apoptose por intermédio desta proteína, visto que foi observado o aumento de sua expressão nos tratamentos com extrato de *Melissa officinalis*, comparados ao grupo controle.

Saraydin (2012) em seu estudo com *Melissa officinalis* *in vivo*, a planta se destacou reduzindo células cancerígenas de mama das ratas Wistar, enquanto que não foi observado sinal algum de toxicidade algum. Carvalho (2011) ao analisar células de sangue periférico de ratos tratados com extratos de *Melissa officinalis*, também observou ausência de atividade genotóxica para essas células. Ambos os autores reforçam os dados obtidos nesta pesquisa, indicando que os extratos atingem células tumorais.

A freqüência de danos observada em leucócitos (Tabela 9 e Figura 12) quando se compara os tratamentos que foram administrados na FC, houve um aumento significativo de danos, com destaque para o EMMO. Na fase escura, ao fazer a comparação do grupo CT e dos grupos que receberam extratos (EE e EM), também houve um aumento estatisticamente significativo de danos no DNA nos animais que receberam extratos. Corroborando com este estudo, Pereira (2005) demonstra através do teste do cometa, ocorrência de danos do DNA em células de sangue periférico de ratos tratados com ácido rosmarínico (composto encontrado na *M. officinalis*). Entretanto, Carvalho 2011 não detectou danos no DNA pelo teste do cometa tanto de extratos aquosos como etanólicos de *M. officinalis*. Além disso, o mesmo autor detectou atividade antimutagênica nos tratamentos que foram induzidos a danos por metilmetanosulfonato (MMS), ou seja, agiu na prevenção de danos no DNA induzidos pelo MMS; nestes aspectos esses estudos se diferenciam do presente estudo, já que o extrato foi considerado genotóxico, provavelmente por ter sido coletado sangue da cavidade abdominal, região próxima ao tumor.

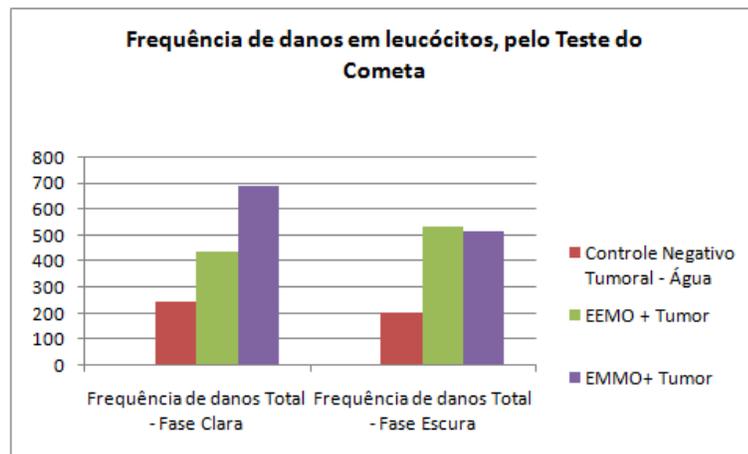


Figura 12 – Frequência de danos em células tumorais obtidos de animais tratados com extratos de erva-cidreira (100 mg/Kg durante 14 dias), EEMO, extrato metanólico de *Melissa officinalis*; EEMO, extrato etanólico de *Melissa officinalis*.

Fonte: Elaborado pelas autoras

Tabela 8 -Frequência de danos em células tumorais, obtidas de lavado peritoneal de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis*, em diferentes fases do dia, e inoculados com Tumor de Ehrlich no 7º dia de tratamento.

Tratamentos	Fase	n	Células com danos						
			Total	Classes (Média ± DM)					Score (Média ± DM)
				0	1	2	3	4	
CT (Água)	Clara [*]	5	494 ^a	58,4 ± 29,7	52 ± 6,928	24 ± 13,4	16,4 ± 12,6	6,4 ± 7,092	174,8 ± 48,98
	Escura [*]	4	199 ⁺	43 ± 23,87	18,5 ± 8,646	14,25 ± 5,403	7 ± 6,364	0	68 ± 33,43
EEMO+Tumor	Clara ^{ns}	4	554 ^a	22,67±14,91	22,67±12,36	39±26,5	40,67±15,91	8,333±2,43	256±30,62
	Escura ^{ns}	5	744 ⁺⁺	7±7,583	18,4±18,06	39,2±12,07	83,2±21,86	8±5,568	378,4±36,15
EMMO+ Tumor	Clara ^{ns}	5	753 ^a	2±1,414	22,5±15,66	67,25±32,87	54±18,49	6,75±3,112	346±41,76
	Escura ^{ns}	5	619 ⁺⁺	6,25±4,969	47,75±23,95	39±5,244	30,75±15,99	6,25±4,437	243±76,94

CT, controle tumoral; MO, *Melissa officinalis*; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); DM, desvio-padrão. Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, ^{ns} não há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as fases; há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as fases; ^{a,b} tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa na fase clara; ^{+, ++} tratamentos seguidos por símbolos diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa na fase escura. 150 células tumorais/animal.

Tabela 9: Frequência de danos em leucócitos, obtidas de sangue periférico de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis*, em diferentes fases do dia, e inoculados com Tumor de Ehrlich no 7º dia de tratamento.

Tratamentos	Fase	n	Células com Danos						
			Total	Classes (Média ± DM)					Score
				0	1	2	3	4	Média ± DM
CT (Água)	Clara ^{ns}	5	247,5 ^b	72±36,54	39,25±20,96	8,25±12,58	1,5±2,598	0,5±0,866	62,25±47,58
	Escura ^{ns}	4	202,5 ⁺⁺	24,75±21,59	33,75±18,78	5,75±8,842	0,75±1,299	0,25±0,433	48,5±39,56
EEMO	Clara ^{ns}	4	436,25 ^b	22,25±19,47	18,25±16,18	28,5±16,45	33,5±24,47	7±5,612	203,8±123,9
	Escura ^{ns}	5	532,5 ^{+, ++}	11,25±9,337	26,25±23,7	5,75±3,491	3,25±3,897	71,25±26,56	332,5±121,5
EMMO	Clara ^{ns}	5	689 ^c	20,4±13,59	23,8±14,53	40,8±10,23	64,4±23,67	8,8±6,34	333,8±63,84
	Escura ^{ns}	5	518 ^{+, ++}	13±4,796	10,8±11,65	15,8±7,563	35,2±17,75	41,8±51,44	315,2±141,4

CT, controle tumoral; MO, *Melissa officinalis*; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); DM, desvio-padrão. Teste Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, ^{ns} não há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as fases; * há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as fases; ^{a,b} tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa na fase clara; ^{+, ++} tratamentos seguidos por símbolos diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa na fase escura. 150 células tumorais/animal

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das publicações já existentes sobre os potenciais citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos *Melissa officinalis*, estudos mais específicos se fazem necessários acerca do melhor horário de administração destes extratos, tanto para evitar efeitos tóxicos às células quanto na possibilidade da planta ser utilizada no tratamento de tumores, por exemplo.

Com este estudo foi possível relatar que os extratos administrados em horários de alta taxa de ativação do metabolismo se mostraram mais eficientes devido ao fato do extrato sofrer metabolização mais elevada. O pico de atividade metabólica dos camundongos é à noite, por serem animais noturnos, ao contrário do dos homens que este pico é durante o dia. Pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan, foi possível comprovar que ambos os extratos da fase escura se mostraram eficientes contra células tumorais e protetores de células normais visto que estavam expostas a um tumor (atividade seletiva). Com o teste do MN foi possível verificar diminuição na indução de MN pelos EE. O teste de cometa de sangue periférico indicou genotoxicidade, enquanto que em células tumorais foi identificado aumento na frequência de danos, apoiando o fato da planta possuir propriedades antitumorais.

Neste estudo foi possível destacar-se a importância da verificação de um melhor horário para administração de fármacos, ainda que naturais, nas terapias relacionadas a tumores, contudo não foi possível detectar o mecanismo exato pelo qual ocorreram estas alterações, sendo importante a continuação da pesquisa. O melhor horário para administrar extratos foi no período escuro dos animais, portanto durante o dia dos humanos (alta taxa metabólica).

A agressividade do tumor se mostrou mais elevada nas salas que receberam o inóculo com o metabolismo ativo. Porém, não foi possível esclarecer esta alteração, sugerindo estudos mais aprofundados acerca do ritmo biológico no aparecimento de tumores.

Estudos esclarecedores nas áreas de imunologia fazem-se necessários, pois com este trabalho não foi possível indicar a forma pela qual os extratos forneceram uma estimulação do sistema imunológico dos camundongos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, Richard J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 463, n. 2, p. 111-172, 2000.
- ALMEIDA, N.; XAVIER, J. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) *in vivo*. **Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, p. 56-59, 2005.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, 2005
- ACÚRCIO, A. R.; RODRIGUES, L. M. **Os Ritmos da Vida - Uma Visão Atualizada da Cronobiologia Aplicada**. Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, n. 2, 2010.
- ADINEE, J.; PIRI, K.; KARAMI, O. Essential Oil Component in Flower of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, United States, v. 4, n. 3, p. 277-278, 2008.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 1-6, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ccs.uel.br/espacoparasaude/v6n2/plantamedicinal.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de fitoterápicos Farmacopéia Brasileira**. Brasília, DF: ANVISA, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_d_e_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico para medicamentos fitoterápicos**. Brasília, DF: ANVISA, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_d_e_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2016
- CARVALHO, N. C. de et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 290-297, abr. 2011.
- CASTRO, L. S.; PERAZZO, F. F.; MAISTRO, Edson Luis. Genotoxicity testing of *Ambelania occidentalis* (Apocynaceae) leaf extract *in vivo*. **Genetics and Molecular Research**, p. 440-447, 2009.
- CAVAILLON, J.M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 48, p.445-453, 1994.

KLUMB, Claudete E.; CAVALCANTI JÚNIOR, Geraldo B. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 2, p. 111-25, 2002.

COSTA, L. C. B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Revista de Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 956-959, 2005.

DAGLI, M. I. Z; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. Na experimental study on lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 97-103, 1992.

DUERKSEN-HUGHES, P.J., YANG J., OZCAN O. p53 induction as a genotoxic test for twenty-five chemicals undergoing in vivo carcinogenicity testing. **Environmental health perspectives**. v.107, n.10, p.805-12, 1999.

EHRlich, P.; APOLANT, H. **Beobachtungen uber maligne mausetumoren. Berlinger Klinischer Ocheschrift**, [S.I.], v. 28, p. 871-874, 1906.

ESTEVES, G. A. Ansiedade e estresse na modernidade. **Artigonal**, 2009. Disponível em: <<http://www.artigonal.com/medicina-artigos/ansiedade-e-estresse-na-modernidade-1176263.html>>. Acesso em: 10 out 2016.

FECCHIO, D. et al. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, New York, v. 14, n. 1, p. 125-132, feb. 1990.

FENECH, Michael. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug discovery today**, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002

FETT-CONTE, A. C.; SALES, A. B. C. F. A *Importância do Gene p53 na carcinogênese Humana*. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 24, n.2, São José do Rio Preto 2002

GARRIOT, M. L.; PHELPS, J.B.; HOFFMAN, W.P. A protocol for the in vitro micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Research**, Amsterdam, v.517, p. 123-134, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571802000591>> Acesso em: 20 maio 2016.

HOSSNE, R. S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação no Brasil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 208-210, jul./ago. 2002.

IZU, M. et al. EL TRABAJO NOCTURNO COMO UN FACTOR DE RIESGO EN LA CARCINOGENESIS. **Ciencia y enfermería**, v. 17, n. 3, p. 83-95, 2011

JAHN, A.I. , GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment. **Reproductive toxicology**, v. 11, n. 2, p. 171-178, 1997. 1997;11(2- 3):171-8.

JEZLER, C. N. et al. *Lippia alba* morphotypes cidreira and melissa exhibit significant differences in leaf characteristics and essential oil profile. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 23 n.2 p.217-223 , nov. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/2013nahead/aop00313.pdf>>. Acesso em: 09 mar. 2016.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 155-166, 2000

LIN, S.Y.; KAWASHIMA, Y. **Current status and approaches to developing press-coated chronodelivery drug systems**. Journal of controlled release, v. 157, n. 3, p. 331-353, 2012

LEVI, Francis; SCHIBLER, Ueli. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 593-628, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUIZ, R.C. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murrill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, in vitro. Dissertação de Mestrado., 80p., 2002.

MACGREGOR, James T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 189, n. 2, p. 103-112, 1987.

MARQUES, N.; MENNA BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo, SP: EDUSP; Editora Fio Cruz, 1997

MEIRA, M. R.; SOUZA, S. A. M.; MARTINS, E. R. **Plantas medicinais, produção e cultivo de *Melissa officinalis* no Brasil**. Enciclopédia Biosfera, Montes Claros, v. 6, p. 1-11, 2010. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010b/plantas.pdf>>. Acesso em: 09 out. 2016.

MONDAL, T. K. et al. Repeated treatment with *S. aureus* superantigens expands the survival rate of Ehrlich ascites tumor bearing mice. **Immunological investigations**, v. 31, n. 1, p. 13-28, 2002.

MUZELL, D. P. **Propriedades biológicas de extratos de Melissa officinalis L. (LAMIACEAE) em ratos Wistar.** Porto Alegre, RS. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006 Disponível em:

<<http://tardis.pucrs.br/dspace/bitstream/10923/1426/1/000348260-Texto%2bCompleto-0.pdf>> Acesso em: 8 mar. 2015.

PEREIRA, S.S.; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M.. **Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos.** Revista Brasileira de Psiquiatria, 2009.

PEREIRA P; TYSCA D; OLIVEIRA P; DA SILVA BRUM LF; PICADA JN; ARDENGHI P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. **Pharmacology Research** 52: 199-203. 2005.

PEREIRA, R. P. et al. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochemical research**, v. 34, n. 5, p. 973-983, 2009.

QUEIROZ, R.M. **Análise da atividade antitumoral do óleo essencial de Melissa officinalis L. e de seu componente majoritário, citral, em linhagens de glioblastoma multiforme.** Rio de Janeiro, RJ. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012

REIS, E. S. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. in vitro sob influência do meio de cultura- v31i2. 765. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 331-335, 2009.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.** Canoas: Editora ULBRA, 2003, p. 173 – 220; p.247 -271.

RIGOTTI, M. **Farmácia Verde – Resgate da Sabedoria Popular.** Projeto “A cura pelas plantas”, p. 3-5, 2010. Disponível em: <<http://www.curaplantas.xpg.com.br/farmacieverde.PDF>>. Acesso em: 09 set. 2016.

SANCAR A., et al. **Circadian clock, cancer, and chemotherapy.** Biochemistry, v. 54, n. 2, p. 110-123, 2014.

SAHAR, Saurabh; SASSONE-CORSI, Paolo. **Metabolism and cancer: the circadian clock connection.** Nature Reviews Cancer, v. 9, n. 12, p. 886-896, 2009.

SARAYDIN, S. U. et al. Antitumoral effects of *Melissa officinalis* on breast cancer in vitro and in vivo. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Sivas,

v. 13, n. 6, p. 2765-2770, 2012. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22938456>>. Acesso em: 09 out. 201.

SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2001.

SOUSA, Allyne Carvalho et al. Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 677-681, 2004.

STIX, G. Tempero que cura: é possível que um ingrediente do curry trate doenças como Alzheimer e câncer? **Scientific American**. Brasil, ano 5, n. 58, março 2007.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

WHITWORTH, P. W. et al. Macrophages and cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 8, n. 4, p. 319-351, 1990.

ZELNICK, R. D. et al. **Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoides from Coleus barbatus Benth.** Tetrahedron, v. 33, 1457-1467, 1977

ANEXO: Parecer CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Bauru, 24 de abril de 2015
CEUA N 8706290315

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Marilanda Ferreira Bellini

Depto/Disc: Ciências Da Saúde

Pesquisadores envolvidos: Dulce Helena Constatino - colaborador (usc); Fernando Tozze Alves Neves - colaborador (usc); Rita Luiza Peruquetti - colaborador (usc); Wilson A Orcini - colaborador (usc);

Título do projeto: "Análises físico-químicas de *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* e *Melissa officinalis*, avaliação de citotoxicidade e mutagenicidade de seus extratos metanólicos e etanólicos, in vitro e in vivo. "

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais USC

O uso de plantas medicinais cresce diariamente, à medida que a população busca alternativas naturais para o tratamento de doenças e melhoria na qualidade de vida. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Melissa officinalis* L. são as três espécies de erva-cidreira mais comumente empregadas na medicina popular brasileira. Assim, o presente estudo tem como objetivo analisar as propriedades físico-químicas de *C. citratus*, *L. alba* e *M. officinalis* – para verificar a pureza da matéria-prima vegetal – avaliar o potencial citotóxico e mutagênico de seus extratos etanólico e metanólico, in vitro e in vivo. O projeto está dividido em três etapas principais: a) Caracterização do material botânico, obtenção e caracterização dos extratos: Serão avaliados o percentual de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido no material botânico. Extratos etanólicos e metanólicos serão preparados utilizando folhas secas moídas de *C. citratus*, *L. alba* e partes aéreas secas moídas de *M. officinalis* (1:10 mL de água destilada), maceradas em agitador magnético, 29-30 °C, 4 horas. O volume do extrato será filtrado e o produto final será colocado em cápsula de porcelana, para secagem em capela. Os extratos serão diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para os testes in vitro e em água deionizada para os testes in vivo. Serão realizadas as análises de determinação de compostos fenólicos totais e Cromatografia em camada delgada para verificação da presença de citral nos extratos. b) Testes in vitro: serão realizadas análises de citotoxicidade pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan e mutagenicidade pelo teste de micronúcleo em células binucleadas e teste do cometa, em células de obtidas de tumor de Ehrlich; c) Testes in vivo: serão utilizados camundongos inoculados com Tumor ascítico de Ehrlich para análise citotoxicidade pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan, de mutagenicidade pelos testes de micronúcleo em células de medula óssea de roedores e teste de cometa, além da análise de crescimento do tumor. Ambos os testes, in vitro e in vivo, receberão os seguintes tratamentos/grupos experimentais:

- 1) Controle Negativo Saudável (animais saudáveis, sem Tumor de Ehrlich, sem administração de extratos);
- 2) Controle Negativo Tumoral (animais com Tumor de Ehrlich, sem administração de extratos);
- 3) Controle Positivo Tumoral (animais com Tumor de Ehrlich e com administração de agente indutor de danos);
- 4) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Etanólico de *L. alba*;
- 5) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Metanólico de *L. alba*;
- 6) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Etanólico de *M. officinalis*;
- 7) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Metanólico de *M. officinalis*;
- 8) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Etanólico de *C. citratus*;
- 9) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Metanólico de *C. citratus*.

Desta forma, permitindo a comparação dos resultados em ambos os modelos experimentais.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração, na reunião de 16/04/2015, **ANALISOU e APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,



Prof. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 24th April 2015

CERTIFIED

We certify that the Research "Physical and chemical analysis of *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* and *Melissa officinalis*, cytotoxicity and mutagenicity evaluation of its Methanol and ethanol extracts in vitro and in vivo.", protocol number CEUA 8706290315, utilizing 100 Heterogenics mice (100 males), under the responsibility Marilanda Ferreira Bellini, was approved in the meeting of day 04/16/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University.

Certificamos que o Projeto intitulado "Análises físico-químicas de *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* e *Melissa officinalis*, avaliação de citotoxicidade e mutagenicidade de seus extratos metanólicos e etanólicos, in vitro e in vivo.", protocolado sob o CEUA nº 8706290315, utilizando 100 Camundongos heterogênicos (100 machos), sob a responsabilidade de Marilanda Ferreira Bellini, foi aprovado na reunião de 16/04/2015, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração.

yours faithfully,



Dulce Helena Jardim Constantino
Coordinator of the Ethics Committee on Animal Use
Sagrado Coração University