

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

ÁDRIKA MARIA ANDRADE CHRISTIANINI
MONIQUE MALTA FRANCESE

ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM *Casearia sylvestris* Sw.
(GUAÇATONGA) SOBRE A ANGIOGENESE INDUZIDA PELAS CÉLULAS DO
TUMOR DE EHRLICH EM MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

BAURU

2019

ÁDRIKA MARIA ANDRADE CHRISTIANINI
MONIQUE MALTA FRANCESE

ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM *Casearia sylvestris* Sw.
(GUAÇATONGA) SOBRE A ANGIOGENESE INDUZIDA PELAS CÉLULAS DO
TUMOR DE EHRLICH EM MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à banca examinadora como
parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina –
Universidade do Sagrado Coração.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique
Weckwerth.

BAURU
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

C555a	Christianini, Adrika Maria Andrade
	Análise do efeito do tratamento com <i>Casearia sylvestris</i> Sw. (GUAÇATONGA) sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de Ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea / Adrika Maria Andrade Christianini; Monique Malta Francese. -- 2019. 40f. : il.
	Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth
	Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP
	1. Guaçatonga. 2. Neoplasia. 3. Angiogênese. 4. Tratamento. I. Francese, Monique Malta. II. Weckwerth, Paulo Henrique. III. Título.

ÁDRIKA MARIA CHRISTIANINI
MONIQUE MALTA FRANCESE

ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM *Casearia sylvestris* Sw.
(GUAÇATONGA) SOBRE A ANGIOGENESE INDUZIDA PELAS CÉLULAS DO
TUMOR DE EHRLICH EM MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à banca examinadora como
parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina –
Universidade do Sagrado Coração.

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora:

Prof.º Dr. Paulo Henrique Weckwerth (orientador)
Universidade do Sagrado Coração

Prof.ª Dra. Andrea Mendes Figueiredo
Universidade do Sagrado Coração

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus, por nos permitir chegar até aqui com ânimo, força, coragem e determinação, renovando a cada dia nossas forças para superar os obstáculos e dificuldades enfrentadas ao longo do trabalho de conclusão de curso.

Aos nossos familiares, pelo apoio concedido durante os quatro anos de nossa graduação pelas palavras de incentivo quando estávamos cansados e com pensamentos negativos.

Aos nossos docentes, que atuavam como pais em momentos difíceis, nos dando apoio, conselhos e palavras de carinho.

À nossa orientadora Dulce Helena Jardim Constantino pela oportunidade de realizar um trabalho científico de caráter tão relevante à ciência, a quem devemos respeito e admiração.

Ao nosso orientador Paulo Henrique Weckwerth por participar da jornada contribuindo para a concretização dessa pesquisa.

À colaboradora Maira Cristina Rondina Couto por se envolver com o projeto desde o início, contribuindo para o andamento dos procedimentos e estando sempre à disposição, auxiliando quando nos deparamos com as infinitas dúvidas acerca do tema do trabalho.

À nutricionista Flávia Letícia Gonçalves Chibinski Malta pela participação e apoio para a apresentação oral do trabalho.

Aos nossos colegas de sala por nos proporcionarem alegria e sorrisos nos momentos difíceis.

Por fim, agradecemos a Universidade do Sagrado Coração pela experiência da graduação e disponibilização da estrutura física indispensável a concretização deste trabalho.

À todos que de forma ou direta ou indireta contribuíram para a finalização deste trabalho, fizeram parte do nosso crescimento e acompanharam esse percurso ao longo dos meses:

OBRIGADA!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
(José de Alencar)

RESUMO

A *Casearia sylvestris* (Guaçatonga) é uma planta encontrada na América tropical, utilizada pela população para tratar feridas e lesões na pele, através do contato do extrato das folhas com os locais necessitados. Atualmente, existem estudos que indicam o poder curativo desta planta e relacionam sua eficácia com as frações denominadas Casearinas, cujo contato com tumores promoveu uma diminuição significativa no volume destes. Estuda-se a Guaçatonga, seu efeito e eficácia, valendo-se de técnicas em membranas presentes em ovos para averiguar como este modelo experimental pode afetar os tratamentos existentes atualmente, incentivando o uso de medicamentos naturais e que afetem menos os pacientes que se encontram debilitados por conta dos quimioterápicos utilizados contra uma neoplasia. Através de um estudo experimental com a Guaçatonga associada ao tumor de Ehrlich, espera-se avaliar o aspecto da angiogênese nas membranas removidas após a aplicação dos extratos, visando uma diminuição destes vasos formados quando na presença de tumores, considerando assim um possível tratamento alternativo para tumores malignos, evitando utilização de medicamentos agressivos. Para isso foram utilizados 28 ovos, dos quais foi possível a remoção da membrana corioalantóide de apenas 11 ovos. O grupo 1 apresentou um padrão normal de crescimento e foi utilizado como controle negativo; O grupo 2 apresentou aumento na quantidade de vasos sanguíneos; O grupo 3 não apresentou interferência na quantidade de vasos sanguíneos desenvolvidos; O grupo 4 apresentou ramificações menos evidenciadas. Considera-se através desta técnica a possibilidade da utilização da guaçatonga para o tratamento de células tumorais de Ehrlich, porém devem ser realizados testes para confirmar a associação da substância estudada com as células empregadas. Desta forma espera-se que esta pesquisa contribua para o alcance propósitos apresentados, esclarecendo assim o processo de angiogênese e se o crescimento das células do tumor de Ehrlich é influenciado pelo tratamento com *Casearia Sylvestris* e contribuindo para a pesquisa brasileira, já que se trata de uma técnica relacionada ao estágio embrionário animal através da ciência de que a manipulação de embriões de galinha, até suas 48 horas de desenvolvimento, não acarreta dor intencional, respeitando as características individuais da espécie e dispensando o uso de animais vivos para o tratamento das células tumorais.

Palavras-chave: Guaçatonga. Neoplasia. Angiogênese. Tratamento.

ABSTRACT

Casearia sylvestris (Guaçatonga) is a plant found in tropical America, used by the population to treat wounds and skin lesions by contacting the leaf extract with the needy places. Currently, there are studies that indicate the healing power of this plant and relate its effectiveness with the fractions called Casearins, whose contact with tumors promoted a significant decrease in their volume. Guaçatonga is studied, its effect and efficacy, using egg membrane techniques to investigate how this experimental model can affect current treatments, encouraging the use of natural medicines that affect patients who are debilitated less. because of the chemotherapy drugs used against a cancer. Through an experimental study with Guaçatonga associated with Ehrlich's tumor, it is expected to evaluate the angiogenesis aspect in the membranes removed after the application of the extracts, aiming at a reduction of these vessels formed in the presence of tumors, thus considering a possible alternative treatment for malignant tumors, avoiding the use of aggressive medications. For this, 28 eggs were used, from which it was possible to remove the chorioallantoid membrane from only 11 eggs. Group 1 presented a normal growth pattern and was used as negative control; Group 2 showed an increase in the amount of blood vessels; Group 3 did not interfere with the amount of blood vessels developed; Group 4 presented less evidenced branches. This technique considers the possibility of using guaçatonga for the treatment of Ehrlich tumor cells, but tests should be performed to confirm the association of the substance studied with the cells employed. Thus, it is expected that this research will contribute to achieve the presented purposes, thus clarifying the process of angiogenesis and whether the growth of Ehrlich tumor cells is influenced by treatment with *Casearia Sylvestris* and contributing to the Brazilian research, since it is a technique related to animal embryonic stage through the knowledge that the manipulation of chicken embryos, up to its 48 hours of development, does not cause intentional pain, respecting the individual characteristics of the species and dispensing the use of live animals for the treatment of tumor cells.

Keywords: Guaçatonga. Neoplasia. Angiogenesis. Treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Região da América do Sul	14
Figura 2 - Estruturas do desenvolvimento embrionário	21
Figura 3 - Rede vascularizada.....	21
Figura 4 - Formação de novos vasos	22
Figura 5 - Aspecto microscópico do tumor	26
Figura 6 - Identificação dos grupos na casca dos ovos.....	28
Figura 7 - Disposição dos grupos de ovos na chocadeira	28
Figura 8 – Vedação dos ovos.....	29
Figura 9 - Equipamentos cirúrgicos utilizados para remoção da.....	30
Figura 10 – Aspecto das membranas.....	30
Figura 11 - Aspecto microscópico da membrana corioalantóide (CAM) dos ovos controles pertencentes ao “Grupo 1: Soro fisiológico (100ul)”, após 48 horas de incubação.....	32
Figura 12 - Aspecto microscópico da membrana corioalantóide (CAM) dos 3 ovos referentes ao “Grupo 2: Tumor de Ehrlich (100ul)”, após 48 horas de incubação.....	33
Figura 13 - Aspecto microscópico da membrana corioalantóide (CAM) dos 2 ovos referentes ao “Grupo 3: Guaçatonga (100ul)”, após 48 horas de incubação.....	34
Figura 14 - Aspecto microscópico da membrana corioalantóide (CAM) dos 3 ovos referentes ao “Grupo 4: Guaçatonga (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul)”, após 48 horas de incubação.....	35
Gráfico 1 - Comparação de membranas removidas em relação ao total de ovos incubados.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos fitoterápicos de acordo com a legislação Brasileira	16
Tabela 2 – Registro de novos casos de câncer de mama.....	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS E FÍSICAS DA <i>CASEARIA SYLVESTRIS</i> ...13	
2.2	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	15
2.3	TUMOR DE EHRLICH	17
2.4	GUAÇATONGA E NEOPLASIA	19
2.5	MEMBRANA CORIALANTÓIDE EM ESTUDOS ANGIOGÊNICOS	20
3	OBJETIVOS	24
3.1	GERAL	24
3.2	ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	MATERIAL	25
4.2	MÉTODOS	25
4.2.1	Preparo da solução do tumor de Ehrlich.	26
4.2.2	Preparo do Extrato de Guaçatonga	27
4.2.3	Preparo dos ovos e realização do experimento	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	RESULTADOS	32
5.1.1	Grupo 1: Soro fisiológico (100ul).....	32
5.1.2	Grupo 2: Tumor de Ehrlich (100ul)	33
5.1.3	Grupo 3: Guaçatonga (100ul)	34
5.1.4	Grupo 4: Guaçatonga (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul)	35
5.1.5	Discussão dos resultados.....	36
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	APÊNDICE A - FLUXOGRAMA	42

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas como método alternativo a tratamentos ocorre desde as primeiras populações; o histórico de utilização destas é descrito no tópico abaixo.

1.1 HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

Desde as primeiras civilizações produtos naturais já eram utilizados pelos homens para o tratamento de enfermidades. Os produtos vegetais foram utilizados como alicerce para a civilização agrícola do *Homo sapiens*. Há incidências de que a utilização de chás para linimentos, inalações ou fumigações para o tratamento e alívio de males internos e externos devido aos ferimentos que acometiam nossos ancestrais na caça (DO VALE, 2002).

Sabe-se que manuscritos mais antigos pertencem a China, baseados no conhecimento tradicional, contudo apenas alguns escritos originais permaneceram ao passar dos anos. No Egito, por exemplo, o papiro de Ebers foi escrito com cerca de 3.500 anos sendo considerado como um dos mais antigos e importantes tratados médicos conhecido e é datado de aproximadamente 1.600 a.C. Este documento descreve produtos naturais a partir de animais, minerais, e plantas além de enumerar em torno de 100 doenças. (O PODER..., 1991; BRANDELLI). Vários dos produtos são utilizados até hoje, como por exemplo o *Coriandrum sativum* (conhecido popularmente como coentro) e o *Foeniculum vulgare Miller* (conhecido popularmente como funcho. O papiro menciona ainda, cerca de 800 fórmulas mágicas e remédios populares incluindo metais como chumbo e cobre, veneno de animais, extrato de plantas e uso terapêutico de óleos vegetais como óleo de girassol, açafraão e alho, com o intuito de favorecer a absorção de medicamentos (BRANDELLI).

No Brasil, uma grande quantidade de plantas medicinais eram utilizadas por pajés e o conhecimento por essas plantas e seus efeitos eram passados de geração em geração (BRAGA, 2011). Esses conhecimentos logo foram compartilhados com os europeus quando chegaram no Brasil. Dessa forma, a necessidade de viver daquilo que a natureza fornecia contribuiu para o contato com a flora medicinal brasileira e os novos conhecimentos sobre a flora brasileira foram fundidos com os

conhecimentos trazidos da Europa. Foram testados nas plantas brasileiras usos similares das plantas europeias, a fim de se descobrir a eficácia e em muitas das vezes, o princípio encontrado nas plantas nativas do Brasil era em maior quantidade ou qualidade (O PODER..., 1991).

Segundo Lorenzi & Matos (2008 apud FLOR & BARBOSA), até o século XX o Brasil, que era um país essencialmente rural, contava com um amplo uso de plantas medicinais, tanto nativas quanto introduzidas, porém com o início da industrialização e urbanização esse conhecimento floral da medicina ficou em segundo plano, devido a pressões econômicas e culturais externas, dando espaço a medicamentos sintéticos.

Após um período sem compreender a importância e efeitos do uso de plantas medicinais, com a influência de novas tendências globais e ideias sustentáveis, obteve-se o interesse geral em fitoterapia. Pesquisas científicas sobre botânica no Brasil foram redescobertas e dessa forma a fitoterapia e a botânica passaram a ser compreendidas como aliadas na melhoria de qualidade de vida da população brasileira (O PODER..., 1991; BRAGA 2001).

Portanto, a partir das informações contextualizadas, este estudo experimental visa apresentar um método alternativo de tratamento cancerígeno, utilizando plantas medicinais ao invés de medicamentos agressivos e de uso prolongado, buscando diminuir o sofrimento dos pacientes, melhorar e ampliar os métodos de tratamento já existentes, além de averiguar a interferência do extrato de *Casearia sylvestris* na angiogênese, quando associado ao tumor de Ehrlich.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A guaçatonga, o tumor de Ehrlich e a membrana corioalantoidea possuem aspectos e características distintos que foram avaliados durante este estudo experimental, sendo uma importante etapa para a conclusão do projeto; as descrições e características de cada um estão classificadas nos tópicos abaixo.

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E FÍSICAS DA *CASEARIA SYLVESTRIS*.

A planta *Casearia Sylvestris* pertence à família Flacourtiaceae (SCAVONE et al., 1979 apud GODOI, 2013) que ao total compreende cerca de 86 gêneros e mais de 800 espécies, distribuídas em regiões como América, África, Ásia, Malásia, Austrália e Ilhas do Pacífico. Já no Brasil a família possui 21 gêneros e 117 espécies distribuídas nos diferentes ecossistemas brasileiros, com grande capacidade de adaptação ao meio (Klein & Sleumer, 1984 apud MARQUETE, 2005). Segundo LE COINTE (1934, apud GODOI, 2013) o número de espécies mais comuns no Brasil, não ultrapassa 70 espécies do gênero *Casearia*.

A *Casearia Sylvestris* ou Guaçatonga, como é popularmente conhecida, é uma planta originária da América tropical, porém é encontrada em países como Cuba, México, Brasil, Bolívia, Peru e Argentina (CRF SP, 2016; LITTLE & WADSWORTH, 1964 apud FERREIRA, P et.,al, 2011). Por conta dessa variabilidade e ocorrência em muitas regiões do Brasil é conhecida ainda com outros diversos nomes como erva-de-lagarto, vassitonga, apia-acanoçu, bugre-branco, café-bravo, café-de-frade, cafezeiro-do-mato entre outros. Segundo TORRES & YAMAMOTO (1986, apud FERREIRA, P et.,al, 2011) na região brasileira é uma planta abundante, sendo encontrada principalmente em toda extensão do Amazonas (rio Tapajós) e parte do estado de São Paulo (CRF SP, 2016).

É considerada também ótima para arborização urbana, inclusive sob as redes elétricas, em função de seu pequeno porte. Em sua composição química destacam-se os diterpenos clerodânicos (casearinas), geralmente extraídos do extrato etanólico das folhas, que são característicos no gênero *Casearia* e servem como marcadores quimiotaxonômicos para o táxon *Casearia*. De acordo com a literatura, há uma possível ação desses compostos direcionados para as células tumorais, observando-se a atividade citotóxica em ratos. Normalmente esta planta floresce nos

meses de junho e agosto. O seu desenvolvimento no campo é consideravelmente rápido (DOS SANTOS, 2012). A figura abaixo demonstra a região onde há maior incidência da planta descrita no trabalho.

Figura 1 - Região da América do Sul com maior incidência de plantas da espécie *Casearia Sylvestris*



Fonte: Wikipédia (2019).

As características físicas da *Casearia* incluem porte de arbusto, lenhoso ou arbóreo, podendo chegar à 4 metros ou mais, dependendo da região (em mata aberta pode ultrapassar os 20 metros de altura). Suas folhas são inteiras e possuem formato de ponta de lança além de possuírem pontos translúcidos que podem ser indicativos da presença de glândulas. Suas flores são verdes, normalmente muito pequenas e exalam um forte aroma e suas sementes permanecem guardadas numa massa vermelha que a envolve como uma cápsula que é o fruto da árvore (SANTOS, 1995). Esse fruto é do tipo cápsula, com deiscência loculicida e as sementes podem ter arilo ou não. Finalmente o tronco pode apresentar a textura da casca de lisa a fissurada. (MARQUETE, 2010). A ilustração abaixo demonstra o aspecto físico das folhas e flores da guaçatonga.

Figura 2 - Aspectos físicos das
folhas
e flores da *Casearia*
Sylvestris



Fonte: O poder... (1991).

Na área medicinal, apesar das suas folhas serem a estrutura mais utilizada, também se aproveitam a casca do caule e as raízes. A folha da Guaçatonga possui diversos óleos essenciais como tanino, resina, flavonóide e saponinas, que justificam o poder cicatrizante da planta (O PODER..., 1991).

2.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Através da definição de medicamentos fitoterápicos segundo a Anvisa, constata-se que,

“São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais.”

As definições a respeito de medicamentos naturais e fitoterápicos encontram-se em constante mudança ao passar dos anos, de acordo com a correção e atualização de legislações pré-existentes. A tabela abaixo indica as principais legislações vigentes acerca do assunto.

Tabela 1 - Medicamentos fitoterápicos de acordo com a legislação Brasileira

Resolução	Definição
RDC Nº 10 , de 14 de março de 2010	“Art. 1º Fica instituída a notificação de drogas vegetais no âmbito da ANVISA, assim consideradas as plantas medicinais ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas, relacionadas no Anexo I desta Resolução.”
RDC Nº 14 , de 31 de Março de 2010	<p>Esta Resolução possui o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos.</p> <p>§ 1º São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas.</p> <p>§ 2º Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.</p> <p>§ 3º Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais.</p>
RDC Nº 26 , de 13 de maio de 2014	<p>“§ 2º São considerados produtos tradicionais fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização.”</p> <p>Para fins deste Guia e da RDC nº 26/2014, foi padronizado que o termo “chá medicinal” é a droga vegetal com fins medicinais, a ser preparada por meio de infusão, decocção ou maceração em água pelo consumidor. Ou seja, esse termo será utilizado para o</p>

	produto que antes era denominado, na RDC nº 10/2010, de “droga vegetal notificada”.
--	---

Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

2.3 TUMOR DE EHRLICH

O câncer é um termo derivado do grego “karkínios” que possui o significado de caranguejo. Sabe-se que não se trata de uma doença nova, e a descoberta de múmias egípcias com vestígios da doença comprova que ela já ocorria a mais de 3 mil anos antes de Cristo (ABRAHÃO, 2015).

O carcinoma mamário é datado pela primeira vez no ano de 1.600 a.C, em um papiro egípcio, sendo este recuperado e exposto no British Museum localizado em Londres. É considerado como o segundo tipo mais incidente de carcinoma na população feminina mundial e brasileira e também uma das principais causas de morte por câncer (SILVA, 1999; ZURRIDA, 1999).

Inicialmente, o tumor de Ehrlich foi descrito em 1905 por Paul Ehrlich como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Segundo Gobello (2001 citado por Gomes et al., 2006, p. 172), o carcinoma inflamatório mamário é caracterizado por uma anaplasia, ou seja, um crescimento e desenvolvimento de determinada célula (podendo esta ser epitelial, glandular ou trofoblasto) de forma anormal, fazendo com que esta perca sua função, formato e posteriormente promova no local do desenvolvimento do carcinoma sintomas como o eritema, calor, dor nas mamas e rápido crescimento.

Segundo Silva e Zurrída (1999), o carcinoma inflamatório da mama caracteriza-se por ser o mais agressivo e possui início rápido, sendo descrito por eritema difuso com espessamento da pele do local e possivelmente a mama poderá apresentar aspecto de pele de casca de laranja, além da formação de embolia de células tumorais e invasão linfática.

Através do estudo de células tumorais, Silva e Zurrída (1999, p. 64) constatam que,

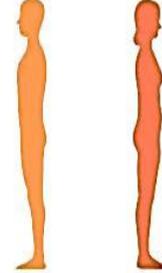
“[...] Células endoteliais ativadas nas extremidades dos capilares secretam ativadores de colagenase, uroquinase e plasminogênio para permitir o crescimento para dentro e para facilitar a chegada do oxigênio e nutrientes ao leito do tumor em crescimento. “

Com o surgimento de lesões in situ no epitélio mamário, ocorre a formação de micro vasos a partir de células endoteliais que estão próximas às lesões, cujo posteriormente se tornarão células neoplásicas. Para que ocorra o crescimento de micro vasos, as células endoteliais são estimuladas e alteram seu estado proliferativo, ou seja, formam-se e desenvolvem-se de forma mais rápida, além de proliferar-se somente quando ocorrer a formação de um clone de célula neoplásica; devido à estes dois fatores estimulatórios, determina-se que a angiogênese é indispensável à nutrição do tumor, além de estar associada atualmente em estudos que indicam uma relação entre a angiogênese e metástase, pois as células neoplásicas possuem capacidade de liberar fatores angiogênicos e estes ativam colagenases e plasminogênio, degradando posteriormente a membrana basal endotelial (PINHO, 2005).

O câncer de mama foi datado inicialmente em um papiro egípcio em 1.600 a.C., cujo fora recuperado e exposto no British Museum, localizado em Londres; além da descrição deste papiro, foram descobertas novos documentos antigos que indicavam pacientes com câncer de mama, devido aos sintomas e sinais apresentados. Porém, somente em 1810 que Muller descreveu a natureza celular do câncer (SILVA, 1999; ZURRIDA, 1999).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018), o câncer de mama é o primeiro mais frequente nas mulheres entre as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, sendo o segundo mais incidente no mundo (1,7 milhões de novos casos) logo em seguida ao primeiro, câncer de pulmão (1,8 milhões de novos casos). Segundo a mesma fonte, estima-se que em 2018 no Brasil cerca de 59.700 novos casos de câncer de mama foram registrados, predominando em mulheres (Tabela 2).

Tabela 2 – Registro de novos casos de câncer de mama

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: Inca (2018).

Segundo George Beatson (1896, citado por Clarke, 1998, p. 1246) a retirada dos ovários pode favorecer um paciente portador de câncer de mama, visto que em sua concepção e através de estudos pode-se observar a influência da ação dos hormônios ovarianos na evolução de um caso de neoplasia mamária; em 1895, Beatson relatou um caso de uma paciente que identificou um nódulo em sua mama durante a amamentação de seu filho. Após determinado tempo, a paciente relatou o crescimento deste nódulo e compareceu ao hospital onde Beatson atuava, sendo feita então a retirada do nódulo; porém, o mesmo identificou que o câncer havia se espalhado mais do que o esperado, permanecendo em um estado avançado. Com isto, George optou pela retirada dos dois ovários da paciente e relatou o caso à sociedade médica cirúrgica de Edinburg, repassando informações sobre a saúde da paciente com o passar dos anos (CLARKE, 1998).

A paciente tratada cirurgicamente com a retirada dos ovários sobreviveu por mais quatro anos; após este primeiro caso relatado, Beatson passou a descrever vários outros casos tratados com a retirada dos ovários, indicando que a cirurgia pode ser benéfica quando se escolhe um paciente cuidadosamente. Porém, este tipo de tratamento não é de alta recorrência, visto que pode utilizar-se da radioterapia para inibir a função dos hormônios ovarianos e impedir um crescimento exacerbado de células neoplásicas mamárias (CLARKE, 1998).

2.4 GUAÇATONGA E NEOPLASIA

Segundo MORITA et al., (1991, apud FELIPE 2014) através de análises fitoquímicas, demonstrou-se a presença de propriedades como diterpenos clerodânicos, diterpenos kauranos, derivados do ácido gálico, sesquiterpenos e derivados do ácido elágico na planta *Casearia sylvestris*. As casearinas são os diterpenos clerodânicos mais comumente encontrados nas folhas de *C. sylvestris*. Dessa substância já foram isoladas por volta de 20 tipos de moléculas, as quais foram denominadas de acordo com as letras do alfabeto de A a T, U, V e X. Essas moléculas que foram identificadas justificam o efeito antitumoral da mesma, sugerindo assim, ação antineoplásicas dos compostos isolados (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et.al., 1991; CARVALHO et al., 1998; BOLZANI et al. 1999; citado por FELIPE 2014).

Um estudo realizado por Itokawa et al (1990, apud FELIPE 2014) avaliaram a atividade antitumoral in vivo de casearinas A a F, isoladas das folhas de *C. sylvestris* sobre o sarcoma 180 inoculado em camundongos. Os autores observaram que o tratamento dos animais com as casearinas mostrou-se capaz de reduzir o tamanho do tumor significativamente, sendo a casearina C um dos compostos mais eficazes, já que demonstrou-se capaz de reduzir em torno de 98% o crescimento tumoral quando administrada na concentração de 100mg/Kg pelo período de 6 dias nas cobaias. Os efeitos promovidos pelos extratos e observados no estudo do autor da pesquisa devem-se em partes, à presença de casearina C nas substâncias administradas.

2.5 MEMBRANA CORIALANTÓIDE EM ESTUDOS ANGIOGÊNICOS

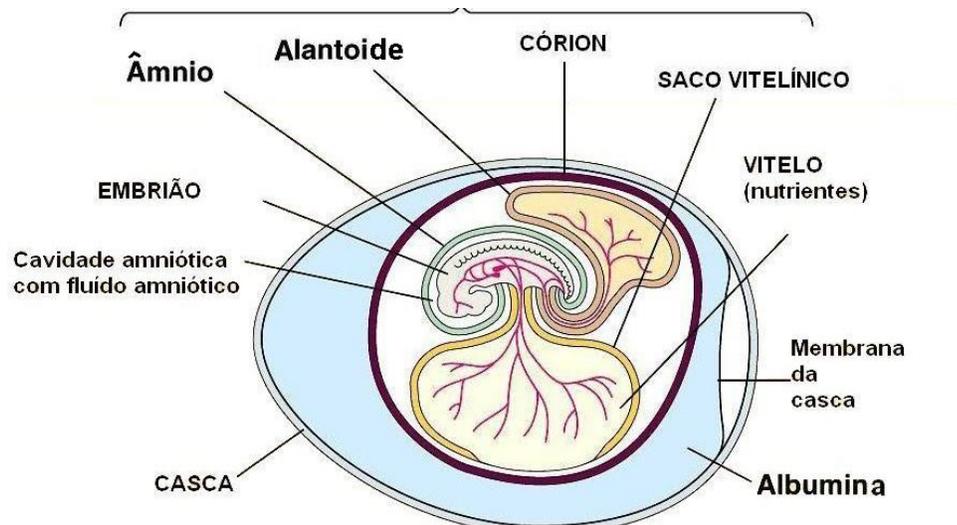
A MCA ou CAM é uma membrana formada através da fusão do cório (epitélio ectodermal) e alantoide (epitélio endodermal), sendo esta uma estrutura extra-embriônica (Figura 2). Durante o desenvolvimento do embrião, a MCA atua como um pulmão para a ave, visto que esta consegue promover a troca de gases entre a atmosfera (ambiente em que se encontra) e o embrião dentro do ovo; sendo altamente vascularizada, esta membrana desenvolve-se na fração interna do ovo entre o quarto e sexto dia (EGOSHI. et al, 2015).

Deste modo, o saco vitelínico constitui um dos anexos embriônicos cuja função é “armazenar” o vitelo para que o embrião tenha acesso a este durante seu

período de desenvolvimento; conforme o embrião se desenvolve e o vitelo (nutrientes) é utilizado, o saco vitelínico se reduz até o desaparecimento; a albumina também é uma fonte de nutrientes para o embrião durante seu crescimento (EGOSHI. et al, 2015).

Durante seu desenvolvimento, o embrião permanece envolto em uma membrana denominada âmnio, cujo espaço é preenchido pelo fluido amniótico com a função de proteger o embrião de choques mecânicos e dessecação; isto também ocorre com a casca do ovo, visto que a sua função é proteger o embrião contra choques e movimentos mais bruscos (EGOSHI. et al, 2015). A figura abaixo demonstra as estruturas citadas acima, que estão presentes durante o desenvolvimento embrionário.

Figura 2 - Estruturas do desenvolvimento embrionário



Fonte: Egoshi (2015).

Além da troca gasosa, a MCA possui um papel importante na mobilização do cálcio presente na casca do ovo, conseguindo recuperar parte deste cálcio e transferi-lo para o esqueleto da ave ali presente, contribuindo para o desenvolvimento embrionário (COSTA, 2010). A retirada da MCA da gema do ovo após quebrado é, de fato, uma execução difícil, visto que a olho nu sua visibilidade é baixa, possuindo somente uma leve coloração esbranquiçada (Figura 3).

Figura 3 - Rede vascularizada

presente em MCA

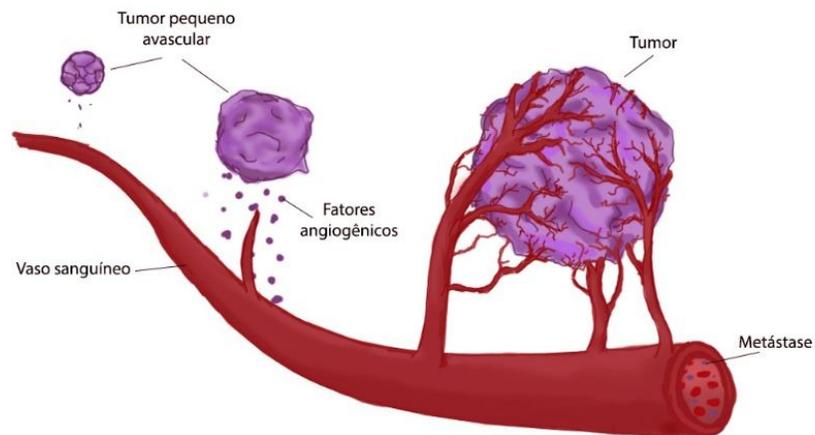


Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

Devido sua alta vascularização e fácil obtenção, a MCA atualmente é muito utilizada em estudos experimentais, visto que a determinação e avaliação de vasos e neovasos, bem como sua contagem, é de suma importância em estudos relacionados à angiogênese (COSTA, 2010).

Portanto, a angiogênese é extremamente importante e está diretamente relacionada com a formação e desenvolvimento neoplásico (Figura 4); estudos anteriores mostram que na presença de um tecido tumoral não vascularizado, são liberados enzimas e proteínas, como a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), ocasionando um aumento na formação de óxido de nitrogênio (NO) e de dióxido de carbono (CO₂) (PINHO, 2005). A figura abaixo demonstra o processo de formação de novos vasos sanguíneos.

Figura 4 - Formação de novos vasos



Fonte: Matheus Rizzatti Feron, (2018).

Estes eventos descritos irão favorecer a alteração da atividade proliferativa das células endoteliais próximas ao tecido tumoral, dando início à angiogênese e formando os microvasos, que estão revestidos por estas células e são responsáveis pela nutrição do tumor, auxiliando no desenvolvimento deste (PINHO, 2005).

3 OBJETIVOS

Após a coleta de dados, estabeleceram-se objetivos para o estudo experimental, a fim de avaliar se ao final do projeto estes foram alcançados; os objetivos geral e específicos estão descritos abaixo.

3.1 GERAL

Averiguar a interferência do tratamento com *Casearia sylvestris* na angiogênese relacionada ao crescimento de células tumorais.

3.2 ESPECÍFICOS

- Contribuir para aplicabilidade do método alternativo a utilização de cobaias, em modelo da membrana corioalantoidea em ovos;
- Discutir o efeito do tratamento utilizando-se extrato de *Casearia sylvestris*.
- Investigar o efeito do extrato de *Casearia Sylvestris* na membrana corioalantoidea e sua influência no desenvolvimento da angiogênese nos ovos;
- Observar a desenvoltura da angiogênese frente ao efeito das soluções empregadas nos diferentes grupos de ovos utilizando soro fisiológico, tumor de Erlich e extrato de guaçatonga.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Durante o estudo experimental foi necessário averiguar a metodologia mais adequada para extração e recuperação da membrana corioalantoidea, a fim de observá-la ao final do experimento; a metodologia utilizada está descrita abaixo.

4.1 MATERIAL

Foram utilizados 28 ovos fecundados de galinha que foram submetidos à células tumorais de Ehrlich. O estudo a ser realizado será de natureza exploratória, a partir da hipótese de que a angiogênese relacionada ao crescimento tumoral é afetada pelo tratamento com o extrato das folhas de *Casearia sylvestris*. A estratégia a ser realizada será a pesquisa experimental em ovos galados de galo índio gigante. Os dados obtidos através do estudo serão futuramente analisados por meio de uma metodologia qualitativa para que sejam corretamente compreendidos, com auxílio de gráficos e imagens microscópicas.

4.2 MÉTODOS

Os materiais utilizados para o processo prático foram: Água destilada, agulha de insulina com seringa, álcool 70%, béqueres, câmara de Neubauer, caneta para retroprojeter 2.0 preta, chocadeira, espátula de ponta reta, etiquetas adesivas brancasormol 37%, extrato de guaçatonga em pó, funil de vidro 50 mm, provetas, lâminas para microscopia 26x76 mm, micro-ondas, microscópio Óptico, microscópio estéreoescópio Lupa Binocular, ovos galados, pano multiuso tipo perflex, 28 ovos galados (separados em 4 grupos diferentes) papel de filtro 7 cm, parafina líquida, pincel escolar chato n2 , pipetas com capacidade para 100µl, placas de petri, ponteira amarela para pipetas, potes descartáveis com tampa, seringa com agulha 25x7, soro fisiológico estéril, tumor de Ehrlich diluído em solução fisiológica e tubo de ensaio com tampa de rosca.

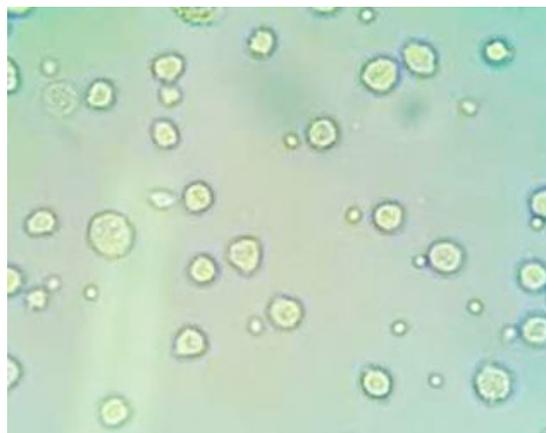
4.2.1 Preparo da solução do tumor de Ehrlich.

Empregaram-se as células tumorais do Tumor Ascítico de Ehrlich, obtidas através do laboratório localizado na Universidade Estadual Paulista de Marília-SP. Essas células foram mantidas in vivo através de repiques semanais no Biotério da Universidade do Sagrado Coração em Bauru-SP. No dia previsto para os ensaios científicos, foi recolhida uma alíquota de 10 mL de fluido acético através de punção peritoneal, realizada pela Prof^a Dulce Constantino.

Posteriormente com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico realizou-se a contagem celular do tumor afim de se descobrir a concentração atual da alíquota. Após a ciência sobre a concentração atual, realizou-se uma diluição em solução salina fisiológica estéril em tubo de ensaio com tampa de rosca, preparando uma suspensão contendo 10^6 células tumorais por mL para uso.

As células do tumor de Ehrlich, após recolhidas e preparadas na diluição correta, foram imediatamente inoculadas nos ovos embrionados, já que essas células não sobrevivem muito tempo quando expostas fora do organismo vivo, impossibilitando seu armazenamento em local refrigerado. O aspecto microscópico das células tumorais encontrado no microscópio óptico é apresentado na figura a seguir.

Figura 5 - Aspecto microscópico do tumor ascítico de Ehrlich no microscópio óptico



Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

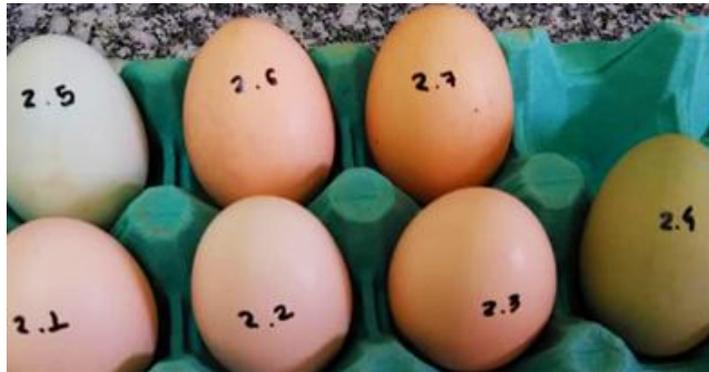
4.2.2 Preparo do Extrato de Guaçatonga

A guaçatonga em pó foi adquirida através de encomenda online, pela loja online: Beleza da Terra, localizada em Curitiba-PR. Para o preparo da guaçatonga, foram aquecidos no forno micro-ondas 30 mL de água destilada (previamente medidos em proveta) em béqueres; após a fervura da água, adicionou-se 1 g de guaçatonga em pó que permaneceram em descanso durante 10 minutos, a fim de promover a difusão. Logo após o tempo estimado, o extrato foi filtrado com auxílio de filtro de vidro e papel de filtro em um frasco de vidro com tampa de rosca, que foi identificado e armazenado em geladeira até o momento do uso. Os grupos de ovos que receberam a alíquota de guaçatonga foram: Grupo 3 (100ul) e grupo 4 (50ul). O extrato de guaçatonga foi utilizado no mesmo dia em que foi preparado, evitando interferentes.

4.2.3 Preparo dos ovos e realização do experimento

Os ovos foram adquiridos através do Sítio Shatoshi Ito, localizado em Piratininga-SP. Foram empregados 28 ovos fertilizados de galinha, separados em quatro grupos contendo sete ovos cada. Inicialmente, os ovos foram limpos com auxílio de panos embebidos em álcool 70% e identificados com caneta retroprojetora preta, sendo o primeiro número referente ao grupo pertencente ao ovo, e o segundo número, referente à ordem dos ovos dentro de um mesmo grupo. O grupo 1 (soro fisiológico) recebeu as identificações: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 e 1.7; O grupo 2 (tumor de Ehrlich) recebeu as identificações: 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 e 2.7; O grupo 3 (guaçatonga) recebeu as identificações: 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7; O grupo 4 (guaçatonga + tumor) recebeu as identificações: 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7, como é designado na figura a seguir.

Figura 6 - Identificação dos grupos na casca dos ovos



Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

Deste modo, ao total, serão quatro grupos com o total de sete ovos cada, com seus respectivos números, sendo eles: o controle negativo (soro fisiológico estéril), extrato de guaçatonga, tumor de Ehrlich associado ao extrato de guaçatonga e tumor de Ehrlich isolado, sendo que estes receberão uma alíquota de 100µL da suspensão de células tumorais de Ehrlich na concentração de 10^6 células tumorais por mL, bem como uma alíquota de 100µL para cada um dos outros extratos e fluidos.

Após a limpeza e marcação dos ovos, estes foram incubados numa estufa (chocadeira) a 37° C, a uma umidade em torno de 60 a 70%, por 24 horas. A acomodação dos ovos foi feita através de fileiras verticais com no máximo 5 ovos, a fim de não comprometer a movimentação mecânica do equipamento, de acordo com a figura a seguir.

Figura 7 - Disposição dos grupos de ovos na chocadeira



Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

No segundo dia de incubação (após as 24 horas), os ovos foram retirados da chocadeira e realizou-se uma abertura na base maior de cada um dos ovos com o auxílio de uma agulha de 25x7 expondo a MCA.

Logo após, cada um dos ovos receberam uma alíquota de 100 μ L dos seus respectivos fluidos e extratos, que foram dosados em uma pipeta com capacidade para 100 μ L, sendo posteriormente aplicados com uma agulha de insulina com seringa na abertura feita previamente. Após receber o conteúdo da seringa, fecharam-se as aberturas dos ovos com parafina líquida e retornaram estes à chocadeira por mais 24 horas. A imagem abaixo representa como os ovos foram vedados com a parafina líquida, visando a conservação das propriedades naturais do desenvolvimento.

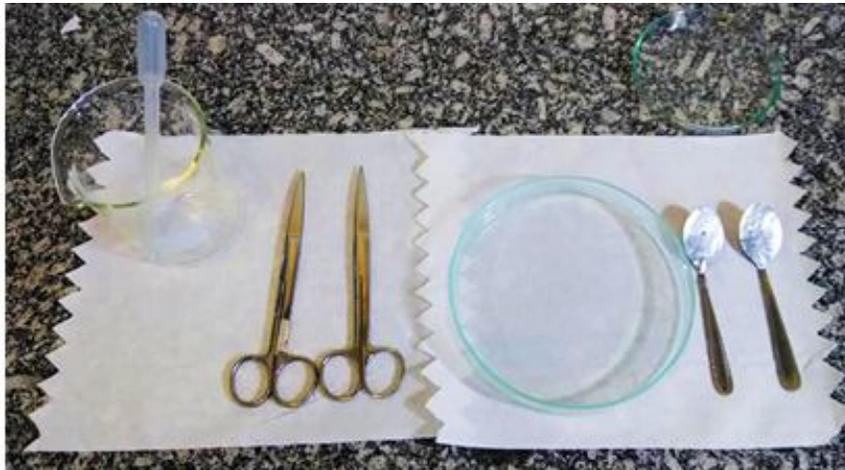
Figura 8 – Vedação dos ovos com a utilização de parafina líquida



Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

Ao segundo dia de estudo, os ovos foram retirados da chocadeira e permaneceram em temperatura ambiente durante 10 minutos para evitar que a MAC se associe a parte interna da casca do ovo e quebre no momento de sua retirada; a membrana corioalantoidea foi removida após a quebra do ovo em uma placa de Petri com água. A figura abaixo representa os equipamentos utilizados para a remoção da membrana do ovo.

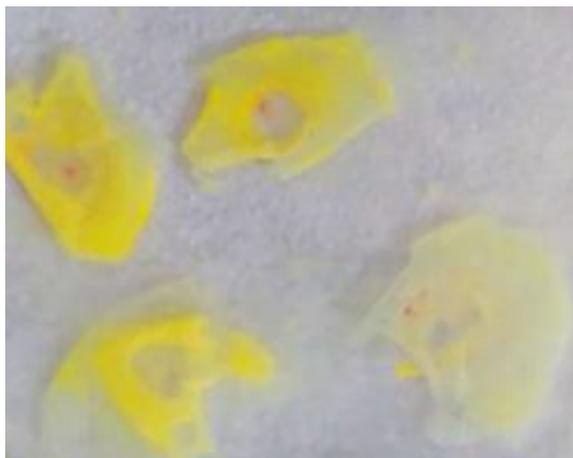
Figura 9 - Equipamentos cirúrgicos utilizados para remoção da membrana corioalantóide



Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

A obtenção das membranas foi realizada cortando-se as laterais da gema do ovo com uma tesoura cirúrgica de 22 cm e deslocando-se a membrana com uma espátula de ponta reta, depositando-se em placas de Petri contendo formol 37%. Na solução formol, as membranas apresentaram o aspecto contido na figura a seguir.

Figura 10 – Aspecto das membranas corioalantóide após sua remoção



Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

As membranas corioalantóicas foram colocadas em lâminas de microscopia de 26x76 mm com o auxílio de pincéis de ponta chata, após permanecerem por alguns minutos embebidas em béqueres contendo água destilada; com as lâminas prontas, estas foram observadas em microscópio estereoscópio lupa binocular em aumento de 10x e lente objetiva zoom de 1x e fotografadas com o auxílio de celulares smartphones. As imagens receberam tratamento com o programa Adobe Photoshop® e foram aplicadas as seguintes alterações nas imagens: Brilho/contraste, saturação, vibração e filtro de inversão para destacar a formação dos vasos sanguíneos e facilitar a comparação entre as membranas. As imagens estão disponíveis no item: “5. Resultados e discussões” a partir da página 31.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

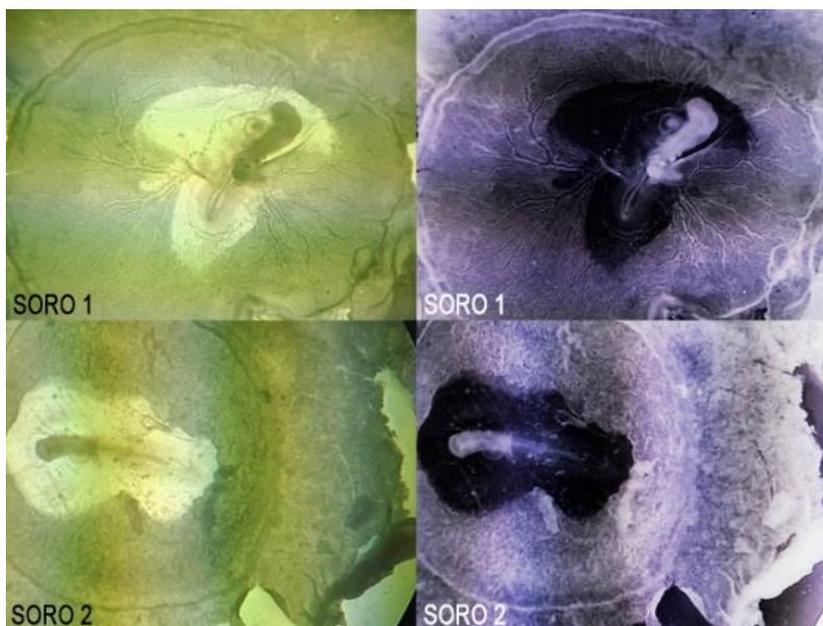
A vascularização da membrana demonstrou interferência em relação ao desenvolvimento normal do grupo controle de acordo com cada tipo de tratamento; os resultados estão descritos abaixo, separados em tópicos conforme cada grupo experimental.

5.1 RESULTADOS

5.1.1 Grupo 1: Soro fisiológico (100ul)

O grupo do soro fisiológico é o controle negativo do estudo; empregou-se o mesmo como parâmetro de comparação onde se relatou um padrão normal de produção de vasos sanguíneos, como é descrito na figura a seguir. No total de 7 ovos incubados, executou-se a remoção da MCA de apenas 4 ovos.

Figura 11 - Aspecto microscópico da membrana corioalantóide (CAM) dos ovos controles pertencentes ao “Grupo 1: Soro fisiológico (100ul)”, após 48 horas de incubação

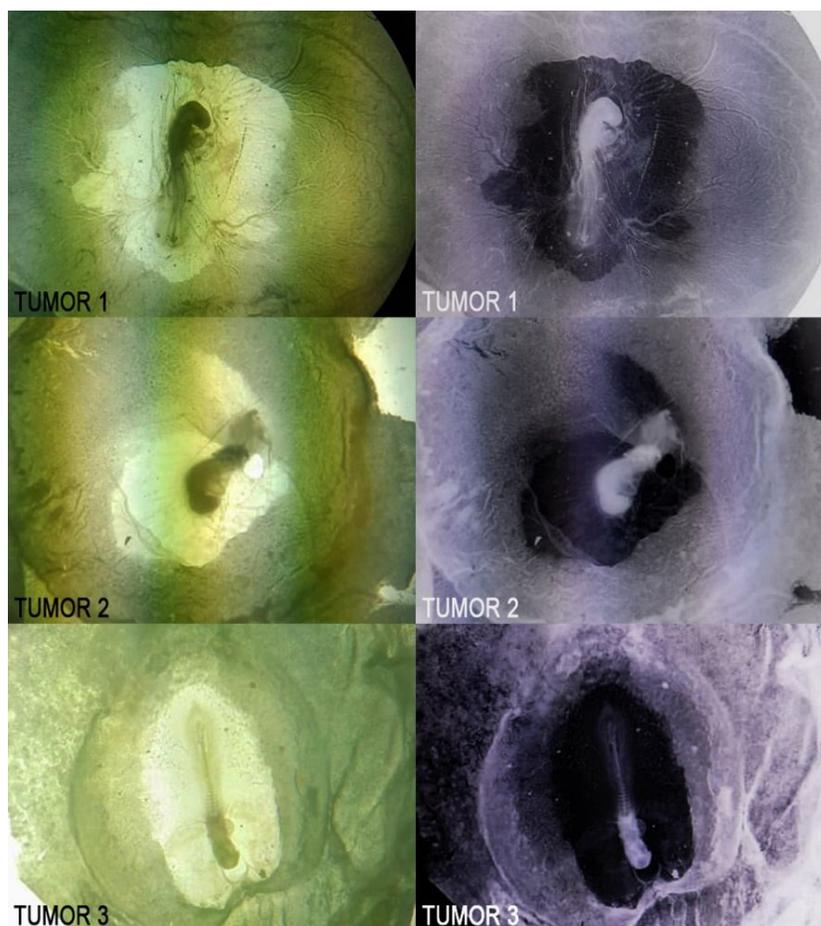


Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

5.1.2 Grupo 2: Tumor de Ehrlich (100ul)

Em comparação ao grupo controle, o “grupo 2: Tumor de Ehrlich”, apresentou aceleração no desenvolvimento embrionário e quanto a produção de vasos sanguíneos, estes apresentaram ramificações mais evidenciadas, demonstradas na figura a seguir. Num total de 7 ovos incubados, foi possível remover a MCA de apenas 3 ovos.

Figura 12 - Aspecto microscópico da membrana corioalantóide (CAM) dos 3 ovos referentes ao “Grupo 2: Tumor de Ehrlich (100ul)”, após 48 horas de incubação

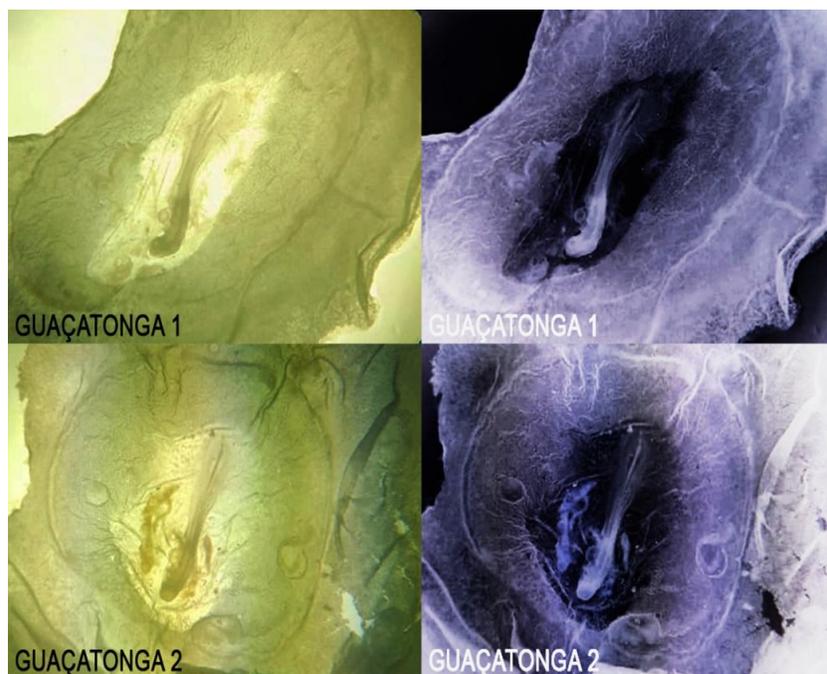


Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

5.1.3 Grupo 3: Guaçatonga (100ul)

Em comparação ao grupo controle, o “grupo 3: Guaçatonga”, apresentou diminuição no desenvolvimento embrionário e quanto a produção de vasos sanguíneos, estes apresentaram ramificações semelhantes, demonstrados na figura a seguir. Num total de 7 ovos incubados, foi possível remover a MCA de apenas 2 ovos.

Figura 13 - Aspecto microscópico da membrana corioalantóide (CAM) dos 2 ovos referentes ao “Grupo 3: Guaçatonga (100ul)”, após 48 horas de incubação

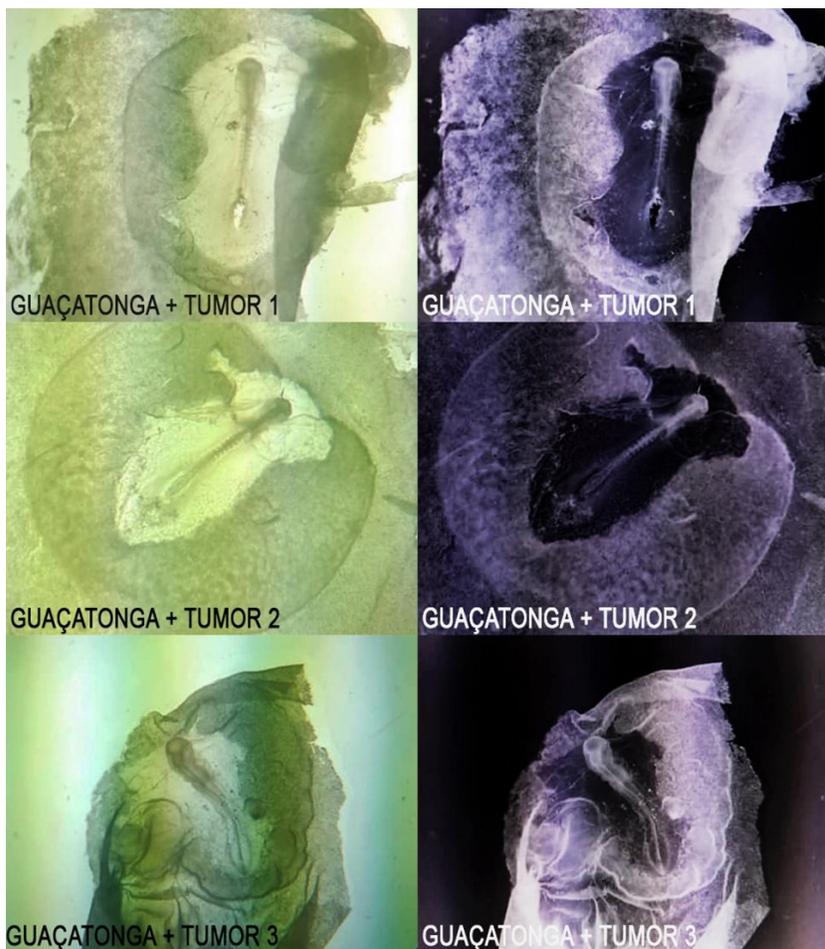


Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

5.1.4 Grupo 4: Guaçatonga (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul)

Em comparação ao grupo controle negativo e aos grupos anteriores das substâncias isoladas, o “grupo 4: Guaçatonga + tumor”, apresentou diminuição no desenvolvimento embrionário e quanto a produção de vasos sanguíneos, estes apresentaram ramificações menos evidentes, demonstrados na figura a seguir. Num total de 7 ovos incubados, foi possível remover a MCA de apenas 3 ovos.

Figura 14 - Aspecto microscópico da membrana corioalantóide (CAM) dos 3 ovos referentes ao “Grupo 4: Guaçatonga (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul)”, após 48 horas de incubação



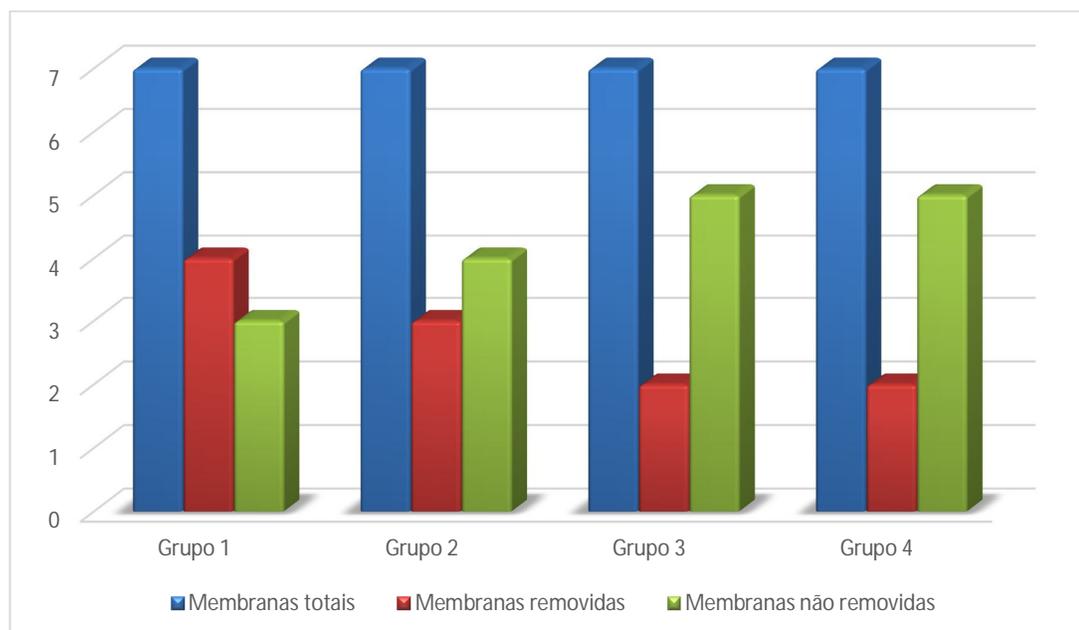
Fonte: Elaborada pelas autoras (2019).

5.1.5 Discussão dos resultados

Segundo o gráfico abaixo (Gráfico 1), em relação ao total de 7 ovos incubados, o grupo 1 apresentou 57,14% de membranas removidas, enquanto o grupo 2 apresentou 42,85% de membranas, e os dois últimos grupos apresentaram 28,57% de membranas removidas quando comparadas ao total de membranas incubadas.

A quantidade de ovos onde não foi possível a remoção da membrana deve-se a fatores comuns ao desenvolvimento natural, onde não há garantia de que 100% dos ovos utilizados sejam galados, tratando-se de um processo natural. Outro fator interferente é a movimentação mecânica, onde não há garantia que todos os ovos adicionados à chocadeira receberam adequadamente a força necessária para evitar que a membrana fique aderida a casca do ovo, ocorrendo sua quebra no momento da remoção da mesma. Outros fatores como temperatura e umidade da água também foram essenciais para o desenvolvimento embrionário adequado.

Gráfico 1 - Comparação de membranas removidas em relação ao total de ovos incubados



Fonte: Elaborado pelas autoras (2019).

A variável de membranas retiradas após 48 horas de incubação ocorre devido ao tempo em que este experimento foi desenvolvido (Gráfico 1); segundo autores

consultados, a MCA é formada a partir do quarto dia de desenvolvimento embrionário. (EGOSHI. et al, 2015) Devido a isto, as MCA removidas durante o estudo foram em menor quantidade quando comparadas ao número de ovos incubados no início dos procedimentos, pois o experimento obteve tempo máximo de 48 horas; deve-se levar em consideração que os ovos foram adquiridos de um fornecedor, não sendo possível estipular quando ocorreu a fecundação destes, coleta e armazenamento, ocasionando variáveis nos processos desenvolvidos.

Levando em consideração os resultados obtidos, pode-se observar que o grupo 2 apresentou ramificações mais evidenciadas quando comparados ao grupo 1 (controle negativo); isto ocorreu pois o grupo 1 não apresenta substâncias interferentes que possam interagir no desenvolvimento embrionário. Logo, o grupo 2 possui o tumor de Ehrlich diluído que interfere no desenvolvimento embrionário, levando à aumento nas ramificações dos vasos formados; segundo autores consultados durante o experimento, a presença de um tecido ou célula tumoral favorece a liberação de enzimas e proteínas que podem desencadear a angiogênese, favorecendo a formação de novos vasos (PINHO, 2005). Esta tese é comprovada quando observada a relação de ramificações do grupo 2, que demonstra aumento devido a presença de uma célula neoplásica quando comparado ao controle negativo. Pode-se observar também que nas membranas removidas, há presença de pontos hemorrágicos por toda sua extensão; isto indica que o tumor instalado produziu uma vascularização própria e disfuncional, e que este processo permaneceria por quanto tempo o ovo permanecesse incubado, favorecendo a formação de novos vasos (LABNETWORK, 2015).

Entretanto, o grupo 3 (guaçatonga) quando comparado ao controle negativo, apresentou similaridade nas ramificações dos novos vasos sanguíneos; a literatura demonstra que a guaçatonga possui propriedades capazes de favorecer a angiogênese e por consequência a cicatrização. Neste estudo, o resultado está em concordância com as informações consultadas, visto que se observou a formação de vasos na membrana, porém não em maior quantidade, o que não é citado pelos autores; a guaçatonga pode favorecer a angiogênese, porém no experimento, não interferiu na quantidade de vasos formados.

Em relação ao último grupo avaliado (grupo 4), pode-se observar que em comparação ao grupo controle, este apresentou ramificações menos evidenciadas. Segundo a literatura, a guaçatonga possui propriedades antitumorais que

previamente foram estudadas por outros autores e caracterizadas de acordo com seu potencial de ação (Itokawa et al, 1990, apud FELIPE 2014); um estudo realizado anteriormente demonstrou que a fração “casearina C” apresentou maior eficácia em seu efeito antitumoral, podendo ser relacionada ao efeito apresentado neste estudo (Itokawa et al, 1990, apud FELIPE 2014).

Porém para comprovação desta teoria, faz-se necessário promover a separação de cada uma das frações da guaçatonga para testes mais específicos. Portanto, pode-se comprovar que o grupo 4 apresentou ramificações menos evidenciadas quando comparadas ao controle negativo e as substâncias isoladas, devido a ação da guaçatonga sobre o tumor diluído.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do presente estudo científico, pode-se observar a influência que algumas substâncias possuem sobre neovascularização, dependendo da administração das mesmas no modelo de estudo apresentado. Apesar de a literatura encontrada apontar que a membrana corioalantóide (MAC) é formada a partir do quarto dia de desenvolvimento do embrião, os testes realizados neste estudo comprovaram ser possível realizar este procedimento a partir das 48 horas de desenvolvimento embrionário aviário. Esta condição permite a economia do tempo, diminuição do período de incubação dos ovos e possibilita a antecipação do método de estudo. Portanto, pode-se concluir perante o experimento realizado que a guaçatonga possui propriedades antitumorais que influenciam no desenvolvimento embrionário aviário e em sua vascularização; porém para fins medicinais, faz-se necessário a realização de outras metodologias para confirmação do resultado obtido e para utilização como tratamento alternativo para tumores.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, K. D. S. **ABC do câncer - Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer.**
- BRAGA, C. M. **Histórico da utilização de plantas medicinais.** Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás. Brasília 2001.
- BRANDELLI, C. L. C. Plantas medicinais: História e conceitos.
- BRASIL. **Anvisa (2018).** RDC nº 26/2014. Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos em 26 de Outubro de 2019.
- BRASIL. RDC nº. 26., de 13 de Maio de 2014. **Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília, DF, p. 1, maio 2014.
- CLARKE, M. J. Ovarian ablation in breast cancer, 1896 to 1998: milestones along hierarchy of evidence from case report to Cochrane review. **Education and debate of BMJ journal,** Oxford, p. 1246-1248, out. 1998.
- Conselho Regional de Farmácia.** Resolução RDC 354. Disponível em: <http://portal.crfsp.org.br/index.php/juridico-sp-42924454/legislacao/2027-resolucao-rdc-no-14-de-31-de-marco-de-2010.html>. Acesso em: 24 de Setembro de 2019.
- COSTA, E. V. L. **Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codorna japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas ao campo eletromagnético de 60 Hz.** 2010. 101 f. Dissertação (Mestre em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- DO VALE, N.B. **A Farmacobotânica, ainda tem lugar na Moderna Anestesiologia?** Rev. Bras. Anestesiol. v.52, n.3, p.368-380, 2002.
- DOS SANTOS, A.G.; FERREIRA, P.M.P.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; SILVA, G.H.; BOLZANI, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.O.; CAVALHEIRO, A.J. **Casearin X, Its degradation product na do ther clerodane diterpenes from leaves of Casearia sylvestris: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells.** Chemistry and Biodiversity. v.7, n.1, p.205-215, 2010.
- EGOSHI, C.T. et al. Quantificação da angiogênese induzida por tumor em membrana corioalantóica de embrião de galinha. **Bioscience Journal,** Uberlândia, v. 31, n.1, p. 303-310, Jan. 2015. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/23449/15938>. Acesso em: 24 Maio 2019.
- FELIPE, K. **Estudo do mecanismo de ação antiproliferativa e antitumoral de extratos de *casearia sylvestris* e de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio.** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

FERREIRA, P et., al. **Folk uses and pharmacological properties of Casearia sylvestris: a medicinal review.** Annals of the Brazilian Academy of Sciences. Maio, 2011.

FLOR, A.S.S.O; BARBOSA, W.L.R. **Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá – PA.** Universidade Federal do Pará. Belém, PA.

GODOI, A, P, T. **Estudo do óleo essencial de Casearia Sylvestris e da formulação de enxaguatório bucal. Caracterização química, citotoxicidade, potencial antimicrobiano e efeito nas propriedades dos materiais odontológicos estéticos.** Universidade de São Paulo – Faculdade de odontologia de Ribeirão Preto, 2013.

GOMES, C; et al. Carcinoma inflamatório mamário canino. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, p. 171-174, Maio 2006.

LORENZI, H; MATOS, F. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas.** Nova Odessa: Plantarum, 2002.

MARQUETE, R. **O gênero casearia jacq. No estado do rio de janeiro (brasil) – flacourtiaceae.** Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro Escola Nacional de Botânica Tropical. Rio de Janeiro, 2005.

MARQUETE, R. MANSANO, V.F. **A new species of Casearia (Salicaceae) from Brazil.** Journal of Systematics and Evolutions. v.51, n.2, p.228-229, 2013.

Ministério da Saúde. RDC 26. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf. Acesso em 18 de Setembro de 2019.

O poder das plantas. São Paulo: Globo, 1991.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Seção de genética e biologia molecular do departamento de medicina da Univille**, Joinville, p. 396-402, dez. 2005.

Plantas medicinais e fitoterápicos. Secretaria dos colaboradores comissão assessora de plantas medicinais e fitoterápicos. São Paulo, 2016.

SANTOS, F, B. **A natureza e seu poder curativo.** Belo Horizonte: Cuatiara, 1995.
SILVA, E. O; ZURRIDA, S. **Câncer de mama: um guia para médicos.** Atibaia: Atlântica, 1999.

APÊNDICE A - FLUXOGRAMA

