Rafael Lanciani Brunetti

Avaliação dos efeitos antineoplásicos *in vitro* e *in vivo* do látex da
Euphorbia tirucalli (aveloz) no melanoma murino B16/F10

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier
Hernandez Blazquez

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2018

Rafael Lanciani Brunetti

Avaliação dos efeitos antineoplásicos *in vitro* e *in vivo* do látex da
Euphorbia tirucalli (aveloz) no melanoma murino B16/F10

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier
Hernandez Blazquez

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Brunetti, Rafael Lanciani

Avaliação dos efeitos antineoplásicos in vitro e
in vivo do látex da Euphorbia tirucalli (aveloz) no
melanoma murino B16/F10 / Rafael Lanciani
Brunetti. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Francisco Javier Hernandez Blazquez.

Descritores: 1.Euphorbia 2.Hormese 3.Melanoma
4.Metástase neoplásica 5.Camundongos 6.Pulmão
7.Neoplasias

USE/FM/DBD-126/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

AGRADECIMENTOS

Terminar esta dissertação para mim foi uma grande conquista. E esta vitória foi realizada graças à contribuição de várias pessoas. E são essas pessoas que agradeço com todo o meu carinho...

À minha mãe Sonia Regina Lanciani Brunetti e ao meu pai Gilson Brunetti, pelo carinho, dedicação, momentos difíceis, amor e por me ajudarem a ser a pessoa que eu sou. E também a minha irmã Cristina Lanciani Brunetti por todos os momentos bons, pelos shows compartilhados, pelo amor e por todo o seu carinho.

Ao meu cunhado Renato Bussola que me ajudou muito nessa dissertação muito obrigado mesmo de coração.

Aos meus orientadores Prof^a Dr^a Maria Lucia Zaidan Dagli e ao Prof^o Dr^o Francisco Javier Hernandez Blazquez por ter me aceitado como orientando, mas principalmente, por me receber com os braços abertos em um momento difícil da minha carreira. Obrigado por ter acreditado sempre em mim (talvez mais que eu mesmo).

À Prof^a Dr^a Cláudia Mori pela presença e constante ajuda, além de tirar minhas dúvidas e pelas dicas valiosas.

À Prof^a Dr^a Cristina Massoco e Nicole do Laboratório de Farmacologia pela ajuda em cultivar as células de melanoma quase no final do meu trabalho

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada: Ivone pela imensurável ajuda nos cultivos das células, pelos conselhos sempre dados, carinho, sem sua ajuda não haveria trabalho. Tatícia e Nayra por toda ajuda em que foi necessário no trabalho e pelas brincadeiras e fofocas. Diego pela ajuda na extração e diluição do látex da *Euphorbia tirucalli*.

Especialmente ao meu amigo Herculano por todos os conselhos e brincadeiras e nas viagens para buscar nitrogênio.

Aos funcionários do biotério Luciana, Nelsinho, cujo trabalho é essencial para o departamento.

Ao colega novo que fiz nestes últimos meses de mestrado Rennan Olio foi muito importante me ajudando nas fotos e em todos os últimos momentos que foram difíceis. Muito obrigado.

À Marguiti que me apresentou todo o laboratório, por toda a ajuda, conselho e brincadeiras. Se tornou uma amiga muito importante para mim e sem você não haveria trabalho.

Especialmente ao meu amigo Dennis pelos almoços na copa, brincadeiras, pelas conversas jogadas fora, pelos conselhos, por ter me ajudado na fotografia para o meu trabalho.

Especialmente ao meu amigo Pedro Navaz por ter me ajudado aos 45 minutos do segundo tempo e por compartilhar momentos bons, principalmente discutindo sobre futebol americano. Muito obrigado.

Ao Programa de Fisiopatologia Experimental da FMUSP.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado que permitiu minha dedicação a este projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS- Organização Mundial da Saúde

Hep-2- Células escamosas da laringe

ITPRI- Receptor de 1,4,5-trifosfato de inositol, tipo 1

CD55- Fator de aceleração

ANXA1- Anexina 1

UV- Radiação ultravioleta

INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

MES- Melanoma de espalhamento superficial

MN- Melanoma modulador

MLM- Melanoma lentigo maligno

MLA- Melanoma lentiginoso acral

MEC- Matriz extracelular

BET- Fração biopolimérica

IFN-gama- Gama interferon

IL-2- Interleucina-2 intracelular

ERK 1/2- Quinase regulada por sinal extracelular 1/2

DMEM- Dulbeco's Modified Eagle Medium

MTT- Tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide

MI- Grupo melanoma volume inicial

MF- Grupo melanoma volume final

MTI- Grupo melanoma tratado volume inicial

MTF- Grupo melanoma tratado volume final

M- Grupo melanoma

MT- Grupo melanoma tratado

H&E- Hematoxilina e eosina

TPA- 12-Otetradecanoiphorbol-13-acetato

CXCL1/KC- Quimiocina derivada de queratinócitos

MIP-2- Proteína inflamatória de macrófago-2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidade de látex corresponde a cada diluição presente em cada poço das placas de 250µL.....	27
Tabela 2- Média e desvio padrão do volume inicial e final dos tumores subcutâneos de camundongos inoculados com células de melanoma B16/F10.....	36
Tabela 3- Delineamento do desenvolvimento de colônias de melanoma experimentais <i>in vivo</i> no grupo melanoma.....	38
Tabela 4- Delineamento do desenvolvimento de colônias de melanoma experimentais <i>in vivo</i> no grupo melanoma tratado.....	38
Tabela 5- Média e desvio padrão da proporção de área das colônias de melanoma nos pulmões.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem <i>Euphorbia tirucalli</i>	21
Figura 2- Camundongos eutanasiados após 14 dias de tratamento com O látex da <i>Euphorbia tirucalli</i>	37
Figura 3- Pulmões de camundongos C57BL/6.....	39
Figura 4- Fotomicografia de corte histológico de tumor B16/F10 após 10 dias de inoculação no subcutâneo dorsal lombar de Camundongo BALB/c.....	42
Figura 5- Fotomicografia de corte histológico de tumor B16/F10 após 10 dias de inoculação no subcutâneo dorsal lombar de camundongo BALB/c.....	42
Figura 6- Fotomicografia de corte histológico de pulmão de camundongos C57BL/6 inoculado na veia da cauda melanoma B16/F10.....	43
Figura 7- Fotomicografia de corte histológico de pulmão de camundongos C57BL/6 inoculado na veia da cauda melanoma B16/F10.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Análise da viabilidade celular pelo método do MTT após 24h de tratamento com diferentes diluições do látex da *E. tirucalli*..... 33
- Gráfico 1-** Análise da viabilidade celular pelo método do MTT após 48h de tratamento com diferentes diluições do látex da *E. tirucalli*..... 34
- Gráfico 1-** Análise da viabilidade celular pelo método do MTT após 72h de tratamento com diferentes diluições do látex da *E. tirucalli*..... 35

Normalização adotada

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Melanoma.....	16
2.2 Metástase.....	19
2.3 <i>Euphorbia tirucalli</i>	20
3 OBJETIVOS.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Coleta do látex da <i>E. tirucalli</i>	24
4.2 Diluição do látex da <i>E. tirucalli</i> e armazenamento.....	25
4.3 Cultivo das células B16/F10.....	25
4.4 Experimento <i>in vitro</i>	26
4.4.1 Análise da viabilidade celular: Ensaio do MTT.....	26
4.5 Experimento <i>in vivo</i>	28
4.5.1 Animais.....	28
4.5.2 Inoculação de células de melanoma B16/F10 no subcutâneo dorsal lombar de camundongos.....	28
4.5.3 Inoculação de células de melanoma B16/F10 para desenvolvimento de colônias pulmonares em camundongos.....	29
4.5.4 Quantificação das colônias pulmonares.....	29
4.5.5 Eutanásia e necropsia dos camundongos, fixação de tecidos e preparação de lâminas.....	30
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
6 RESULTADOS.....	32
6.1 Análise da viabilidade celular: tratamento com o látex da <i>E. tirucalli</i>	

sobre células de melanoma murino B16/F10.....	32
6.2 Avaliação do tratamento com o látex da <i>E. tirucalli</i> sobre o volume tumoral <i>in vivo</i>	35
6.3 Avaliação do tratamento com o látex da <i>E. tirucalli</i> sobre o desenvolvimento de colônias de melanoma <i>in vivo</i>	37
6.4 Quantificação das colônias de melanoma nos pulmões.....	39
6.5 Análise histopatológica.....	40
6.5.1 Experimento 1: inoculação subcutânea de células de melanoma murino B16/F10.....	40
6.5.2 Experimento 2: inoculação na veia da cauda de células de melanoma murino B16/F10.....	41
7 DISCUSSÃO.....	44
8 CONCLUSÃO.....	49
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

RESUMO

Brunetti RL. *Avaliação dos efeitos antineoplásicos in vitro e in vivo do látex da Euphorbia tirucalli (aveloz) no melanoma murino B16/F10* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O melanoma é uma neoplasia maligna derivada de melanócitos, o qual tem uma letalidade elevada devido a sua característica altamente invasiva e agressiva.

O caule da *E. tirucalli* produz um látex de coloração branca usado na medicina popular para o tratamento de neoplasias, que possui diversos constituintes ativos, incluindo o eufol, euforbol e isoeuforal. O objetivo do trabalho foi estudar os efeitos antineoplásicos *in vitro* e *in vivo* do látex da *Euphorbia tirucalli* em alguns modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Células de melanoma B16/F10 foram tratadas com as seguintes diluições seriadas do látex a partir de uma concentração inicial de 0,1037µg/µL: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/5096, 1/11192. A viabilidade celular foi avaliada por MTT às 24, 48 e 72 horas. No experimento primeiro *in vivo*, células de melanoma foram inoculadas no tecido subcutâneo dorsal lombar de camundongos BALB/c e 10 dias após tratados, ou não, com 0,467µg/25g em volume de 200µL de látex de *E. tirucalli* por gavagem durante 14 dias. No segundo experimento, camundongos C57BL/6 foram inoculados com células de melanoma B16/F10 na veia da cauda para colonização pulmonar. No experimento *in vitro*, observou-se uma diminuição da viabilidade celular nas diluições de 1/1024 e 1/11192 no tempo de 24h e às 48h houve uma diminuição da viabilidade celular nas diluições de 1/128, 1/256, 1/2048 e 1/11192. No experimento *in vivo*, observou-se que o látex da *E. tirucalli* foi capaz de reduzir o volume dos tumores subcutâneos em 53,5%, enquanto que o grupo não tratado o volume aumentou em 818,1%. No experimento de inoculação na veia da cauda com melanoma B16/F10 a administração de látex da *E. tirucalli* foi capaz de reduzir a fração de área pulmonar ocupada pelas colônias para 10,5% enquanto que no grupo não tratado, a fração de área pulmonar com colônias de melanoma aumentou para 35%. Não foram

observadas alterações histopatológicas em nenhum dos grupos experimentais em outros órgãos. Os efeitos de redução de tumor, redução das colônias pulmonares e da viabilidade celular podem ser devidos à ação dos constituintes do látex que já demonstraram ter atividade antiproliferativa e citotóxica em outros experimentos, como o eufol e o euforbol. Embora o látex seja uma substância tóxica, ela pode ter tido, nas maiores diluições utilizadas, um efeito positivo para o tratamento do tipo hormesis.

Descritores: *Euphorbia*; hormese; melanoma; metástase neoplásica; camundongos; pulmão; neoplasias

ABSTRACT

Brunetti RL. *Evaluation of the in vitro and in vivo antineoplastic effects of Euphorbia tirucalli (aveloz) on murine melanoma B16/F10* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Melanoma is a malignant neoplasm derived from melanocytes, which has a high lethality due to its highly invasive and aggressive trait. The *E. tirucalli* stem produces a white latex used in folk medicine for the treatment of cancer, this product has several active constituents, including euphol, euphorbol and isoeuphoral. The objective of this work was to study the antineoplastic effects of *Euphorbia tirucalli* latex in experimental models *in vitro* and *in vivo*. B16/F10 melanoma cells were treated with the following serial dilutions of the latex from an initial concentration of 0.1037µg/µl: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/5096, 1/11192. Cell viability was assessed by MTT at 24, 48 and 72 hours. In the first *in vivo* experiment, melanoma cells were inoculated into the lumbar dorsal subcutaneous tissue of BALB/c mice and 10 days later they were treated or not treated with 0.467µg/25g of body weight in of 200µL of *E. tirucalli* latex by gavage for 14 days. In the second experiment, C57BL/ 6 mice were inoculated with B16/F10 melanoma cells into the tail vein for lung colonization. In the *in vitro* experiment, a decrease in cell viability at 1/1024 and 1/11192 dilutions was observed at 24h, and at 48h there was a decrease in cell viability at the dilutions of 1/128, 1/256, 1/2048 and 1/11192. In the *in vivo* experiment it was observed that the latex of *E. tirucalli* could reduce the volume of the subcutaneous tumors in 53.5% while in the untreated group the volume increased 818.1%. In the experiment of inoculation into the tail vein with B16/F10 melanoma cells, *E. tirucalli* latex administration was able to reduce the fraction of lung area occupied by the colonies to 10.5% whereas in the untreated group, the fraction of lung area with colonies was 35%. No histopathological changes were observed in any of the experimental groups in other organs. The effects of tumor reduction, reduction of lung colonies and cell viability may be due to the action of latex constituents that have already demonstrated antiproliferative and cytotoxic activity in other experiments, such as euphol and euphorbol. Although latex is a toxic substance, it may have

developed, at the low dilutions used, a positive effect for the treatment of the hormesis type

Descriptors: *Euphorbia*; hormesis; melanoma; neoplastic metastasis; mice; lung; neoplasms

1- INTRODUÇÃO

Entre os diversos tipos de neoplasias, o melanoma maligno destaca-se devido ao seu elevado índice metastático, sua alta agressividade, e sua baixa resposta a terapias (Silva et al., 2013). Contudo, buscam-se novas opções terapêuticas de baixo custo que possam ajudar no tratamento contra o melanoma. Os conhecimentos populares e a medicina fitoterápica podem ser importantes adjuvantes em pesquisas clínicas de grande alcance.

Embora a medicina moderna seja bastante desenvolvida, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2002) divulgou que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais para os cuidados básicos com a saúde, sendo que 85% destes o fazem por meio de plantas medicinais.

Euphorbia tirucalli, popularmente conhecida como aveloz é uma planta ornamental tropical e subtropical tradicionalmente utilizada na medicina popular para o tratamento de neoplasias (Valadares et al., 2006).

O látex da *E. tirucalli* é composto pelos constituintes ativos: resina, matéria cerífera, albumina, princípio amargo, caoutchouc (substância cáustica), eufol, euforbol, isoeuforal, euforona, taraxasterol, ácido cítrico, glicose, tirucalol, kamepferol, acetato de sapogenina, ácido málico e ácido succínio (César, 1956; Neiva, 1968; Dantas, 2007; Dutra et al., 2016).

Determinados constituintes ativos apresentam atividades biológicas comprovadas cientificamente. Entre elas incluímos atividades preventivas contra o câncer, antimutagênica, irritante, laxativa, antitumoral, antibacteriana, anticéptica, anti-inflamatória, antiestreptocócicas, antiparasitária, antiulceroso, antiasmática e anticancerígena (Costa, 2011).

O eufol é um álcool triterpênico tetracíclico isolado do látex da *E. tirucalli* e que tem demonstrado ação anticancerígena. Em Wang et al (2013), o eufol, inibiu o crescimento de células de câncer de mama humano T74D, também foram notados níveis reduzidos de expressão da ciclina A e B1, correspondendo à distribuição diminuída das células nas fases S e G2/M, respectivamente. Estes resultados indicaram que o eufol é um agente ativo em *E. tirucalli* que exerce atividade anticancerígena, silenciando o ciclo celular de células cancerosas.

Uma receita procedente da medicina popular foi utilizada por Caseiro et al (2006) em camundongos para estudar a atividade antitumoral do látex. A receita indicava uma gota de látex diluído em um copo de água (200mL) três vezes ao dia por uma semana. Na segunda semana passou para duas gotas, na terceira semana três gotas e na quarta semana quatro gotas, sempre preparados no momento de consumo. Um grupo de camundongos recebeu ainda a associação do látex diluído em um medicamento quimioterápico. As doses ajustadas foram de 125, 250 e 500mg/Kg para cada camundongo. Os resultados demonstraram uma diminuição da proliferação celular das células cancerígenas e ainda no grupo tratado com a associação do quimioterápico e látex de *E. tirucalli* houve uma diminuição dos efeitos colaterais induzidos pelo quimioterápico.

Valadares et al., 2006, verificaram que o extrato de *E. tirucalli* modulou a mielopoiese e reduziu o crescimento do tumor de Ehrlich na forma ascítica em camundongos.

O látex da *Euphorbia tirucalli* pode ter propriedades que reduzem o crescimento celular, como mostrado por Salla et al (2016). Segundo estes autores, as células escamosas da laringe (Hep-2) foram tratadas com látex da *E. tirucalli* durante 1, 3, 5 e 7 dias. Em comparação com as amostras de controle, o tratamento com látex de *E. tirucalli* não alterou a morfologia celular, entretanto o crescimento celular foi significativamente diminuído e reduziu a expressão do gene receptor de 1,4,5-trisfosfato de inositol, tipo 1 (ITPRI) e os genes regulados por fator de aceleração de decaimento (CD55) e Anexina 1 (ANXA 1). Esses genes tem um papel muito importante que é agir como um modulador endógeno da inflamação, inibindo a atividade de enzimas que agem na produção de mediadores pró-inflamatórios e interferindo no processo de transmigração dos leucócitos (Oliani et al., 2006). Estas propriedades antiproliferativas apresentam grande potencial para o tratamento da neoplasia.

As células de melanoma murino B16/F10 são as mais utilizadas para a pesquisa sobre tratamentos e testes de substâncias contra o melanoma, devido a sua alta habilidade de implantação no tecido pulmonar e formação de nódulos neoplásico quando inoculadas na veia da cauda de camundongos (Silva et al., 2013). Quando inoculados no tecido subcutâneo, geram tumores

que podem ser vistos com facilidade na pele, que são palpáveis e que podem ser medidos para avaliar sua evolução (Overwijk et al., 2001). As células tumorais podem ser cultivadas facilmente para a aplicação testes de substâncias tumorais (Nicolson et al., 1978).

Tendo em vista a toxicidade do látex da planta, procuramos definir uma dosagem que fosse a menos tóxica possível, mas que ainda assim pudesse ser eficaz para nossos objetivos. Em contato com a pele o látex é corrosivo podendo provocar, edema, lesões, queimaduras, coceira e até necrose dos tecidos. Caso ocorra contato com os olhos pode provocar inchaço, visão borrada e ardência. Quando ingerido, o látex pode ocasionar diarreias, vômitos, e hemorragia por irritação da mucosa gástrica (Tofanelli et al., 2011; Caseiro et al., 2006).

Contudo, Paz et al (2009) testaram a toxicidade do látex da *E. tirucalli* a qual foi considerada negativa para as dosagens de: 3, 6 e 9 gotas diluídas em 1 litro de solução salina administrado em camundongos. Além disso, houve significativa diminuição na quantidade de células tumorais viáveis no grupo de camundongos tratados na concentração de 9 gotas. Assim, para este experimento, selecionamos a maior concentração utilizada por este autor que não apresentou toxicidade, ou seja, 9 gotas por litro de solução salina.

Assim, escolhemos estes três modelos biológicos, a inoculação de células de melanoma murino B16/F10 na cauda de camundongo como modelo de simulação de metástase, a inoculação destas mesma células no tecido subcutâneo para avaliação do crescimento de tumores e a avaliação da viabilidade celular das células de melanoma em cultura para testar respectivamente, a capacidade do látex da *Euphorbia tirucalli* em reduzir os nódulos pulmonares, reduzir o tamanho tumoral subcutâneo e reduzir a viabilidade celular das células de melanoma em cultura.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Melanoma

A primeira definição do melanoma como uma entidade de doença foi apresentada em 1806 por René Laennec, inventor do estetoscópio, em sua apresentação à Faculdade de Medicina de Paris e o primeiro uso publicado da palavra melanoma surgiu em 1812 no manuscrito de Laennec, mas as referências a câncer preto e tumores negros fatais com metástase podem ser rastreados até os escritos do lendário médico Grego Hipócrates no século V a.C. (Bennet and Hall, 1994; Chin et al., 1998).

O melanoma maligno cutâneo é a forma mais letal de câncer de pele. Sua incidência tem aumentado constantemente em todo o mundo, resultando em um grande problema de saúde pública devido a sua característica altamente agressiva e invasiva, e também devido à sua alta resistência a radioterapia e quimioterapia convencional (Silva et al., 2013; Gheorgheouse et al., 2011; Markovic et al., 2007; Kwong et al., 2007).

O melanoma é uma neoplasia maligna derivada de melanócitos e pode ocorrer em qualquer tecido que contenham essas células, incluindo locais não cutâneos, como a nasofaringe, seios paranasais, árvore traqueobrônquica, mucosa oral, vagina, vulva, trato urinário, sistema nervoso central, e olho (Gheorgheouse et al., 2011; Cummins et al., 2006). Durante a embriogênese, células da crista neural migram para a pele e demais órgãos onde se diferenciam em melanócitos maduros, capazes de produzir o pigmento melanina, que funciona como um fator protetor do DNA contra efeitos deletérios causados pela radiação ultravioleta (UV) (Gray-Schopfer et al., 2007; Raposo; Marks, 2007; Houghton et al., 2002).

Há cerca de 2-3 milhões de casos de câncer de melanoma recém-diagnosticados em todo o mundo e a cada ano representa cerca de 132.000 casos destes OMS. As taxas de incidência de melanoma cutâneo aumentaram mais rapidamente do que as de qualquer outra doença maligna na população caucasiana nos últimos 30 anos. De 1976 a 2003, o Registro Central de Melanoma Maligno da Alemanha documentou um aumento de 3 vezes na

incidência de melanoma cutâneo, atingindo 10,3 e 13,3 melanomas recém-diagnosticados para homens e mulheres, respectivamente, por 100.000 pessoas por ano. Nos EUA as taxas de incidência são 17,2 (homens) e 12,1 (mulheres) por 100.000 habitantes, as taxas de incidência mais altas são observadas na Austrália com 38,5 (homens) e 29,5 (mulheres) por 100.000 pessoas embora o melanoma represente apenas 4% do câncer de pele, é responsável por 80% das mortes por câncer de pele. Hoje em dia, o diagnóstico do paciente e o tratamento do melanoma nos primeiros estágios de sua evolução são de importância crítica para a sobrevivência do mesmo. Ponderando que a ressecção cirúrgica é curativa na maioria dos pacientes com melanomas iniciais *in situ* e de fase de crescimento radial (e cerca de 80% dos melanomas podem ser tratados dessa maneira), apenas 14% dos pacientes com metástase regional sobrevivem por 5 anos, apesar de todos os esforços terapêuticos (Kwong et al., 2007).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), são importantes no desenvolvimento desse tipo de câncer a idade, a susceptibilidade individual e o sexo. A aparência de nevo melanocítico prévio estão associados a cerca de 20% a 30% dos melanomas. Pessoas com histórico familiar de melanoma possuem também aumento no risco de desenvolver esse câncer (INCA, 2016).

Sem deixar de lado os fatores genéticos, a radiação ultravioleta do sol, contribuem para o desenvolvimento do melanoma, sendo que aproximadamente 80% destes melanomas de pele estão associados a essa exposição, principalmente naquelas pessoas de pele sensível, ou seja, que se queimam com facilidade, pele com múltiplas sardas e pele clara. Indivíduos de pele escura possuem risco mínimo de exibir melanoma de pele. É considerado adequado o prognóstico desse câncer se os tumores forem diagnosticados e tratados de forma adequada, em sua fase inicial. Quando os melanomas são diagnosticados em fases mais avançadas, especialmente com a presença de colônias de melanoma, eles apresentam pior prognóstico (INCA, 2016).

Em relação ao melanoma, sua letalidade é elevada, mas sua incidência é baixa. Estavam previstos 5.670 novos casos de melanoma sendo 3.000 em homens e 2.670 em mulheres (INCA, 2016).

A apresentação clínica do melanoma varia de acordo com a localização anatômica e o tipo de crescimento tumoral, ou seja, o tipo histopatológico. São conhecidos quatro principais tipos histopatológicos de melanoma: melanoma de espalhamento superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma lentigo maligna (MLM) e melanoma lentiginoso acral (MLA) (Situm et al., 2014).

O MES é o tipo mais comum de melanoma, responsável por aproximadamente 70% dos casos. Está relacionado à exposição diária ao sol e é localizado mais frequentemente na parte de trás das pernas das mulheres e nas costas dos homens. O MN representa 5% de melanomas e ocorre com maior frequência no tronco e membros de pacientes entre os 50 e 60 anos de vida, e é mais comum nos homens do que nas mulheres. Os melanomas nodulares são frequentemente ulcerados e não tem uma fase de crescimento radial, tem apenas uma fase de crescimento vertical correlacionada com um crescimento mais acelerado e maior taxa de metástase. O MLM responde por 4% a 15% dos melanomas cutâneos e, diferente do MN e MES, correlaciona-se com a exposição prolongada ao sol e o aumento da idade. Este câncer pode evoluir por décadas antes de invadir a derme papilar. O MLA é um câncer de pele incomum, representando 5% dos melanomas em pessoas brancas, mas é o tipo mais comum de melanoma entre pacientes asiáticos, africanos e hispânicos. Normalmente afeta pacientes idosos predominantemente mulheres. MLA é principalmente localizado em pele glabras e pele adjacente de dígitos, palmas e solas. Em geral, envolve a camada da unha do dedão do pé ou polegar (Rastrelli et al., 2014).

O melanoma cutâneo é uma das neoplasias malignas que mais acomete colônias de melanoma nos pacientes, a taxa de sobrevida é de 8 meses. O pulmão é o órgão mais comumente atacado pela disseminação metastática do melanoma cutâneo (18-36%). O arsenal terapêutico disponível para o tratamento da doença em estágio avançado traz resultados insatisfatórios, logo, estudos *in vitro* e *in vivo* são de fundamentais importância para o melhor conhecimento do comportamento biológico dessa neoplasia e para o desenvolvimento diagnóstico e terapêutico (Silva et al., 2013; Conesa et al., 2008).

2.2- Metástase

Metástase é o processo de disseminação de células de uma neoplasia pelo organismo, a partir das células de um tumor primário que promove o desenvolvimento de tumores secundários (Chambers et al., 2002; Fidler, 2003; Riethdorf et al., 2008). O termo foi inicialmente utilizado pelo cirurgião francês Jean-Claude Recamier, em 1829, aplicando para designar uma lesão cerebral em uma paciente portadora de câncer de mama (Recamier, 1829).

Para que as colônias de melanoma se cresçam, as células metastáticas que invadem o tecido adjacente devem apresentar alterações morfológicas na adesão intercelular e na interação com a matriz extracelular (MEC). O destacamento das células do tumor original se deve, em grande parte, à baixa adesão entre elas (Li et al., 2002; Haass et al., 2004; Maret et al., 2010). Uma vez desprendidas da massa tumoral, o deslocamento das células pela matriz extracelular é possível graças à ação de enzimas proteolíticas liberadas pela própria célula tumoral ou pelas células estromais do tecido invadido (em resposta à estimulação tumoral) ou, ainda, por células inflamatórias (Fidler, 1978; Joyce; Pollard, 2009).

Após invadir o tecido adjacente, as células metastáticas alcançam os vasos sanguíneos, realizam o processo de intravasão e, uma vez dentro dos vasos, precisam sobreviver a vários fatores, tais como o ataque das células do sistema imunológico e o choque mecânico causado pelo atrito com o sangue circulante. Entretanto, a interação das células tumorais com as plaquetas circulantes pode aumentar as chances de sobrevivência dessas células. Esse agregado de plaquetas protege as células metastáticas, por exemplo, da lise mediada pelas células matadoras naturais (Joyce; Pollard, 2009). Após vencer os obstáculos encontrados nos vasos sanguíneos, as células metastáticas realizam a extravasão em um tecido secundário, onde devem se estabelecer, sobreviver e crescer.

Para que o estabelecimento da metástase seja possível, é necessário que as células do tumor encontrem um microambiente propício, ou seja, apresente condições que permitam que as células metastáticas possam aderir e proliferar (Chambers et al., 2002; Fidler, 2003; Joyce; Pollard, 2009). O

próprio tumor primário pode criar um ambiente pré-metastático adequado ao crescimento secundário por liberar fatores angiogênicos e àqueles que contribuem para a invasão, como as metaloproteases (Hiratsuka et al., 2002). Quando essa colônia sobrevive ao ataque das células do sistema imunológico e à circulação sanguínea encontrando o órgão-alvo, os fibroblastos podem produzir fatores angiogênicos que, por sua vez, podem auxiliar no surgimento do novo tumor (Duda et al., 2010).

As colônias de melanoma são a principal causa da morbidade e mortalidade associadas ao câncer. Sendo assim, a sua instalação antes da detecção do tumor primário torna o tratamento clínico para o tumor pouco eficaz, ao contrário, quando mais precocemente o tumor primário for detectado maiores as chances de um tratamento cirúrgico ou por radioterapia ser eficiente. (Fidler, 1978; Li et al., 2002; Chambers, et al., 2002; Laubli; Borsig, 2010; Chaffer).

2.3- *Euphorbia tirucalli*

A utilização de plantas como medicamentos é, provavelmente, tão antiga quanto a própria espécie humana. As plantas adquiriram extrema importância na medicina popular por suas propriedades terapêuticas (Martins et al., 1995).

O Brasil detém de 15% a 20% da biodiversidade mundial. As plantas componentes dessa biodiversidade são a base para a fabricação de fitoterápicos e de outros medicamentos. Com isso, o Brasil tem a oportunidade de desenvolvimento próprio e soberano na área da saúde e do uso de medicamentos naturais, que além da necessidade de zelar pela sustentabilidade dos componentes da biodiversidade (Brasil, 2006).

Euphorbia tirucalli (Figura 1), uma das 8.000 espécies dentro da família *Euphorbiaceae* é uma planta lactescente, ornamental e subtropical tradicionalmente utilizada na medicina popular para o tratamento da sífilis, asma, reumatismo, verrugas, epilepsia, impotência sexual, antiartrítico, anti-inflamatório e câncer (Mwine et al., 2011; Valadares et al., 2006).

Figura 1- Imagem *Euphorbia tirucalli*. *Euphorbia tirucalli* em ambiente natural (A e B), látex da *E. tirucalli* no caule (C), látex da *E. tirucalli* sendo coletado (D).

Fonte- Google imagens

Pode atingir de 2-6 m altura, seu tronco e ramos principais são lenhosos de cor parda como qualquer outra árvore, porém o restante da planta é incomum: ramos jovens são cilíndricos, verdes e as folhas muito pequenas e pouco visíveis porque caem logo que são produzidas. É nativa de Madagascar e largamente cultivada no Brasil se aclimatizando em regiões quentes, especialmente no Nordeste e Norte (Lorenzi & Matos, 2002).

A planta é utilizada também na formação de cerca-vivas, para separar propriedades, lavouras, para afastar cobras e impedir o crescimento de ervas daninhas (Varrichio et al., 2008; Waczuk et al., 2012).

A *E. tirucalli* conhecida popularmente como aveloz, almeidinha, pau-pelado, espinho de judeu, gaiolinha, cassoneira, árvore de lápis, mata-verrugas, dedo-do-diabo, espinho-italiano, coral verde, espinho de cristo, cego-olho, árvore de são sebastião e dente de cão (Waczuk et al., 2012).

O caule da *E. tirucalli* produz um látex, acre de coloração branca, e extremamente perigoso e tóxico (Tofanelli et al., 2011). O látex em contato com a pele é corrosivo podendo gerar coceira, queimaduras, lesões, edema e até necrose dos tecidos. Ao contato com os olhos provoca ardência, visão borrada, inchaço e quadros de cegueira temporária. (Caseiro et al., 2006; Tofanelli et al., 2011).

Mesmo sendo tóxico o látex da *E. tirucalli* tem atividades, anticancerígena, antimutagênica, antitumoral, irritante, laxativa, antibacteriana, anticéptica, anti-inflamatória, antiestreptocócicas, analgésica, antiparasitária, antiulceroso, antiasmática, expectorante e antiartrítico (Dutra et al., 2016; Mwine et al., 2011; Valadares et al., 2006).

A fração biopolimérica (BET) da *Euphorbia tirucalli* foi avaliada na atividade antiartrítica em camundongos submetidos ao modelo de indução por *Mycobacterium tuberculli*, e revelou ser um componente importante na inibição da artrite. Acarretando a supressão das células T (CD4 e CD8), inibição de gama interferon (IFN-gama) e da interleucina-2 intracelular (IL-2) (Bani et al., 2006).

Em Andrade (2007), a dose de 400mg/kg do extrato aquoso do látex da *E. tirucalli* foi capaz de inibir a formação de focos de cripta aberrante nos segmentos médio e proximal de cólon em ratos induzidos com azoximetano.

O látex da *E. tirucalli* possui diversos constituintes ativos, mas a substância com maior interesse terapêutico é o eufol. O eufol é um triterpeno isolado do látex da *E. tirucalli* (Tofanelli et al., 2011)

O eufol inibiu o crescimento de células de câncer gástrico humano pelo meio da modulação da apoptose mediada por quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) e da ciclina D1 (Lin et al., 2012).

3- OBJETIVO

Estudar os efeitos antineoplásicos *in vitro* e *in vivo* do látex da *Euphorbia tirucalli* nas células de melanoma murino B16/F10.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Coleta do látex da *E. tirucalli*

Todo o látex da *E. tirucalli* necessário para o experimento foi coletado diretamente dos caules da *E. tirucalli*, devidamente plantada no jardim da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da – Universidade de São Paulo, Brasil. Para o desenvolvimento deste trabalho, os caules da *E. tirucalli* foram destacados dos troncos e deste caule foram colhidas gotas do látex da *E. tirucalli* em um béquer de vidro esterilizado.

4.2- Diluição do látex da *E. tirucalli* e armazenamento

A diluição do látex da *E. tirucalli* em solução salina foi realizada de acordo com o uso popular, indicado pelo Prof. Gokithi Akisue, da Universidade de São Francisco, colaborador deste trabalho. O látex da *E. tirucalli* foi diluído na proporção de 9 gotas (0,0934g) para 1 litro de solução salina, sendo que foi administrada diariamente a cada camundongo quantidade de 0,467µg (para um animal com 25 gramas) a 0,01868µg/g ou 18,68µg/kg de peso vivo. Para fins de administração por gavagem, esta quantidade do produto foi diluída em 200µL de solução salina.

Logo após o procedimento de preparo da diluição, a solução com o látex diluído da *E. tirucalli* e a solução salina que foi utilizada para controle foram devidamente armazenadas em tubos Falcon, com o conteúdo necessário para a utilização em cada um dos dias experimentais. Os tubos Falcon, com as devidas soluções, foram então armazenados em geladeira (4-8°C), sendo retirados apenas no dia que foram utilizados, com a intenção de manter a integridade dos constituintes ativos da solução com o látex diluído da *E. tirucalli*.

4.3- Cultivo das células B16/F10

No Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada da FMVZ-USP dispomos de células de melanoma murino B16/F10. Estas células encontram-se congeladas em freezer -80°C , e foram descongeladas e cultivadas. Para o descongelamento das células, foi preparado previamente o meio de cultura, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina (50 IU/mL), estreptomicina (50 mg/mL), e l-glutamina (2 mmol/L). Uma vez preparado o meio de cultura, foi passado 8mL para um tubo cônico de 15mL e reservado. O criotubo contendo o melanoma B16/F10 foi rapidamente descongelado. As células tumorais foram pipetadas e transferidas para o tubo de 15mL contendo o meio. Logo em seguida, o tubo foi centrifugado a 1500rpm por 5 minutos. Enquanto isso, foi separado uma garrafa T25 e colocado 4mL do meio de cultura. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, ficando apenas as células sedimentadas. O *pellet* foi homogeneizado e ressuspendido com 1mL do meio de cultura. Esta suspensão celular foi transferida para a garrafa T25, totalizando 5mL de meio de cultura junto com as células de melanoma murino B16/F10. A garrafa foi observada ao microscópio, onde a maioria das células estavam viáveis, com boa aparência. A garrafa T25 foi levada a estufa umidificada e com composição atmosférica (37°C , 5% CO_2 , 95% do ar) em condições controladas de temperatura.

Quando a garrafa de cultura apresentava uma confluência alta, era realizada a tripsinização das células. A tripsinização foi realizada da seguinte forma: o meio de cultura foi retirado da garrafa T25 em que as células já estavam aderidas e foi colocado em um tubo de 15mL. A garrafa T25 foi lavada com 3mL de PBS-EDTA para que fosse removido os restos de soro fetal bovino, pois este inibe a ação da tripsina, sendo descartado logo em seguida. Então, foi passado para a garrafa T25 1mL de tripsina-EDTA 0,05% e levado à estufa a 37°C por 5 minutos para que houvesse o desprendimento das células da garrafa. Após esse tempo, foi observado no microscópio que praticamente todas as células estavam desprendidas. Foram colocados 2mL do meio de cultura antigo na garrafa T25 com as células desprendidas para inativar a

tripsina. Logo em seguida, todo o conteúdo foi passado da garrafa T25 para o tubo de 15mL contendo o meio de cultura antigo. Este tubo foi centrifugado 15000rpm por 5 minutos. Passado este tempo, houve a sedimentação das células no fundo do tubo, sendo que o sobrenadante foi desprezado. Após o sedimento celular ser homogeneizado, foi pipetado 20µl deste para uma garrafa T25 separada contendo 10mL de meio de cultura (DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina (50 IU/mL), estreptomicina (50 mg/mL), e l-glutamina (2 mmol/L)). O restante das células foi congelado com meio completo e 10% de DMSO. A garrafa T25 contendo 10mL de meio de cultura e células neoplásicas de melanoma murino B16/F10 foram mantidas em estufa umidificada e com composição atmosférica (37°C, 5% CO₂, 95% do ar) em condições controladas de temperatura.

Utilizamos o método de exclusão vital com a coloração por Azul de Tripán para contar e verificar o índice de células viáveis, sendo que foram apenas utilizados cultivos que apresentaram viabilidade maior que 95%.

4.4- Experimento *in vitro*

4.4.1- Análise de viabilidade celular: Ensaio do MTT

No dia do experimento células de melanoma murino B16/F10 foram plaqueadas em 3 placas de 96 poços de fundo chato estéril na concentração de 3×10^3 células/poço (150µL/poço). As diluições do látex da *Euphorbia tirucalli* para o experimento foi realizada a partir de uma solução 1x que usou 1 gota do látex (10,37mg) em 100mL de meio DMEM, na concentração de 0,1037mg/mL ou 0,1037µg/µL. A seguir foram acrescentados 100uL desta solução em cada um dos poços contendo as células, para um volume final de 250uL por poço. A quantidade do látex no volume de 100uL da solução-mãe correspondia, portanto, a 10,37ug.

Após 24h, 48h e 72h, foram realizados o tratamento com o látex da *E. tirucalli* nas diluições de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/5096, 1/11192. A tabela 1 mostra a quantidade de látex em cada diluição utilizada:

Tabela 1- Quantidade de látex corresponde a cada diluição presente em cada poço da placa de 250uL

Diluição	Quantidade de látex (µg) por poço de 250µL	Concentração (ng/µL) em um poço de 250µL
1/2	5,185	82,96
1/4	2,5925	41,48
1/8	1,2962	20,74
1/16	0,6481	10,37
1/32	0,3240	5,185
1/64	0,1620	2,5925
1/128	0,0810	1,29625
1/256	0,0405	0,648125
1/512	0,0202	0,324063
1/1024	0,0101	0,162031
1/2048	0,0051	0,081016
1/5096	0,0025	0,040508
1/11192	0,0013	0,020254

Ao fim de cada tempo foi adicionado 10µL de sal tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Amresco, EUA) em cada poço das placas para a metabolização pelas células viáveis e incubado por 3 horas em estufa umidificada e com composição atmosférica (37°C, 5% CO₂, 95% do ar) em condições controladas de temperatura.

Decorrido este tempo as placas foram centrifugadas 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Os cristais de formazam foram dissolvidos com 100µL de DMSO/poço. A leitura foi feita em leitor de ELISA em 570nm. Os experimentos foram realizados em sextuplicatas.

4.5- Experimento *in vivo*

4.5.1- Animais

Foram utilizados neste experimento camundongos da linhagem BALB/c machos com seis semanas de idade, pesando de 25 a 35g. Oriundos do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo em condições ambientais: ciclo de 12h claro/12h escuro, temperatura $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR 45-65°C. Durante o período de experimentação, os animais permaneceram no referido Biotério, recebendo água e ração balanceada “ad libitum”. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Animais (CEUA) da FMVZ-USP (processo número 3410250216) e da (CEUA) FMUSP (processo número 043/16).

4.5.2- Inoculação de células de melanoma B16/F10 no subcutâneo dorsal lombar de camundongos

Suspensão celular contendo células de melanoma murino B16/F10 foi inoculada no primeiro dia (100µL contendo 5×10^5 células/animal) por via subcutânea dorsal lombar de camundongos da linhagem BALB/c machos (n= 16 animais), com seis semanas de idade. Os camundongos foram divididos em dois grupos de 8 animais cada: a) um grupo tratado com látex após 10 dias da inoculação com as células, o grupo melanoma tratado (MT) e b) um grupo que não foi tratado com látex e que constituiu o grupo melanoma (M) com 8 animais. O grupo (MT), 10 dias após a inoculação celular, recebeu por via oral (gavagem), dose diária do látex da *Euphorbia tirucalli* (0,467µg/25 g em volume de 200uL), durante 14 dias. No dia em que houve o início do tratamento com o látex, os tumores foram medidos com paquímetro, conjunto de medidas melanoma tratado inicial (MTI). Após os 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e os tumores foram medidos novamente nos mesmos animais constituindo o conjunto de medidas melanoma tratado final (MTF). Nos animais não tratados com látex M, também se respeitou um intervalo de 14 dias entre a medida inicial do tumor, realizada dez dias após a inoculação das

células conjunto de medidas (MI) e a medida final (MF). Estes animais receberam diariamente 200µL de solução salina após o décimo dia da inoculação.

Evidências de deterioração da saúde, alteração de sinais clínicos e peso também foram avaliados, acompanhados pela Profa. Maria Lúcia Zaidan Dagli, Departamento de Patologia (VPT), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP (FMVZ-USP). Para o cálculo do volume tumoral, em milímetros cúbicos (mm³) foi utilizada a seguinte fórmula (Teicher, 2002).

$$\text{volume tumoral} = a \times b^2/2$$

sendo:

a = comprimento maior (mm)

b = comprimento menor (mm)

4.5.3- Inoculação de células de melanoma B16/F10 para desenvolvimento de colônias pulmonares em camundongos

Suspensão celular contendo células de melanoma murino B16/F10 foi inoculada no primeiro dia (100µL contendo 5x10⁵ células/animal) na veia da cauda de camundongos linhagem C57BL/6 machos (n= 14 animais), de seis semanas de idade. Os animais foram tratados por via oral (gavagem), dose diária com o látex da *Euphorbia tirucalli* (0,467µg/25 g em volume de 200µL) ou solução salina, durante 14 dias, iniciando uma semana após a inoculação.

4.5.4- Quantificação das colônias pulmonares

A proporção de área ocupada pelas colônias pulmonares tanto do grupo melanoma como no grupo melanoma tratado foi calculada pelo método de contagem de pontos (Aherne and Dunnill 1982; Weibel 1989). As lâminas histológicas dos pulmões de cada animal (4 animais do grupo melanoma e 7 animais do grupo melanoma tratado) foram fotografadas com o microscópio Olympus BX 60, utilizando-se o sistema de captura de imagem composto pela câmera Axiocam e o programa Zen, ambos da Zeiss Inc. no Laboratório de

Anatomia Macroscópica e Imuno-Histoquímica (FMVZ-USP). A seguir as imagens, abrangendo toda a área do corte histológico foram sobrepostas por uma grade de pontos onde todos os pontos que cobriam a imagem foram contados, destacando-se a seguir os pontos que cobriam apenas as colônias pulmonares. O processo foi repetido 5 vezes para cada imagem girando-se a grade. A porcentagem de pontos que coincidiam com as colônias foi calculada em relação ao número total de pontos que coincidia com o tecido pulmonar, correspondendo, portanto à proporção de área ocupada pelos nódulos em relação ao tecido pulmonar total.

4.5.5- Eutanásia e necropsia dos camundongos, fixação de tecidos e preparação de lâminas

Após 14 dias de tratamento diário, os animais foram eutanasiados com a associação de dois fármacos ketamina-xilazina por via intraperitoneal com sobredose (100mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xilazina) depois foram necropsiados. Em seguida, amostras representativas dos corações, pulmões, fígado, rins, baço e do tumor foram, fixados, incluídos em parafina e cortes histológicos foram preparados conforme descrito abaixo:

Fragmentos representativos dos órgãos citados foram fixado em formol tamponado 10% (formaldeído comercial 100mL e água destilada 900mL), por pelo menos 48 horas. Após o tempo de fixação o tecido foi lavado em água corrente de torneira por uma hora no mínimo para retirar o excesso do fixador. Depois de lavado colocou-se álcool 70% para conservação do tecido.

Em seguida, o material passou por uma bateria de desidratação:

Álcool 70% (1 banho), álcool 80% (1 banho), álcool 90% (1 banho), álcool 95% (1 banho), álcool absoluto (4 banhos), xilol (2 banhos) e parafina (2 banhos). Os banhos são de uma 1 hora cada. Após essa bateria montou-se blocos em parafina e foram feitos os cortes em micrótomo na espessura de 5 µm.

Depois de todo esse processo os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e montados com lamínula para observação ao microscópio.

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar a viabilidade celular nos cultivos celulares tratados ou não com o látex da *E. tirucalli*, foi utilizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis. Comparações subsequentes foram realizadas pelo teste de Dunnet. Para avaliar o volume dos tumores subcutâneos, os pares de dados MI/MF e MTI/MTF foram comparados pelo teste estatístico de Wilcoxon de dados pareados usando-se o programa estatístico Graphpad Instat versão 3.10.

Para avaliar a proporção de área ocupada pelas colônias pulmonares, o teste estatístico U de Mann-Whitney para dados não paramétricos foi aplicado, os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão das médias.

Tanto os testes estatísticos quanto a montagem dos gráficos e tabelas foram realizados com o software Prism 6 (GraphPad – La Jolla, EUA) e o Graphpad Instat versão 3.10. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes.

6- RESULTADOS

6.1- Análise de viabilidade celular: tratamento com o látex da *E. tirucalli* sobre células de melanoma murino B16/F10

As células de melanoma murino B16/F10, foram tratadas com diferentes diluições seriadas do látex da *E. tirucalli* 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/5096, 1/11192 utilizando o ensaio do MTT.

Na análise de viabilidade celular pelo teste do MTT, no tempo de 24h houve diminuição da viabilidade celular nas diluições seriadas de 1/1024 e 1/11192 ($p < 0,05$) (Gráfico 1), enquanto que nas diluições seriadas de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/2048, 1/5096 não houve diminuição da viabilidade celular.

No tempo de 48h houve diminuição da viabilidade celular nas diluições seriadas de 1/128, 1/256, 1/2048, 1/11192 ($p < 0,0001$) (Gráfico 2), enquanto que nas diluições seriadas de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/512, 1/5096 não houve diminuição da viabilidade celular.

No tempo de 72h não houve diminuição significativa da viabilidade celular em nenhuma das diluições seriadas utilizadas (Gráfico 3).

Gráfico 1- Análise da viabilidade celular pelo método do MTT após 24h de tratamento com diferentes diluições do látex da *E. tirucalli*. Diminuição da viabilidade celular nas diluições seriadas 1/1024 e 1/11192. A coluna 0 representa somente células de melanoma. Teste estatístico utilizado Kruskal-Wallis. N=6 repetições, *p<0,05, **p<0,01

Gráfico 2- Análise da viabilidade celular pelo método do MTT após 48h de tratamento com diferentes diluições do látex da *E. tirucalli*. Diminuição da viabilidade celular nas diluições seriadas 1/128, 1/256, 1/2048 e 1/11192. A coluna 0 representa somente células de melanoma. Teste estatístico utilizado Kruskal-Wallis. N=6 repetições, * $p<0,05$, ** $p<0,01$

Gráfico 3- Análise da viabilidade celular pelo método do MTT após 72h de tratamento com diferentes diluições do látex da *E. tirucalli*. Não houve diminuição significativa da viabilidade celular em nenhuma das diluições seriadas. A coluna 0 representa somente células de melanoma. Teste estatístico utilizado Kruskal-Wallis. N=6 repetições

6.2- Avaliação do tratamento com o látex da *E. tirucalli* sobre o volume tumoral *in vivo*

Nos animais inoculados com células de melanoma no subcutâneo dorsal lombar, a administração do látex da *E. tirucalli* na quantidade 0,467µg/25g de camundongo, no grupo melanoma tratado foi capaz de reduzir em 53,5% o volume dos tumores subcutâneos em 14 dias de tratamento, enquanto que no grupo melanoma que não foi tratado houve um aumento de 818,1% no volume dos tumores subcutâneos durante 14 dias (Tabela 2).

Na (Figura 2) observa-se a redução dos volumes dos tumores subcutâneos do grupo melanoma tratado em relação ao grupo melanoma.

As massas tumorais foram medidas com um paquímetro no dia em que se iniciou o tratamento com látex da *E. tirucalli* e ao final dos 14 de tratamento. O volume da massa tumoral foi então calculado nestas duas etapas usando-se a fórmula indicada no item 4.5.2 do capítulo de materiais e métodos.

Tabela 2- Média e desvio padrão do volume inicial e final dos tumores subcutâneos de camundongos inoculados com células de melanoma B16/F10. Os valores correspondem a mm³. MI – grupo melanoma, volume inicial, MF – grupo melanoma volume final, MTI – grupo melanoma tratado, volume inicial, MTF – grupo melanoma tratado, volume final

Grupos	Média	DP	n	Grupos	Média	DP	n
MI	30,3 ^a	±18,4	7	MTI	687,4 ^a	±682	6
MF	247,9 ^b	±131	7	MTF	319,5 ^b	±313,7	6
Aumento	818,1%			Redução	53,5%		
p	0,0156			p	0,0313		

As médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes aplicando-se o teste estatístico de Wilcoxon de dados pareados usando-se o programa estatístico Graphpad Instat versão 3.10.

Figura 2- Camundongos eutanasiados após 14 dias de tratamento com o látex da *E. tirucalli*. (A) camundongo do grupo melanoma que recebeu a dose 200 μ L de solução salina, a seta indica um aumento do volume dos tumores subcutâneos. (B) camundongo melanoma tratado que recebeu a dose 200 μ L (0,467 μ g) da *E. tirucalli*, a seta indica uma redução no volume dos tumores subcutâneos em relação ao grupo melanoma

6.3- Avaliação do tratamento com o látex da *E. tirucalli* sobre o desenvolvimento de colônias de melanoma *in vivo*

Nos animais inoculados com células de melanoma na veia da cauda para o desenvolvimento de colônias pulmonares, a administração do látex da *E. tirucalli* na quantidade 0,467 μ g/25g de camundongo, do grupo melanoma tratado foi capaz de reduzir a fração pulmonar ocupada pelas colônias em 10,5% em 14 dias de tratamento, enquanto que no grupo melanoma que não foi tratado houve um aumento de 35% nas colônias de melanoma durante 14 dias (Tabela 5).

Os animais do grupo melanoma quanto do grupo melanoma tratado foram acompanhados durante os 14 dias tratamento (Tabela 3) e (Tabela 4).

Tabela 3- Delineamento do desenvolvimento de colônias de melanoma experimentais *in vivo* no grupo melanoma

Dias	Eventos
1º dia	Inoculação das células de melanoma na veia da cauda
8º dia	1 camundongo do grupo melanoma foi eutanasiado para observação de colônias de melanoma
18º dia	1 Camundongo grupo melanoma morreu
20º dia	Camundongo grupo com perda de peso foi eutanasiado e necropsiado
22º dia	Camundongo grupo melanoma prostado e perda de peso foi eutanasiado e necropsiado
23º dia	2 camundongos grupo melanoma morreram
24º dia	Camundongo grupo com perda de peso foi eutanasiado e necropsiado
26º dia	Camundongo grupo melanoma com perda de peso foi eutanasiado e necropsiado

Tabela 4- Delineamento no desenvolvimento de colônias de melanoma experimentais *in vivo* no grupo melanoma tratado

Dias	Eventos
1º dia	Inoculação das células de melanoma na veia da cauda
8º dia	1 camundongo do grupo melanoma tratado foi eutanasiado para observação de colônias de melanoma
9º dia	Sem Alterações
12º dia	Início do tratamento com o látex da <i>Euphorbia tirucalli</i>
27º dia	Eutanásia e necropsia dos animais do grupo melanoma tratado

Na análise macroscópica os pulmões dos camundongos do grupo melanoma apresentaram colônias de melanoma B16, assim como os camundongos do grupo melanoma tratado, embora as colônias neste último grupo fossem menores e em menor quantidade à inspeção visual (Figura 3).

Figura 3- Pulmões de camundongos C57BL/6. (A) pulmão grupo melanoma, observar colônias de melanoma B16. (B) pulmão grupo melanoma tratado, observar colônias melanoma, mas menores e em menor quantidade. Barra 10mm

6.4- Quantificação das colônias de melanoma nos pulmões

Aplicação da análise morfométrica revelou que o látex da *Euphorbia tirucalli* foi capaz de reduzir em 10,5% a proporção de área ocupada pelas colônias de melanoma pulmonares no grupo MT, enquanto que no grupo M aumentaram em 35% a proporção de área ocupada pelas colônias de melanoma pulmonares (Tabela 5).

Tabela 5- Média e desvio padrão da proporção de área das colônias de melanoma nos pulmões. M-melanoma e MT-melanoma tratado, DP-desvio padrão e N-número de animais

Grupos	Média	DP	n
M	35%	18	7
MT	10,5%	7,8	4
N	4	7	
p	0,024		

As médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes aplicando-se o teste estatístico U de Mann-Wthiney para dados não paramétricos.

6.5- Análise histopatológica

6.5.1- Experimento 1: inoculação subcutânea de célula de melanoma murino B16/F10

Após 14 dias de tratamento com o látex da *E. tirucalli*, os animais que foram inoculados no subcutâneo com células de melanoma murino B16/F10 foram eutanasiados e seus órgãos foram colhidos para a análise histopatológica.

Na análise microscópica dos cortes histológicos de tumor do grupo melanoma foi observada necrose (Figura 4), no grupo melanoma tratado houve ausência de necrose (Figura 5). Na análise microscópica dos cortes histológicos de baço, pulmão, rim e fígado tanto no grupo melanoma quanto no grupo melanoma tratado foi observada ausência de alterações histopatológicas.

6.5.2- Experimento 2: inoculação na veia da cauda de célula de melanoma murino B16/F10

Após 14 dias de tratamento com o látex da *E. tirucalli*, os animais que foram inoculados na veia da cauda com células de melanoma murino B16/F10 foram eutanasiados e seus órgãos foram colhidos para a análise histopatológica.

Na análise microscópica dos cortes histológicos de pulmão do grupo melanoma foi observada a presença de colônias de melanoma no parênquima pulmonar (Figura 6). Na análise microscópica dos cortes histológicos de pulmão no grupo melanoma tratado foi observado alvéolos pulmonares preservados e colônias de melanoma de tamanho reduzido (Figura 7). Em cortes histológicos de baço, fígado, rim e coração tanto no grupo melanoma quanto no grupo melanoma tratado não foram observadas alterações histopatológicas.

Figura 4- Fotomicrografia de corte histológico de tumor B16/F10 após 10 dias da inoculação no subcutâneo dorsal lombar de camundongo BALB/c. Observar tumor e extensa área de necrose (setas). Grupo melanoma. H&E

Figura 5- Fotomicrografia de corte histológico de tumor B16/F10 após 10 dias da inoculação no subcutâneo dorsal lombar de camundongo BALB/c. O animal recebeu (0,467μg em 200μL) de *Euphorbia tirucalli* em solução salina. Observar tumor e ausência de necrose. H&E

Figura 6- Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongo C57BL/6 inoculado na veia da cauda com melanoma B16/F10. Observar presença de colônias de melanoma no parênquima pulmonar (setas). Grupo melanoma. H&E

Figura 7- Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongo C57BL/6 inoculado na veia da cauda com melanoma B16/F10. O animal recebeu (0,467μg em 200μL) de *Euphorbia tirucalli* em solução salina. Observar alvéolos pulmonares preservados (setas vermelhas) e colônias de melanoma de tamanho reduzido (setas pretas). H&E

7- DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antineoplásicos do látex da *Euphorbia tirucalli in vitro*, nas células de melanoma murino B16/F10 verificando-se a viabilidade celular pelo sal MTT, e em experimentos *in vivo* por inoculação destas células no tecido subcutâneo dorsal lombar de camundongos BALB/c, além da realização de experimentos de colonização pulmonar também por inoculação das células de melanoma murino B16/F10 na veia da cauda de camundongos C57BL/6.

A *E. tirucalli* é uma espécie vegetal originária de Madagascar, África, região tropical e semiárida, região essa tipicamente de temperaturas elevadas. A mesma é cultivada na região Norte e Nordeste do Brasil, regiões de clima semelhante ao nativo da referida planta. Como a coleta do látex foi realizada em muda da *E. tirucalli* cultivada nos jardins da FMVZ-USP, localizada na região Sudeste do Brasil. Essa coleta das gotas de látex foi realizada no verão, visando manter as características o mais próximo possível de sua área ambiental nativa.

Foram utilizados camundongos C57BL/6, inoculados com células de melanoma B16/F10 experimental que formam um modelo de colônia de melanomas, pois as células entram no sistema venoso e se proliferam principalmente nos pulmões (Welch et al., 1997; Fukumasu et., 2008).

Nos resultados dos animais inoculados com as células de melanoma B16/F10 na veia da cauda, para experimento de colonização verificamos que a administração de látex da *E. tirucalli* na quantidade de 0,467µg/25g de camundongo em um volume de 200uL foi capaz de reduzir a fração de área pulmonar ocupada pelas colônias em 10,5% em 14 dias de tratamento, ao passo que no grupo melanoma que não foi tratado, após 14 dias as colônias de melanoma aumentaram em 35%.

A diminuição da viabilidade celular verificada com o uso do MTT após o tratamento com o látex da *E. tirucalli* foi mais evidente nas menores concentrações, o que pode indicar um efeito favorável quando se busca um tratamento que tenha efeito antineoplásico. Uma possível explicação deste resultado pode residir no efeito hormesis, o qual preconiza que a mesma

substância que possui uma determinada ação em altas concentrações atua de forma inversa em altas diluições (Calabrese, 2008). O conceito do efeito hormesis e sua possível importância para a interpretação dos resultados verificados em nossos experimentos será discutido a seguir.

Este resultado, *in vitro* é coerente com outros relatos sobre a ação do látex de *E. tirucalli* encontrados na literatura, sabe-se que o látex funciona no combate às colônias de células do câncer de melanoma, gástrico e mama (Amirghofran et al., 2006, Kuo et al., 2006; Lin et al., 2012).

Varrichio (2005), usou o látex da *E. tirucalli* diluído na linhagem de melanoma murino B16/F10 e concluiu que o látex teve efeitos modulador e citotóxico. A literatura acima e os dados que obtivemos em nosso experimento sugerem que o látex da *E. tirucalli* pode ter efeitos antineoplásicos em células de melanoma murino B16/F10.

Em relação à quantidade de látex utilizada, fundamentamo-nos na literatura existente, embora muito escassa. Elegemos a quantidade correspondente a 9 gotas do látex da *E. tirucalli*, por litro porque o látex é tóxico e alguns relatos na literatura indicam o uso de 2, 6 ou 18 gotas (Dantas, 2007; Neiva, 1968) então utilizamos essa quantidade mais baixa para que os animais não morressem ou passassem pelo processo de toxicidade. Além disso em experimento anterior Paz et al (2009) testaram a toxicidade do látex da *E. tirucalli*, a qual foi considerada negativa para as dosagens de 3, 6 e 9 gotas diluídas em litro de solução salina administrando 5uL diluídos em 200uL para camundongos de 25g. Assim, para este experimento, selecionamos a maior concentração utilizada por este autor que não apresentou toxicidade, ou seja, 9 gotas por litro de solução salina, que corresponde, assim como no trabalho mencionado, à quantidade de 0,467ug para um camundongo de 25g, quantidade esta, após as devidas diluições, presente em uma dose de 200uL de solução salina.

Nos resultados dos animais inoculados com as células de melanoma B16/F10 no tecido subcutâneo, a administração de látex da *E. tirucalli* na quantidade de 0,467µg/25g de camundongo foi capaz de reduzir em 53,5% o volume dos tumores subcutâneos em 14 dias de tratamento, ao passo que no grupo melanoma que não foi tratado, após 14 dias o volume dos tumores

subcutâneos aumentou 818,1%. Este efeito pode ser atribuído à ação dos constituintes ativos do látex e pode estar relacionado ao processo de inflamação da pele possivelmente acompanhado da redução da proliferação celular, e o aumento da morte celular ou todos estes efeitos combinados, tendo em vista que estes efeitos são atribuídos a vários destes componentes presentes no látex.

O eufol (álcool triterpênico tetracíclico isolado do látex da *E. tirucalli*) foi investigado na inflamação de pele induzida por 12-Otetradecanoilphorbol-13-acetato (TPA) em ratos, e constatou-se redução da expressão de uma quimiocina derivada de queratinócitos (CXCL1/KC) e proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP)-2, desencadeando uma série de reações, as quais levaram a inibição acentuada da resposta inflamatória induzida por (TPA) (Passos et al., 2013).

Nas diluições usadas pode ser que o efeito hormético, traduza em um benefício para o controle do tumor. Devemos considerar que a maior parte dos medicamentos quimioterápicos também tem efeito cancerígeno.

Voltando ao conceito de hormese, este preconiza que substâncias que possuem atividade farmacológica e toxicológica podem ter uma ação bifásica para doses diferentes. Segundo este conceito, uma substância que tem um efeito nocivo em uma determinada dose, pode ter uma ação positiva para os objetivos do tratamento em uma dose mais baixa. Os agentes horméticos conhecidos são: pró-oxidantes, metais pesados, calor, radiação exercício, restrição alimentar (Marques et al., 2009; López-Diazguerrero et al., 2013) e diferentes tipos de stress (Le Bourg et al., 2009). Outro exemplo de hormese é a adaptação ao etanol por mais de 1.000 anos em certas populações, na qual o consumo de álcool foi associado a uma redução no risco de doença cardíaca coronário e outros benefícios a saúde (Saremi et al., 2008). Na opinião deste autor, a hormese como princípio geral é concebível apenas para os fatores que estão presentes no ambiente, revelando uma adaptação forçada do metabolismo dos animais expostos a determinada substância. Não há motivos para esperar resposta de uma dose hormética para fatores ausentes no ambiente natural. Explicações discutidas para efeitos horméticos, por exemplo, a superestimulação da homeostase assumindo um excesso de mecanismos de

reparação em resposta a danos leves (Wiegant et al., 2012) ou a proposta de existência de dois tipos de receptores: pequenas quantidades de alta afinidade e grandes quantidades de baixa afinidade (Hayes et al., 2008; Calabrese et al., 2008) parecem não estar suficientemente comprovados.

A hormese foi generalizada e usada, mais ou menos diretamente, como um suporte teórico para a homeopatia (Calabrese et al., 2013; Moffett et al., 2010). Contudo, vários autores que trabalham cientificamente o conceito de hormese afirmam que não deve ser relacionada à homeopatia sem fundamentação científica (Moffett et al., 2010).

Segundo Edward Calabrese "existem dados suficientes para concluir que a dose hormética é comum, reprodutível, e de uma expectativa biológica na vasta maioria dos sistemas biológicos, pontos finais medidos, e classes químicas testadas." (Calabrese et al., 2013). Uma das críticas ao conceito de hormese, que julgamos importante também para os nossos resultados foi a realizada por Pickrell et al (2005), segundo os quais, "a hormese simplesmente define uma resposta, mas a maioria das toxicoses tem muitas respostas" (Pickrell et al., 2005). Não pode ser descartado o efeito cumulativo ou sinérgico com outros fatores prejudiciais ou condições nos quais as células são lesadas previamente. Em condições em que uma célula, tecido ou órgão está próximo a um desequilíbrio metabólico, mesmo um dano mínimo pode ser fatal. Em tais circunstâncias, o conceito de hormese deve ser usado com cautela no raciocínio clínico (Jargin et al., 2009)

Podemos concluir dizendo que pelo acima exposto, nossa hipótese é que o conceito de hormese contribui para explicar, pelo menos parcialmente os resultados do nosso trabalho, visto que provavelmente o látex exerceu uma ação levemente estressante por ser uma substância sabidamente tóxica em concentrações mais altas, que causou efeitos diferentes em células saudáveis, possivelmente benéficos e em células tumorais, possivelmente retardando seu metabolismo e facilitando a ação, nos modelos *in vivo*, das próprias defesas naturais do organismo.

Como mencionado anteriormente, o fato de o látex ter atuado nas células em cultura em baixas concentrações pode ser atribuído à hormesis, mas sem desconsiderar a ação conjunta de outros fatores, como a policlonia

característica de uma cultura de células de melanoma B16, ainda que originadas de um mesmo clone inicial. Joshua Fidler em 1977, estudando células de melanoma B16 de camundongo verificou que as mesmas são diferentes entre si, constituindo clones com habilidades diferentes para invadir e metastatizar. Neste estudo, Fidler separou células em diluições de forma a obter colônias a partir de uma única célula. Após o crescimento destas colônias, inoculou grupos de camundongos na veia da cauda com diferentes culturas celulares de melanoma, obtendo diferentes números de focos metastáticos nos pulmões de camundongos, revelando que as células tinham diferentes propriedades de migração e instalação no pulmão. Este estudo é importante porque mostra que dentro da massa tumoral e das células em cultura, há diferentes tipos celulares gerando clones, isto tem importantes implicações não só no comportamento como também no tratamento das neoplasias (Fidler et al, 1977).

No experimento que as células do melanoma foram cultivadas, nas colônias metastáticas dos pulmões e nos tumores do tecido subcutâneo, se aceitarmos a teoria de Fidler, havia diferentes populações celulares do melanoma B16 em cada camundongo individual. Estas populações celulares reagiram, ainda aceitando a teoria de Fidler, de maneira diferente ao tratamento com látex, sendo que havia populações celulares mais sensíveis ao tratamento com o látex que outras, mas que conseguiu, como resultado final, reduzir o tamanho total dos tumores subcutâneos, a proporção de área ocupada pelas colônias de melanoma pulmonar e reduzir a viabilidade do conjunto das células em cultura.

8- CONCLUSÃO

Podemos concluir que tanto nos experimentos *in vitro* e *in vivo* nas células de melanoma murino B16/F10 o látex da *Euphorbia tirucalli* nas diluições seriadas 1/128, 1/256, 1/1024, 1/2048 e 1/11192, apresentou efeitos antineoplásicos, diminuindo a viabilidade celular, a quantidade de 0,467µg/25g do látex da *Euphorbia tirucalli*, acabou reduzindo o volume dos tumores subcutâneos em camundongos BALB/c e reduzindo a fração de área pulmonar ocupada pelas colônias pulmonares em camundongos C57BL/6.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aherne WA and Dunnill. *Morphometry*. Londres: Edwards Arnold Ltd; 1982.

Andrade DA. *Ação da Euphorbia tirucalli L. na formação de focos de cripta aberrante na mucosa cólica induzido por azoximetano em ratos* [dissertação]. Fortaleza: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará; 2007.

Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006; 132 (7): 427-32.

Bani S, Kaul A, Khan B, Gupta VK, Satti NK, Suri KA, Qazi GN. Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006; 110: 92-8.

Bennet JP, Hall P. Moles and melanoma: a history. *Ann R Coll Surg Engl*. 1994; 76: 373-80.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. *Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos*. Brasília: Ideal Gráficas e Editora Ltda; 2006. p.1-60.

Caseiro BM, Ferreira EP, Grillo JGB, Araújo JHB. Estudo do potencial de cura de formas de câncer utilizando Avelóz (*Euphorbia tirucalli*). (Apresentada na Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI), Colégio Agrícola de Camboriú; 2006 Outubro 16-17; Camboriú, Brasil).

Calabrese EJ. Hormesis and medicine. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 66: 594–617.

Calabrese E, Iavicoli I and Calabrese V. Hormesis: its impact on medicine and health. *Hum Exp Toxicol*. 2013; 32: 120–52.

César G. *Curiosidades de nossa flora*. Recife: Oficinas gráficas da imprensa oficial; 1956. p.23-27.

Conesa CM, Sánchez NÁ, Ortega VV, Reverte JG, Carpe FP, Aranda MC. *In vitro* and *in vivo* effect of INF α of B16/F10 melanoma in two models: Subcutaneous (C57BL6J mice) and lung metastasis (Swiss mice). *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2008; 63: 305-12.

Costa LS. *Estudo do uso do aveloz (Euphorbia tirucalli) no tratamento de doenças humanas: uma revisão* [monografia]. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba; 2011.

Chaffer CL, Weinberg RAA. Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*. 2011; 331: 1559-64.

Chambers AF, Groom AC, Macdonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews*. 2002; 2: 563-72.

Chin L, Merlino G, Pinho RA. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1998; 12: 3467-81.

Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. Cutaneous Malignant Melanoma. *Mayo Clin. Proc*. 2006; 81 (4): 500-7.

Dantas I.C. *O Raizeiro*. Campina Grande: EDUEP; 2007. p.107-109.

Duda DG, Duyvermana AMMJ, Kohnoa M, Snuderlb M, Stellera EJA, Fukumura D, Jain RK. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107 (50): 21677-82.

Dutra RC, Campos MM, Santos ARS, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*. 2016; 112: 1-25.

Fidler IJ. Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer Res*. 1978; 38: 2651-0.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews*. 2003; 3: 1-6.

Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977; 197 (4306): 893-5.

Fukumasu H, Avanzo JL, Nagamine MK, Barbuto JA, Kao KV, Dagli MLZ. Paullinia cupana Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008; 48: 305-10.

Gheorgheosu D, Dehelean C, Cristea M, Muntean D. Development of the B16 murine melanoma model. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2011; XVI (2): 148-52.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007; 445 (22): 851-7.

Haass NK, Smalley KSM, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma pregression. *J Mol Histol*. 2004; 35: 309-18.

Hayes DP. Adverse effects of nutritional inadequacy and excess: a hormetic model. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88: 578S–81S.

Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley J M, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor

receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*. 2002; 2: 289-300.

Houghton AN, Polsky D. Focus on melanoma. *Cancer Cell*.2002; 20: 275-8.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa2016/>. Acesso em 08 de maio de 2016.

Jargin SV. Overestimation of Chernobyl consequences: biophysical aspects. *Radiat Environ Biophys*. 2009; 48: 341-4.

Joyce J, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev. Cancer*. 2009; 9: 247-52.

Kuo PL, Cho CY, Hsu YL, Lin TC, Lin CC. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 1 (213): 37-45.

Kwong L, China L, Wagner SN. Growth Factors and Oncogenes as Targets in Melanoma: Lost in Translation? *Advances Dermatology*. 2007; 23: 99-129.

Laubli H, Borsig L. Selectins as Mediators of Lung Metastasis. *Cancer Microenviron*. 2010; 3: 97-105.

Le Bourg E. Hormesis, aging and longevity. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790: 1030-9.

Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Med*. 2002; 13 (1): 62-70.

Lin MW, Lin AS, Wu DC, Wang SSW, Chang FR, Wu YC, Huang YB. Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cell growth through

the induction of ERK 1/2- mediated apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50 (12): 4333-9.

López-Díazguerrero NE, González Puertos VY, Hernández-Bautista RJ, Alarcón-Aguilar A, Luna-López A, Königsberg Fainstein M. Hormesis: what doesn't kill you makes you stronger. *Gac Med Mex*. 2013; 149 (4): 438–47.

Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Nova Odessa Instituto Plantarum; 2012 p.211-212.

Maret D, Gruzglin E, Sadr MS, Siu V, Shan W, Koch AW, Seidah NG, Del Maestro RF, Colman DR. Surface Expression of Precursor N-cadherin promotes. *Tumor Cell Invasion. Neoplasia*. 2010; 12 (12): 1066-80.

Marques FZ, Markus MA, Morris BJ. Hormesis as a pro-healthy aging intervention in human beings? *Dose Response*. 2009; 8: 28-33.

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET. Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis. *Mayo Clin Proc*. 2007; 82 (3): 364-80.

Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. *Plantas medicinais*. Viçosa: UFV; 2005.

Moffett JR. Miasmas, germs, homeopathy and hormesis: commentary on the relationship between homeopathy and hormesis. *Hum Exp Toxicol*. 2010; 29: 539-243.

Mwine J, Van Damme P. *Euphorbia tirucalli* L. (*Euphorbiaceae*) – The miracle tree: Current status of available knowledge. *Full Length Research Paper*. 2011; 6: 4905-14.

Neiva L. *A cura do Câncer pelo Avelóz*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Arte Nova S.A; 1968.

Nicolson GL, Brunson KW, Fidler I. Specificity of Arrest, Survival, and Growth of Selected Metastatic Variant Cell Lines. *Cancer Research*. 1978; 38: 4105-11.

Oliani SM, Gil CD. Anti-inflammatory protein annexin 1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Arq Ciênc Saúde*. 2006; 13 (4): 186-191.

Overwijk WW, Restifo N. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology*. 2001; 20: 1-33.

Passos GF, Medeiros R, Marcon R, Nascimento AFZ, Calixto JB, Pianowski LF. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclin triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*. 2013; 698: 413-20.

Paz DPA, Latorre AO, Da Silva TC, Akisue G, Dagli MLZ. Avaliação dos efeitos da *Euphorbia tirucalli* (aveloz) sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica. (Apresentado no 17º Simpósio Internacional de Iniciação Científica (Siicusp); 2009 Novembro 09-13; USP, Brasil).

Pickrell JA, Oehme FW. Examining the risks and benefits of replacing traditional dose-response with hormesis. *Hum Exp Toxicol*. 2005; 24: 259-64.

Raposo G, Marks SM. Melanosomes – dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8: 786-97.

Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In vivo*. 2014; 28: 1005-12.

Recamier JCA. *Recherches sur le traitement du cancer*. Paris: Gabon. 1829. 2v.

Riethdorf MA, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumors cells in cancer patients. *Int J Cancer*. 2008; 1: 1991-2006.

Salla GBF, Prates J, Cardin LT, Santos ARD, Silva Jr WA, Cunha BD, Tajara EL, Oliani SM, Lisoni FCR. *Euphorbia tirucalli* modulates gene expression in larynx squamous cell carcinoma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 16: 1-0.

Saremi A, Arora R. The cardiovascular implications of alcohol and red wine. *Am Ther*. 2008; 15: 265-77.

Silva CFN, Melo GP, Bernardes SS, Cecchini AA. Modelos experimentais de melanoma murino *in vivo*. *Biosaúde, Londrina*. 2013; 15 (2): 73-80.

Situm M, Buljam M, Kolić M, Vučić M. Melanoma – Clinical, Dermatoscopic, and Histopathological Morphological Characteristics. *Acta Dermatovenereol Croat*. 2014; 22: 1-2.

Teicher BA. *Tumor Models in Cancer Research*. 2a ed. Boston: Humana Press; 2002. p.571-605.

Tofanelli EJ, Silva FA. Propriedade fitoterápicas de *Euphorbia tirucalli* L.: da etnobotânica a farmacognosia. *Revista de Biologia e Farmácia*. 2011; 6 (1): 151-166.

Valadares MC, Carrucha SG, Accorsi W, Queiroz ML. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. *International Immunopharmacology*. 2006; 6: 294-9.

Varrichio MCBN. *Estudos Integrados: Biotecnologia, Toxicologia, Metabólitos Especiais e Atividade Antitumoral de Euphorbia tirucalli L* [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2005.

Varrichio MCBN, Simone S, Noronha GNB, Machado KR, Salgueiro LCL. O uso de *Euphorbia tirucalli* (aveloz) em medicina tradicional e as evidências científicas. *Revista de Biologia e Farmácia*. 2008; 3 (1): 84-92.

Waczuk EP, Pereira KB, Machado MM, Oliveira FLS. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos da *Euphorbia tirucalli* L.: dos riscos as possibilidades. *Revista Acta Ambiental Catarinense*. 2012; 9 (12): 36-56.

Wang L, Wang G, Yang D, Guo X, Xu Y, Feng B, Kang J. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Molecular Medicine Reports*. 2013; 8: 1279-85.

Welch DR. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clin Exp Metastasis*. 1997; 15: 272-306.

Weibel ER. *Stereological methods: practical methods for biological morphometry*. Londres: Academic Press; 1989. 1v.

Wiegant FA, de Poot SA, Boers-Trilles VE, Schreij AM. Hormesis and cellular quality control: A possible explanation for the molecular mechanisms that underlie the benefits of mild stress. *Dose Response*. 2012; 11: 413-30.