

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTITUMORAL
DO *Cissus Sicyoides* EM ASSOCIAÇÃO COM (GLUCANA β -1,3-D-
GLICOPIRANOSE) IMUNOGLUCAN®.

FLÁVIA RAQUEL SANTOS LUCENA

RECIFE
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTITUMORAL
DO *Cissus Sicyoides* EM ASSOCIAÇÃO COM (GLUCANA β -1,3-D-
GLICOPIRANOSE) IMUNOGLUCAN®.

FLÁVIA RAQUEL SANTOS LUCENA

Manuscrito referente à
dissertação de mestrado da aluna
Flávia Raquel Santos Lucena,
apresentado ao programa de Pós
- graduação em Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Silene Carneiro do Nascimento.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida.

RECIFE

2009

Lucena, Flávia Raquel Santos

Verificação das atividades citotóxica e antitumoral do *Cissus sicyoides* em associação com (glucana β -1,3-D-glicopirranose) Imunoglucan® / Flávia Raquel Santos Lucena. – Recife: O Autor, 2009.

47 folhas.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia.

**1. Plantas medicinais 2. Insulina vegetal 3. *Cissus sicyoides* I
Título.**

**633.88
615.321**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2009- 034**

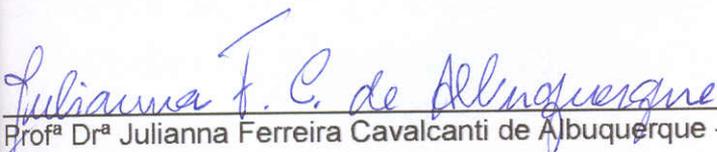
Verificação das atividades citotóxica e antitumoral do *Cissus sicyoides* em associação com (glucana β -1,3-D-glicopirranose) Imunoglucan®.

Flávia Raquel Santos Lucena

Membros Titulares:



Profª Drª Ana Luiza Muccillo Baisch - Fundação Universidade de Rio Grande –RS.



Profª Drª Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque - Universidade Federal de Pernambuco.



Profª Drª Silene Carneiro do Nascimento – Universidade Federal de Pernambuco. (Orientadora).

Membros Suplentes:

Prof. Dr. Sebastião José de Melo – Universidade Federal de Pernambuco.

*Dedico este trabalho a minha mãe
- Maria da Conceição dos Santos - pela
encorajação e por ser a luz para a
minha formação de física que até agora*

Profª Dra. Maria Raquel Quirino de Souza - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

“Dedico este trabalho a minha tia Merystella França dos Santos pelos ensinamentos e por ter feito parte da minha formação do princípio até os dias atuais”.

“Você é aquilo que Ama”

Santo Agostinho

“Somos aquilo que fazemos repetidamente. Portanto a excelência, não é um ato, mas um hábito.”

Aristóteles.

AGRADECIMENTOS

Graças a ti Senhor este dia chegou! e será com muita fé e determinação que continuarei seguindo por este caminho a fim de tornar meu sonho uma realidade.

Agradeço imensamente aos meus pais José Victor de Lucena e Raquel Cristina Santos Lucena por tudo o que fizeram e fazem por mim. Hoje é um dia especial, pois divido com eles, mas um momento muito importante na minha vida, na vida deles...

A minha tia Merystella França dos Santos tão linda tão frágil ao longo dos seus 95 anos de sabedoria depois de 40 anos dedicados ao magistério, ela é sem dúvida minha inspiração!

Ao meu namorado Richardson Bezerra de Lima por estar comigo sempre, me apoiando em minha carreira acadêmica .

Ao professor Edvaldo Rodrigues de Almeida foram mais dois anos preciosos de muito aprendizado professor! Obrigada por tudo um dia serei como o senhor.

As professoras Silene Carneiro do Nascimento e Teresinha Gonçalves da Silva, pelos conselhos, pela paciência nos meus “raros” momentos de estresse. Professora Silene, além de orientadora amiga em tanta horas, não esquecerei o empenho da senhora em sempre atender minhas necessidades.

A professora Valdênia Maria Oliveira de Souza pela colaboração tão importante para o fechamento dos nossos resultados.

Ao pessoal do laboratório Jaciana, Diana, Iane, Silvia , Tatiana, Katarina, Marília, Ingrid e a todos os outros cujos nomes não mencionei, foi ótimo conhecer vocês.

A dona Suzete que gentilmente permitiu que eu usasse sua sala, o que muito me ajudou nos dias em que a grana estava curta, foi lá que muitas vezes fiz minhas refeições trazidas de casa. Também passei momentos de descontração nesta sala e fiz novas amizades Maria e Suely gosto muito de vocês!

Ao Dr. Avaniel Marinho diretor do laboratório Hebron pela parceria nos cedendo às ampolas de Imunoglucan utilizadas em nossa pesquisa. Um muito obrigada e sinceros votos de que esta parceria continue, a ciência agradece!

Ao programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas e todos os seus membros coordenadores, professores e em especial a Adenilda Eugênia secretária do programa.

Enfim a todos aqueles que de longe ou perto torcem pela minha vitória, amigos (Eduardo, Gerson , Paulla) primos em geral e a todos que já se foram mas que tenho certeza : Continuam olhando por mim... OBRIGADA! e até o doutorado!

RESUMO

Cissus sicyoides L. tem origem na República Dominicana e popularmente é utilizada em diversas doenças, como a epilepsia, derrame cerebral, bem como, em abscessos e no tratamento do diabetes *mellitus* do tipo 2 . Esta espécie apresenta atividades antiinflamatórias e anti-reumáticas, antiepiléptico, antihipertensivo, antitérmico e antidiabético. O objetivo desta pesquisa foi estudar a atividade citotóxica e antineoplásica nos tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich do extrato hidroalcoólico de *Cissus sicyoides*, como também avaliar a ação adjuvante do imunomodulador imunoglucan® (glucana β -1,3-D-glicopiranoose), produzido pelo laboratório Hebron. O extrato hidroalcoólico de *Cissus sicyoides* não demonstrou atividade citotóxica, mas apresentou uma inibição de 48,7 e 62% no crescimento tumoral para o Sarcoma -180 e de 69 e 84,4% para o Carcinoma de Ehrlich. nas doses de 300 e 600mg/kg respectivamente. Quando feito o uso do Imunoglucan® não foi observada melhora da atividade antitumoral. Estudos hematológicos indicaram que o extrato apresentou um intenso efeito quimiotático nas 24 horas, em relação ao número de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais. Também foi verificado um aumento na quantidade de linfócitos devido à presença do extrato nas 24 horas. Estes resultados demonstraram o potencial antitumoral do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* através estimulação/ atração de células linfóides para o local estimulado sugerindo que a atividade antitumoral pode está intimamente relacionada com a ativação da linhagem linfóide.

Palavras chaves: *Cissus sicyoides*, Atividade antitumoral, Atividade Citotóxica, recrutamento de leucócitos.

ABSTRACT

Cissus sicyoides L. comes from the Dominican Republic, popularly is used in several diseases such as epilepsy, stroke, and in the treatment of abscesses and diabetes mellitus type 2. This species has anti-inflammatory activities and anti-rheumatic, antiepileptic, antihypertensive, antipyretic and antidiabetic agent. The objective of this research was to study the cytotoxic and antineoplastic activity in experimental tumors Sarcoma 180 and Ehrlich Carcinoma of the hydroalcoholic extract of *Cissus sicyoides* and also evaluate the adjuvant effect of immunomodulator Imunoglucan® (Glucan β -1,3-D-glicopiranoze) produced by the Hebron laboratory. The hydroalcoholic extract of *Cissus sicyoides* did not show cytotoxic activity but showed an inhibition in tumor growth of 48.7 and 62% to Sarcoma -180 and 69 and 84,4% in relation to Ehrlich Carcinoma when used doses of 300 and 600mg/kg respectively. There was not an improvement of antitumor activity by the use of imunoglucan®. Hematological studies pointed that the extract showed a strong chemotactic effect within 24 hours, in relation to the number of leukocytes in the peritoneal cavity of animals. It was also observed an increase in the number of lymphocytes due to the presence of the extract. These results demonstrated the hydroalcoholic extract antitumour potential from the leaves of *Cissus sicyoides* through stimulation / attraction of lymphoid cells to the site suggesting that the antitumor activity can be closely related to the activation of lymphoid lineage.

Keywords: *Cissus sicyoides*, Antitumor activity, Cytotoxic Activity, Leukocytes recruitment.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE GRÁFICOS.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Geral.....	13
3.2 específico.....	13
4.REFERÊNCIAS	14
5. CAPÍTULO I – Artigo submetido a periódico internacional.....	21
6. ANEXO	
Resultados, Discussão e Conclusões versão Português.....	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura química do Imunoglucan®.....12
- Figura 2 - Mostra quantidade de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos pertencentes ao grupo Veiculo x Tratado (300mg/kg *C. sicyoides*) 1000x M.O. Tempo 24 horas.....41
- Figura 3 - Mostra quantidade de linfócitos na cavidade peritoneal de camundongos pertencentes ao grupo veiculo x Tratado (300mg/kg *C. sicyoides*) 400x M.O. Tempo 24 horas.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antitumoral <i>Cissus sicyoides</i> (Sarcoma 180)	38
Tabela 2 - Atividade antitumoral de <i>Cissus sicyoides</i> (Carcinoma de Ehrlich).....	39
Tabela 3 - Atividade antitumoral de <i>Cissus sicyoides</i> com Imunoglucan (Sarcoma 180).....	39
Tabela 4 - Atividade antitumoral de <i>Cissus sicyoides</i> com Imunoglucan (Carcinoma de Erlich).....	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Migração de leucócitos para o sangue periférico.....	40
Gráfico 2 - Migração de leucócitos para a cavidade peritoneal	41
Gráfico 3 - Migração de linfócitos para o sangue periférico	42
Gráfico 4 - Migração de linfócitos para a cavidade peritoneal	42

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As relações entre o conhecimento popular e o científico podem ser enquadradas dentro de uma mesma discussão. O conhecimento popular é fundamentado em bases empíricas e em resultados práticos, que contribuem para a solução de problemas do cotidiano, se contrapondo ao conhecimento científico, o qual se fundamenta em teorias comprovadas experimentalmente através de métodos validados pela comunidade científica. Por outro lado, tem-se no estudo das plantas medicinais o estabelecimento de uma relação racional entre o uso das plantas medicinais e a cura das doenças por meio de substâncias bioativas obtidas das plantas (CASTRO, FERREIRA, 2001).

A interação entre estes dois aspectos é alcançada quando os pesquisadores, em busca de novos medicamentos, vão até a população e efetuam levantamentos etnofarmacológicos para realização de seus ensaios e comprovam ou não a eficácia através de testes laboratoriais “*in vitro*” e “*in vivo*”. A medicina popular também se beneficia das técnicas elaboradas pelos pesquisadores, aperfeiçoando o método terapêutico com a adoção de práticas que procuram a melhor utilização das plantas medicinais (FARNSWORTH, BINGEL, 1997).

A busca de novos medicamentos obtidos à base de plantas representa a esperança mais concreta para pacientes que sofrem de graves doenças. Nesse sentido a indústria farmacêutica chega a investir em torno de 250 milhões de dólares e de 10 a 20 anos na pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento (FERREIRA et al., 1998).

Constituindo-se de uma fonte interessante e ainda pouco explorada de recursos naturais para o desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas, as plantas medicinais, podem ajudar a superar problemas relacionados à resistência e toxicidade dos antibióticos comerciais. Além disso, sua utilização tem papel importante como alternativa de tratamento de doenças nos países em desenvolvimento, gerando um grande interesse na realização de *screening* dessas plantas, para a avaliação do potencial medicinal das mesmas fazendo um paralelo com as indicações etnobotânicas (AWADH et al., 2001)

As plantas são verdadeiros laboratórios onde se sintetizam substâncias que podem ter efeito tanto benéfico como maléfico para o organismo humano. O consumo de chás, umas das formas mais comuns de utilizações de plantas medicinais indicada

pela população, pode ser a princípio mais aceita do que a alopatia, mas precisa haver o conhecimento prévio dos componentes desses chás, pois a presença de inúmeras substâncias neles contidas pode produzir efeitos, principalmente quando tomados ao longo do tempo (ALMEIDA, 1993), pois, algumas substâncias que compõem um preparo popular podem conter uma ação sinérgica que quando tomadas isoladamente não apresentam efeitos, de onde advém a grande vantagem dos chás, porém essas ações podem produzir ao longo do tempo efeitos não conhecidos, que assumem natureza tóxica, a exemplo do Confrei (*Symphytum officinale*), que é utilizado, popularmente para inúmeras enfermidades, parecendo realmente ter um efeito terapêutico, mas quando utilizado com muita frequência, apresenta efeitos tóxicos para o organismo humano (HIRONO, HAGA et al., 1979).

Portanto, a pesquisa químico-farmacológica das plantas se faz necessária pelo grande poder terapêutico que elas apresentam e também pela necessidade de tornar-se posição independente no campo da indústria farmacêutica. Além disso, o conhecimento dos componentes dos chás mais utilizados irá tornar a terapêutica nacional mais acessível a todos os níveis econômicos da população do país (ALMEIDA, 1993).

As pesquisas sistêmicas para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica podem ser executadas por meio de vários processos, entre os quais os mais utilizados são: a síntese de novas moléculas; a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas; a extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais especialmente de origem vegetal, que se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamentos. As plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápicos padronizados e eficazes. (DI STASI, 1996).

Pesquisas para encontrar compostos com propriedade antitumoral produzida por plantas estão sendo conduzidas a mais de 40 anos e novos compostos tem sido encontrados. Em quimioterapia de câncer, as drogas frequentemente exibem severos efeitos colaterais e células tumorais que adquirem resistência também se tornam um problema freqüente (COSTA, 2002).

Em 1960, The National Cancer Institute, iniciou um *screening* biológico para extratos de uma grande variedade de recursos naturais, e um dos extratos se mostrou ativo para uma vasta linhagem de células tumorais de roedores, foi então que em 1967

os Drs. Monre E. Wall e Mansukh C. Wani isolaram o componente ativo, taxol oriundo de *Taxus brevifolia* que posteriormente teve sua estrutura química determinada e em 1980 os cientistas do Albert Einstein Medical College, registraram sua atuação sobre a tubulina dos microtúbulos, inibindo a divisão celular, tornando o taxol uma nova classe de quimioterápico. Foram registrados resultados clínicos do seu uso em câncer de mama, pulmão, ovário e Sarcoma de Kaposi (COSTA, 2002).

Outro agente quimioterápico que merece destaque é o lapachol, componente ativo da casca da árvore *Tabebuia avellanedae*, teve sua estrutura química estabelecida em 1896 e em 1927 a substância foi sintetizada (FIESER, 1927). Com propriedades antibióticas e antineoplásicas reconhecidas, o lapachol teve sua capacidade antineoplásica estudada por vários pesquisadores, frente aos tumores experimentais, Sarcoma - 180, Carcinoma de Ehrlich, Sarcoma de Yoshida e Carcino-Sarcoma de Walker 256 (D' ALBUQUERQUE et al., 1972).

O câncer é uma doença de alta frequência, afetando boa parte da população do mundo, sendo a segunda causa de morte em países desenvolvidos. Em geral, um tumor é iniciado quando uma célula normal do organismo sofre alterações em genes relacionadas com o controle de proliferação celular (GOMES, 1997). As principais características de células neoplásicas que as distinguem das células normais são: a proliferação descontrolada, indiferenciação, perda da função, poder de invasão e de gerar metástases. Uma das principais dificuldades no uso das quimioterapias no câncer é que o tumor já se encontra em estágio bastante avançado por ocasião do diagnóstico (RANG et al., 2001).

Como formas de tratamento para o câncer a quimioterapia é utilizada em tratamento sistêmico, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (CARVALHO et al., 2003).

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo em estágios múltiplos, envolvendo geralmente mais de uma alteração genética e também, outros fatores que, ocorrendo isolados ou de forma simultânea, podem resultar em uma neoplasia. Importantes processos celulares, como crescimento, diferenciação, motilidade e apoptose (morte celular programada) são regulados por sinais provenientes de outras

células e da matriz extracelular ou por fatores de crescimento e citocinas (DIRKS, RUTKA, 1997).

As células podem se dividir em resposta a fatores de crescimento que atuam sobre as RTKs (receptores de superfície tirosino – quinase) que, por sua vez, deflagram eventos intracelulares que resultam na produção dos transdutores do ciclo celular, que levam a síntese de DNA, e conseqüentemente, à divisão celular. Um defeito em qualquer uma dessas etapas (por ativação de oncogênes ou inativação de genes supressores tumorais) pode resultar em proliferação descontrolada, já que a progressão, através do ciclo celular, depende do equilíbrio entre várias forças reguladoras positivas e negativas (KARP, BRODER, 1995).

O aparecimento cada vez maior de cepas bacterianas resistentes a múltiplos antimicrobianos, a utilização freqüente da poliquimioterapia no tratamento do câncer, com conseqüente imunossupressão e principalmente o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida são alguns dos fatores que nos últimos anos, chamaram a atenção dos médicos e pesquisadores ao papel fundamental do sistema imune no combate às infecções, processo esse que é iniciado quando os antígenos são apresentados pelos macrófagos, células reticulares, células de Langerhans etc, aos linfócitos *T helper* que após ativação estimulam as células responsáveis pela resposta imune humoral (linfócitos B) e pela resposta imune celular (Linfócitos T, citotóxicos e macrófagos) (ROITT, RABSON, 2003).

O estímulo da-se através da liberação de fatores humorais (linfocinas) tais como, interleucinas 2 e o fator de ativação de macrófagos, este que, por sua vez estimulado passa a exercer com mais competência a suas ações de migração, aderência, fagocitose, digestão e liberação de monocinas. (ROITT, RABSON, 2003).

Por motivos muitas vezes desconhecidos, o sistema imunológico não exerce sua função de forma adequada o que caracteriza uma imunodeficiência, podendo a mesma ser de ordem humoral (caracterizada por uma disfunção na produção de anticorpos, com quedas nos níveis de imunoglobulinas séricas, levando as infecções bacterianas de repetição como otites, pneumonias, meningites e septicemias). A deficiência pode ser ainda na imunidade celular envolvendo os linfócitos T sendo as infecções geralmente caracterizadas por fungos, bactérias intracelulares e protozoárias e o problema pode estar associado também ao sistema do complemento e neste caso a susceptibilidade de infecções bacterianas também é aumentada (ABBAS et al., 2005).

Atualmente substâncias capazes de interferir no sistema imune promovendo uma maior resposta as infecções são classificadas como modificadoras da resposta biológica e vêm sendo uma das alternativas de tratamento para pacientes com câncer: A imunopotencialização do hospedeiro, tratamento conhecido como imunoterapia adjuvante, está sendo indicado para diversas condições patológicas de importância clínica. Não se sabe ainda qual o papel exato dos adjuvantes na terapêutica do câncer, mas, sabe-se que os adjuvantes causam a estimulação do sistema retículo-endotelial (RODRIGUES et al., 2002).

**REVISÃO
DA
LITERATURA**

2. REVISÃO DA LITERATURA

Muitas são as plantas utilizadas com fins terapêuticos e como objeto do estudo proposto a espécie utilizada tem origem na República Dominicana sendo denominada de *Cissus sicyoides*, hoje tem como sinônimo *Cissus verticillata* (L.) (NICOLSON, JARVIS, 1984) é encontrada também na Flórida (EUA), nas Antilhas e na América tropical, sendo que no Brasil concentra-se especialmente nos Estados do Amazonas, Ceará, Bahia e Rio de Janeiro (ALMEIDA, 1993), sendo utilizado pela medicina popular em diversas doenças, como a epilepsia, derrame cerebral, bem como, em abscessos e no tratamento do diabetes *mellitus* do tipo 2 (SILVA et al., 1996).

Para uso tópico é utilizada contra reumatismo e cura de abscessos (CORREIA, 1969; TOLEDO et al., 1983). Sob forma de cataplasma é aplicada em inflamação muscular (ZAMORA-MARTINEZ, PÓLA, 1992). Atividades antiinflamatórias e anti-reumáticas também são atribuídas à planta (MORI et al., 2001; VIANA et al., 2004) e o chá das partes aéreas é utilizado como antiinflamatório, antiepilético, antihipertensivo, antitérmico e antidiabético (SILVA et al., 1996).

Embora Beltrame et al (2001) em seus estudos não tenham encontrado uma atividade hipoglicemiante através da avaliação da determinação do índice de glicogênio em ratos, uma atividade hipoglicemiante foi demonstrada por Viana et al (2004), no modelo de diabetes induzido pelo aloxano. Os níveis enzimáticos e a atividade anti-lipídica também foram avaliadas.

Outro estudo ainda relacionado à atividade hipoglicemiante do *C. sicyoides* foi realizado por Mori et al (2001), onde foi verificada a eficácia desta planta tanto em animais hereditariamente diabéticos quanto em animais que tiveram diabetes induzida por (STZ) estreptozotocina.

Pepato et al (2003) utilizaram a decocção de folhas de *C. sicyoides* por um período longo em animais normais e diabéticos induzidos. Os autores observaram que os parâmetros fisiológicos e metabólicos que são alterados durante o diabetes não foram alterados, porém houve uma redução significativa dos níveis de glicose na urina e no sangue, o autor sugere a via de inibição como sendo a da gliconeogênese.

Garcia et al (1999) demonstraram a atividade antibacteriana do *C. sicyoides* sendo essa atividade atribuída à alta proporção de compostos fenólicos encontrados na planta.

Elisabetsky, Brum, Souza (1999) demonstraram a atividade anticonvulsivante do óleo essencial linalool extraído das folhas de *C. sicyoides*, foi demonstrado *In vivo*, uma inibição parcial e um atraso significativo da expressão comportamental do PTZ (Pentilenotetrazol), com uma significativa diminuição das convulsões, enquanto que *in vitro* foi verificado que o Linalool modulou a ativação do glutamato.

Pesquisas mostraram que o extrato aquoso de *C. sicyoides* contraiu anéis aórticos de cobaias de modo dose-dependente. Os autores concluíram que o extrato age em nível da membrana, aumentando a entrada de cálcio bem como agindo no depósito interno de cálcio do retículo endoplasmático (GARCIA et al., 1997).

Garcia et al (2000) demonstrou que o extrato aquoso de *C. sicyoides* apresentou um efeito antiinflamatório, determinado em um modelo de carragenina induzindo edema de patas em ratos e em edemas de orelhas de camundongos. Estes autores também observaram uma diminuição no nível de mieloperoxidase em amostras teciduais da área inflamada.

Uma vez que esta planta também é usada como anticarcinogênica no tratamento de câncer de vesícula biliar (QUÍLEZ, 1996), foi proposto por Saenz et al (2000) o estudo da atividade citotóxica do extrato de *C. sicyoides*, O autor realizou ensaios de atividade antimitótica, onde foi verificado que após 24 horas o extrato induziu a completa inibição da mitose, em relação ao teste de citotoxicidade contra as células HEP-2 em cultura, a CI_{50} foi maior do que $50\mu\text{g}/\text{mL}$ o que não está em acordo com o protocolo de substâncias ativas pelo protocolo de Geran. (GERAN,1972).

Quilez et al (2004) realizaram uma análise fitoquímica e um estudo antialérgico para *C. sicyoides* onde ficou determinada a existência de Hydroxistilbena resveratrol onde a atividade antialérgica foi determinada pela inibição da liberação de histamina pelos mastócitos através da utilização do extrato metanólico, bem como, o constituinte isolado da planta.

Medeiros et al (2002^a, 2002^b) afirmaram que o extrato aquoso apresenta uma atividade anti-nociceptiva, ainda segundo os referidos autores o extrato aquoso desta planta também apresenta propriedades anticonvulsivantes, evidenciadas nos modelos de convulsões induzidas pela estriçnina.

O efeito antinociceptivo central induzido pelo extrato hidroalcoólico de *C. sicyoides*, foi demonstrado através dos testes de contrações abdominais induzidas pelo ácido acético, teste de placa quente e imersão de cauda em camundongos. A ação analgésica central foi confirmada através do bloqueio da analgesia quando feito o uso

do Naloxone, um antagonista específico dos receptores opióides. (ALMEIDA et al., 2006).

Estudos determinaram à atividade teratogênica e abortiva dos extratos alcoólico e hidroalcoólico de *C. sicyoides*, onde foi demonstrado que esta planta provavelmente atua no início da divisão do ovo e no período de implantação uma vez que foram observados reabsorções e malformações em alguns fetos (ALMEIDA et al., 2006a). Ainda em relação aos efeitos embriofetotóxicos e desenvolvimento pós-natal da prole, foi demonstrado que o *C. sicyoides* não influenciou na fertilidade materna, mas induziu alterações no reflexo postural da prole, promovendo também malformações nos fetos (ALMEIDA et al., 2007).

Outra atividade atribuída à planta é a atividade fungitóxica, onde Luciana et al (2007), analisaram o extrato etanólico fracionado por vários tipos de solventes, sendo o efeito antifúngico analisado frente a *Cladosporium sphaerospermum*. Os resultados demonstraram que os extratos em clorofórmio e acetato de etila foram ativos. Os autores concluíram após análise fitoquímica que os compostos responsáveis por esta atividade foram o biciclogermacreno, um sequiterpenóide com reconhecida atividade antifúngica, e o resveratrol que segundo Adrian et al (2000) trata-se de um componente com atividade antifúngica funcionando como uma fitoalexina, após uma infecção por patógeno. Chan (2004) observou que o resveratrol tem atividade contra dermatófitos e bactérias da pele de humanos, sugerindo que o mesmo poderia ser usado no combate de algumas infecções antifúngicas de humanos. (JUNG et al., 2005).

Estudos fitoquímicos mostram que *C. sicyoides* contém, Antocianinas nos seus frutos, e nos extratos obtidos da planta encontram-se aminoácidos, proteínas, alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos, triterpenos, esteróides e compostos graxos (SILVA et al., 1996), estudos afirmam que sua composição química não se altera, pelo menos qualitativamente durante o período de seca (LIZAMA, MARTINEZ, PÉREZ, 2000).

Significantes quantidades de α -Tocoferol um composto reconhecido como adjuvante de drogas anticonvulsivantes em estudos clínicos é encontrado em suas folhas. (BARBOSA, 1994). Também se fazem presentes os flavonóides, kaempferol 3-*o*-ramnosideo e quercetina 3-*o*-ramnosideo obtidos a partir das partes aéreas da planta e que são apontados como as principais substâncias que induzem o efeito hipoglicemiante.

Estudos realizados pelo mesmo autor identificaram nas partes aéreas da planta a presença de duas novas cumarinas (glicosídica e sabadina) e dois flavonóides (BELTRAME et al., 2001; 2002).

Na análise fitoquímica feita por Quílez et al (2004) o composto hidroxistilbena resveratol foi identificado. Este composto foi responsável pela significativa inibição da liberação de histamina pelos mastócitos o que possibilitou uma atividade antialérgica. O resveratol também pode ser apontado como um dos constituintes responsáveis pelas propriedades antiinflamatórias apresentada pelo *C. sicyoides*.

Garcia et al (2000) em seu estudo para avaliar a atividade antiinflamatória da referida planta, também realizou estudos fitoquímicos onde foi demonstrada a presença das sapogeninas esteroidais (hecogenina e disogenina), substâncias também envolvidas no processo antiinflamatório.

Estudos fitoquímicos envolvendo fruto desta planta foram realizados por Toledo et al (1983). Os autores encontraram três pigmentos: delfinidina-3-rutinosideo, cianidina-3-ramnosil-arabinosideo e delfinidina-3-raminosideo. A antocianina contida no suco da fruta desta planta pode ter potencial como um corante alimentício.

Em relação a estudos clínicos utilizando esta planta, Santos et al (2008) utilizaram o infuso das folhas de *C. sicyoides* para avaliar a eficácia terapêutica desse vegetal em voluntárias intolerantes à glicose e diabéticas entre 30 e 59 anos de idade o chá foi preparado com 1g do pó das folhas secas, diluído em 150 mL de água quente por 10 minutos (uso popular). Foi utilizada dose única, por um período de 7 dias. Foi observada uma atividade hipoglicemiante significativa aos 120 minutos, porém, não houve aumento da insulinemia, além da fisiológica, sugerindo que esse efeito não ocorreu por liberação ou secreção da mesma.

A imunoterapia conta um número vasto de substâncias, a maioria delas polissacarídeos e entre os polissacarídeos biologicamente ativos estão as D-glucanas do tipo β -(1-3) e β -(1-3 ; 1-6) que revelaram-se como compostos potentes sendo efetivos contra tumores. Lentinana e Esquizofilana, duas glucanas fúngicas β -(1-3;1-6), tornaram-se clinicamente relevantes como imunoadjuvantes na terapia contra o câncer. Estas glucanas não citotóxicas, supostamente expressam seu efeito antitumoral por estimulação do sistema imunológico do hospedeiro. Acredita-se que ação aconteça, principalmente, pela ativação das células T “helper”, células NK (Natural killer) e macrófagos citotóxicos tanto quanto por um aumento das células T citotóxicas. (GOMAA et al., 1992; CHEUNG et al., 2002).

Estudos recentes mostram que as glucanas β -(1-3) modulam o sistema imunológico pela ativação dos macrófagos através da ligação do polímero a receptores específicos dessas células (WILLIANS, 1997; YOUNG, FRAZER, CASTRANOVA, 2001). Esta atividade antitumoral parece está relacionada à estrutura química da cadeia principal da glucana na forma de hélice tríplice, à frequência e complexidade das cadeias laterais e à sua massa molecular (SCHMID et al., 2001). Portanto, decifrar as características estruturais destes polímeros é um pré-requisito essencial para entender como as glucanas fúngicas são reconhecidas pelo sistema imune (KISHIDA, SONE, MISAKI, 1992).

Neste estudo foi utilizado o Imunoglucan® (Glucana β -1,3-D-glicopirranose) que é um polissacarídeo de peso molecular em torno de 6.500 dalton (HASSID et al., 1941) constituído por moléculas de glicopirranose (glicose) unidas por ligações β - glicosídicas entre os carbonos 1 e 3 (figura 1), sendo a mesma, considerada como um potente ativador dos monócitos e neutrófilos do sangue periférico, contribuindo desta maneira, para uma maior eficiência do sistema imune no combate a infecções (HEBRON, 2005).

Estudos acerca dos mecanismos de ação de substâncias demonstraram a importância desse polissacarídeo na resposta imunológica e hematológica no câncer (SORIMACHI et al., 2001). Foi demonstrado que a 1-3- β -D-glucana possui efeitos sobre o sistema imunológico, tais como: aumento da imunidade celular e humoral, aumento do número, tamanho, atividade fagocitária, aumento na aderência e quimiotaxia dos macrófagos; aumento do número de monócitos circulantes, aumento da produção de antígenos e atividade citolítica sobre células tumorais humanas *in vitro* (JENNEMAN et al., 1999; TAKAKU, KIMURA, OKUDA, 2001; TAKESHI, YOSHIYUKI, HIROMICHI, 2001).

No mecanismo de ação da ativação do sistema imunológico, esta glucana atua como pseudo-antígeno opsonizante, facilitando a fagocitose do complexo antigênico por macrófagos que estão associados ao setor T (Timo-dependente) do sistema imunológico, mediado por células, constituído por linfócitos supressores e auxiliares; e ao setor B (Bursa-de-pendente), constituído por plasmócitos, que se encarregam de formar anticorpos (TAKAKU, KIMURA, OKUDA, 2001). As células Th-1, que desencadeiam o setor mediado por células T, e estimulam os linfócitos T a elaborarem interleucinas, são ativadas pela β -glucana. Estas interleucinas estimulam células NK (Natural Killer), responsáveis pela destruição das células neoplásicas. Paralelamente, os linfócitos CD-8 adquirem alta citotoxicidade específica (CTL), por ação da β - glucana

opsonizada com o antígeno, contribuindo ao processo de destruição celular do tumor (TAKAKU, KIMURA, OKUDA., 2001).

Em relação a sua absorção uma vez injetada a glucana adere às células macrofágicas portadoras de receptor para β -1,3-D-Glucana e é fagocitada, sua distribuição se dá conseqüentemente para órgãos ricos em células componentes do sistema imunológico principalmente os pulmões, fígado, baço e em menor quantidade, a medula óssea. No fígado essa glucana é metabolizada e transformada em glicose seguindo suas vias de degradação (HEBRON, 2005).

O maior obstáculo da utilização clínica das β -glucanas é a falta relativa de solubilidade em meio aquoso. Segundo Willians et al (1992) as β -D-glucanas (1-3) isoladas da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* como microparticulas insolúveis (1-2 μ m) não induzem nenhuma toxicidade quando administradas intralesão ou topicamente, porém o uso sistêmico (intravenoso) da forma microparticulada está associado com hepatoesplenomegalia, formação de granulomas, microembolia e aumento da sensibilidade às endotoxinas.

Um dos primeiros procedimentos empregados para a solubilização destas moléculas microparticuladas foi à sulfatação da glucana de *Saccharomyces cerevisiae*. O objetivo primário foi aumentar a polaridade da molécula aumentando, conseqüentemente, sua solubilidade em água e preservando a ação imunobiológica. Este objetivo foi alcançado, considerando-se que as glucanas sulfatadas exerceram potente atividade antimicrobiana e antineoplásica e, particularmente, um efeito inibitório contra o vírus causador da imunodeficiência humana (HIV) (WILLIANS et al., 1992.).

Sendo assim, uma diversidade de estudos envolvendo o uso de imunomoduladores da resposta biológica e princípios ativos obtidos de plantas estão cada vez mais presentes na literatura científica. Muitos estudos morfológicos, químicos e farmacológicos de *Cissus sicyoides* L. são encontrados na literatura científica indicando o vasto uso e uma grande variedade de propriedades medicinais comprovadas cientificamente.

Em relação a pesquisas relacionadas à atividade antineoplásica para extratos brutos de suas folhas, foi verificada uma carência de estudos elucidativos que comprovem suas ações citotóxicas e antitumoral.

Diante do exposto, este estudo visa contribuir na ampliação do conhecimento das propriedades farmacológicas da espécie *Cissus sicyoides* L. avaliando as ações citotóxicas e antitumoral do extrato hidroalcoólico de suas folhas, bem como, avaliar o

potencial imunomodulador do adjuvante Imunoglucan® (Glucana β -1,3-D-glicopirranose) produzido pelo laboratório Hebron.

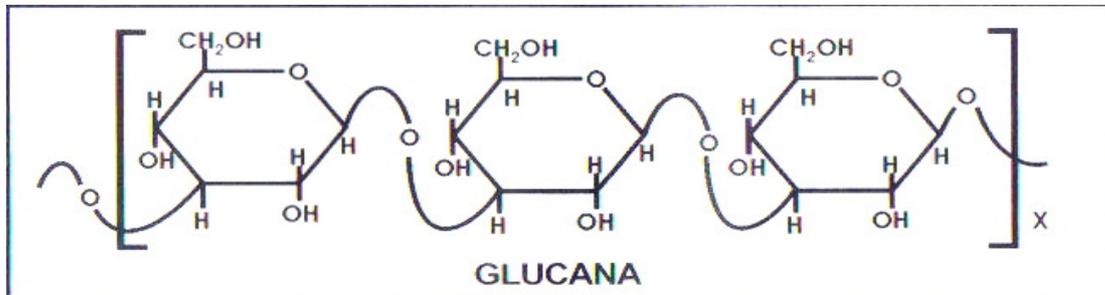


Figura 1: Estrutura química do Imunoglucan® - Hebron, 2005.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a atividade citotóxica e antineoplásica do extrato hidroalcoólico de *Cissus sicyoides*, nos tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich como também avaliar a ação adjuvante do imunomodulador Imunoglucan® (glucana β -1,3-d-glicopirranose), produzido pelo laboratório Hebron.

3.2 Objetivos específicos

- a) Estudar a citotoxicidade em linhagens de células de câncer humano KB (carcinoma epidermóide de boca), HEP-2 (Carcinoma epidermóide de laringe) e NCI-H292 (Carcinoma mucoepidermóide de pulmão).
- b) Avaliar a atividade antineoplásica do extrato hidroalcoólico do *Cissus sicyoides* nos tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich.
- c) Avaliar a ação adjuvante da glucana (β -1,3-D-glicopirranose) Imunoglucan® no sistema imunológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H; POBER, Jordan S. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p. ISBN 85-352-1533-6 (broch.)
- ADRIAN, M; JEANDET, P; DOUILLET-BREUIL, A. C ; TESSON, L ; BESSIS R – Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 6103-6105, 2000.
- ALLEY, M. C; SCUDIÈRE, D. A; MONKS, A; HURSEY, M. L; CZERWINSKI, M. J; FINE, D. L; ABBOTT, B. J; MAYO, J. G; SHOEMAKER, R. H; BOYD, M. R - Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**. v. 48,p. 589-601, 1988.
- ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. Hemus. 1993, 342 p.
- ALMEIDA, E. R. **Estudo da atividade antinociceptiva central do extrato hidroalcoólico das sementes de *Dioclea grandiflora* Mart ex. Benth (Fabaceae) e dois de seus constituintes químicos: Dioclenol e Dioflorina**. 2002. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal da Paraíba. Paraíba, João Pessoa.
- ALMEIDA, Edvaldo R; LUCENA, Flávia F.R; OLIVEIRA, João R.G; SOARES, Renata P.F; COULTO, Geraldo G.B.L. - Central Antinociceptive Effects of *Cissus sicyoides* on Mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 4, p. 304-308, 2006.
- ALMEIDA, E.R; OLIVEIRA, J.R.G; LUCENA, F.R.S; COULTO, G.B.L; SOARES, R.P.F; - The Action of Extract of The Dry Leaves of *Cissus sicyoides* L. in pregnant rats – **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 25, n.3, p. 421-424, 2006a.
- ALMEIDA, E.R; OLIVEIRA, J.R.G; LUCENA, F.R.S; SILVA, C.V.N.S; COULTO, G.B.L; SOARES, R.P.F; CAVALCANTI, J.B- Embriofetotoxic effect and offspring postnatal development exposed to hydroalcoholic fraction extract of *Cissus sicyoides* L. during wistar rats pregnancy- **journal of medicinal Plants Research**. v.1, n.5, p. 109-112, 2007.
- AWADH-ALI, N.A; JULICH, W.D; KUSNICK, C; LINDEQUIST, U - Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities.**Journal of Ethnopharmacology**. v.74, p. 173 – 179, 2001.
- BARBOSA, W.L.R. **Untersuchung Der Brasilianischen Arzneipflanze *Cissus sicyoides***. 1994. 159 f. Tese (P.h.D.). Germany, Bonn University, Germany.
- BAUMANN, H; GAULDIE, J - The acute phase response. **Immunology Today**. v.15, p.74-80, 1994.
- BHARAT, B.L ; AGGARWAL ; BHARDWAJ, A; RISHI, S; NAVINDRA, P; SHISHODIA, S.S ; TAKADA, Y- Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. **Anticancer research**. v.24, p. 3 – 60, 2004.

BELTRAME, F.L ; SARTORETTO, J.L; BAZOTTE, R.B; CUMAN, R.N; CORTEZ, D.A.G- Estudo Fitoquímico e avaliação antidiabética do *Cissus Sicyoides*. **Química Nova**, v. 24, n.6, p. 783 – 785, 2001.

BELTRAME, F.L ; PESSINE, G.L ; DORO, D.L ; FILHO, B.P.D ; BAZOTTE,R.B ; CORTEZ, D.A.G - Evaluation of antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 45, n.1, p. 21-25, 2002.

BORCHERS, A.T ; STERN, J.S ; HACKMAN, R.M; KEEN, C.L; GERSHWIN, M.E - Mini review: Mushrooms, tumors and immunity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 221, p. 281-293, 1999.

CARVALHO, P; TIRNAUER, J.S; PELLMAN, D- Surfing on microtubule ends **Trends in Cell Biology**. v.5, p. 229, 2003.

CASTRO, H. G ; FERREIRA, F. A - A Dialética do conhecimento no uso das Plantas Medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.3, n.2, p.19 – 21, 2001.

CHAN, M.M.Y – Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin – **Biochemical Pharmacology**. v.63, p. 99-104, 2004.

CHEUNG, N-K.V; MODAK, S; VICKERS, A; KNUCKLES, B - Orally administered beta-glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies.**Cancer Immunology Immunotherapy**. v.51, p.557, 2002.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v.6. Rio de Janeiro: Ministério da agricultura, 1969.

COSTA, M.C.C.D; AGUIAR, J.S; PINTO, J.C.- **Aspectos Farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): atividade antimicrobiana, citotóxica e antitumoral**. 2002. 124f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

D' ALBUQUERQUE, L.L; MACIEL, M. C.C.N; SCHULER. A.R.P; ARAUJO, M. C. M; MACIEL, G.M; CAVALCANTI, M. S. B; MARTINS, D. G; LACERDA, A. L -Preparação e primeiras observações sobre as propriedades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homologas inferiores na serie da 2-hidroxi-3 (3- metil-2- butenil)-1,4-naftoquinonas (lapachol). **Revista do Instituto de Antibióticos**. v. 12, n.1/2, p.31- 40, 1972.

DIRKS,P.B.; RUTKA, J.T - Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle- a review. **Neurosurgery**. v.40, p.1000-1013, 1997.

DI STASI, L. C - Plantas medicinais: arte e ciência. **Um guia de estudos interdisciplinar**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996, 229f.

ELISABETSKY, E; BRUM, R.F; SOUZA, D.O - Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure model. **Phytomedicine**. v. 6, n.2, p. 107 – 113, 1999.

FARNSWORTH, N.R; BINGEL, A.S- **New natural products and plant drug with pharmacological, biological or therapeutic activity**. New York: Springer, 1997. p.61 – 73.

FERREIRA, S. H; BARATA, L. E. S; SALLES, S. L. M; QUEIROZ, S. R. R; HELUY NETO, N. E; CORAZZA, R; FARIAS, R - **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 128f.

FERREIRA, J; CAMPOS, M.M; PESQUERO, J.B; ARAUJO, R.C; BADER, M; CALIXTO, J.B - Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology**. v. 41, p. 1006 - 1012, 2001.

FIESER, L.F - The alkylation of hydroxynaphthoquinone III. a synthesis of lapachol. **Journal American Chemical Society**. v.49, p. 857- 862, 1927.

GARCÍA, X; CARTAS-HEREDIA, L; LORENZA-JIMENES, M; GIJÓN, E - Vasoconstrictor effect of *Cissus sicyoides* on Guinea-Pig Aortic Rings - **General Pharmacology**. v. 29, n.3, p. 457 – 462, 1997.

GARCIA, M.D; SAENZ, R; PUERTA, R; QUILEZ, A; FERNANDEZ, M.A – Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides* – **Fitoterapia**. v.70, p. 71-73, 1999.

GARCÍA, M.D; QUILEZ, A.M; SAENZ, M.T; MARTINEZ-DOMINGUES, M.E; DE LA PUERTA, R - Anti-Inflammatory activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*., species used in the Caribbean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, n.3, p. 395 – 400, 2000.

GOMAA, K; KRAUS, J; ROKOPF, H; FRANZ, G.J- Anti-tumor and immunological activity of a beta 1-3 / 1-6 glucan from *Glomerella cigulata*, **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v.118, p. 136 - 140, 1992.

GOODMAN, JOEL.W- Imunogenicidade e Especificidade Antigênica. In: STITES, Danie; TERR, Abba. - **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: prentice/Hall do Brasil, 1992, p.79-84.

GERAN, RI; GREENBERG, NH; MACDONALD, MM; SCHUMACHER, AM; ABBOT, T.B.J - Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems, 3rd edition. **Cancer Chemotherapy Report**. v. 3 n.1, p. 103, 1972.

GOMES, R.- Câncer da mama - The molecular constitution of an insoluble polysaccharide from yeast, *Saccharomice cerevisiae*. In: _____ **Oncologia Básica**. Rio de Janeiro: Revinter, 1997.

HASSID, W.Z; JOSLYM, M.A; MCCREADY, R.M - **Journal of the American Chemical Society**, v. 63, p. 295-298, 1941.

HEBRON/SA indústrias – Imunoglucan (Glucana- β -1,3-D-glicopirranose) força para uma defesa vitoriosa, 2005. 84f.

HIRONO, I; HAGA, M. - Induction of HEPATIC Tumors in Rats by “*Senkirkine and Symphytine*” **Journal of the Nacional Cancer Institute**, v.49, p.469, 1979.

JENNEMAN, R ; BAUER, B.L; BERTALANFFY, H.; SELMER, T; WIEGANDT, H - Basidiolipids from *Agaricus* are novel immune adjuvant. **Immunobiology**, v.200, n.2, p. 277-89, 1999.

JUNG, H.J ; HWANG, I.A; SUNG, W.S; KANG, B.S; SEU, Y.B; LEE, D.G – Fungicidal effect of resveratrol on human infection fungi. **Archives of Pharmacology Research**, v. 28, p.557-56, 2005.

KARP, J.E; BRODER, S. - Molecular foundations of cancer: new targets for intervention. **Nature**, v.1, p.309-319, 1995.

KISHIDA, E; SONE, Y; MISAKI, A - Effects of branch distribution and chemical modifications of antitumor (1-3)- β -D-Glucans. **Carbohydrate Polymers**, v.17, p.89-95, 1992.

LIMA, C; CLIASSA, P.B; PIRAN-SOARES, A.A; TANJONI, I; MOURA-DA-SILVA, A.M; FERREIRA-LOPES, M. – Characterisation of Local Inflammatory Response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse modelo tissue injury. **Toxicon**, v.42, p. 499-507, 2003.

LIZAMA, R.S; MARTÍNEZ, M.M; PÉREZ, O.B – Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (Bejuco- Ubí). **Revista Cubana de Farmácia**, v.34, n.2, p.120- 124, 2000.

LUCIANA, S.G.H; ONIKI, D.G; AGRIPINO, P.R.H; MORENO, M.C.M; YOUNG, M. A. S; MAYORM, A. M. L - Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae).– **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.3, p. 361-367, 2007.

MACEDO, M.G.C; LACROIX, N; GARDNER, C.P; CHAMPAGNE - Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate base medium. **International Dairy Journal**, v.12. p. 419 - 426, 2002.

MACHON, Z; KUCZYNSKI, L; GIELDANOWSKI, J; WIECZOREK, Z; ZIMECKI, M; BLASZCZYK, B; MORDASKI, M; WIECZOREC, J; FISZER-MALISZEWSKA, L - Chemical and biological properties of 2- pyridyl-benzil-carbinol. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 29, p. 217-223, 1981.

MEDEIROS, A.C.C; LACERDA, A.M.R; SILVA, L.A.C.T; VIANA, G.S.B; VALE, T.G.- Efeito anticonvulsivante do extrato aquoso (EA) de *Cissus sicyoides* In: **Congresso brasileiro de farmacologia e terapêutica experimental**, 34., 2002. **Anais... Águas de Lindóia SP, Brazil**. 2002.

MEDEIROS, A.C.C.; LACERDA, A.M.R.; VALE, T.G.; VIANA, G.S.B - Efeitos analgésicos do extrato aquoso de *Cissus sicyoides* L. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 27.**, 2002. **Anais...** Cuiaba, MT, Brazil, 2002 a.

MORI, T; NISHIKAWA, Y; TAKATA, Y; KASHIUCHI, N; ISHIHARA, N - Effect of Insulina leaf extract on development of diabetes- Compararison between normal, Streptozotocin-induced diabetic rats and hereditary diabetic mice. **Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science**, v.54, p.197 - 203, 2001.

MOSMANN, T- Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55–63, 1983.

NICOLSON, D.H; JARVIS, C.E - *Cissus verticillata*, a new combination for *C. sicyoides* (Vitaceae). **Taxon**, v.33, p.726-727, 1984.

PARK,C; MOON, D; RHU, C-H; CHOI, B.T; LEE W.H; Kim, G.Y; CHOI, Y.H; β -Sitosterol Induces Anti-proliferation and Apoptosis in Human Leukemic U937 Cells through Activation of Caspase-3 and Induction of Bax/Bcl-2 Ratio **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p.1317-1323, 2007.

PEPATO, M.T; BAVIERA, A.M; VENDRAMINI, R.C; PEREZ, M.P.M.S; KETTELHUT, I.C; BRUNETTI, I.L - *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.37, p.15-20, 2003.

QUILEZ, A - Investigacion fitoquimica y bioensayos de substancias obtenidas de plantas empleadas em diferentes tipos de câncer em Republica Dominicana. In:**Jornada farmacêuticas de la Universidad Nacioanl Pedro Henríquez Ureña, 10.**,1996. **Anais...** Santo Domingo, República Dominicana, 1996.

QUÍLEZ, A.M; SAENZ, M.D; GARCIA, R. DE LA PUERTA - Phytochemical Analysis and Anti – Allergic Study of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n.9, p.1185-1189, 2004.

RANG, H.P; DALE, M.M - **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4.ed, 2001.

RODRIGUES, G.O; ARAÚJO, G.T; ROLIM, H.M.L; NASCIMENTO, S.C; COELHO, L.C.B.B - Lyophilization of Imunoparvum® as an alternative to reduce its side-effects. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.4, n.1, p.73-78, 2002.

ROITT, Ivan M.; RABSON, Arthur. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 182 p. ISBN 8527708353 (broch.)

SÁENZ, M.T; GARCIA, M.D; QUILEZ, A; AHUMADA, M.C - Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. Vitaceae). **Phytherapy Research**, v.14, n.7, p. 552-554, 2000.

SANTOS, H.B; FILHO, J.M; DINIZ, M.F.F.M; VASCONCELOS, T.H.C; PEREIRA, F.S.B; RAMALHO, J.A.R; DANTAS, J.G; SANTOS, E.B - Avaliação do efeito

hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em estudos clínicos fase II. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n.1, p. 70-76, 2008.

SCHMID, F; STONE, B.A; CDOUGALL, B.M; BACIC, A; MARTIN, K.L; BROWNLEE, R.T.C; CHAI, E; SEVIOUR, R.J - Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1→3;1→6)-β-glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht . **Carbohydrate Research**, v.331, p.163 – 171, 2001.

SILVA, G.A; MURADIN, L.B.A; AKISUE, G; FERRO, V.O - Padronização dos extratos de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal) e identificação de carotenos **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.5, n.1, p.96-112, 1996.

SORIMACHI, K; AKIMOTO, K; IKEHARA, Y; INAFUKU, K; OKUBO, A; YAMAZAKI, S - Secretion of TNF alfa, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fraction in vitro. **Cell Structure and Function**, v.26, n.2, p. 103-108, 2001.

TAKAKU, T; KIMURA, Y; OKUDA, H - Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v.131, n.5, p.1409-1413, 2001.

TAKESHI, T; YOSHIYUKI, K; HIROMICHI, O - Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and its Mechanism of Action. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.1409-1413, 2001.

TOLEDO, M.C.F; REYES, F.G.R; IADEROZA, M; FRANCIS, F.J; DRAETTA, I.S – Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sicyoides* Linn.). **Journal of Food Science**, v.48, p.1368-1369, 1983.

VIANA, G.S.B.; MEDEIROS, A.C.C; LACERDA, A.M.R; LEAL, L.K.A.M; VALE,T.G; MATOS, F.J.A - Hipoglycemic and anti-lipemic effects of the aquos extract from *Cissus sicyoides*. **Biomed Central Pharmacology**, v.4, p.1- 7, 2004.

WASSER, S. P - Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p.258 – 274, 2002.

WILLIAMS, D.L; PRETUS, H.A; MCNAMEE, R.B; JONES, E.L; ENSLEY, H.E; BROWDER, I.W - Development of a water-soluble, sulfated (1→3)-beta-D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, v.235, p.247 – 257, 1992.

WILLIAMS, D.L-Overview of (1→3)-β-D-glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, v.6, n.4, p. 247 – 250, 1997.

YOUNG, S.H; YE, J; FRAZER, D.G; SHI, X; CASTRANOVA, V - Molecular Mechanism of Tumor Necrosis Factor-α Production in 1→3-β-Glucan (Zymosan)-activated Macrophages* **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.23, p. 20781- 20787, 2001.

ZAMORA-MARTINEZ, M.C; POLA, C.N.P- Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, p.229 - 257, 1992.

ZHANG, L; ZHANG, M; ZHOU, Q; CHEN, J; ZENG, F- Solution properties of antitumor sulfated derivative of α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.64, p.2172 – 2178, 2000.

5. CAPÍTULO 1

ARTIGO SUBMETIDO A PERIÓDICO INTERNACIONAL

Cytotoxic, Antitumor and Leukocyte Migration Activities of Resveratrol and Sitosterol Presents in the Hidroalcoholic Extract of leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae)

**Cytotoxic, Antitumor and Leukocyte Migration Activities of
Resveratrol and Sitosterol Presents in the Hidroalcoholic Extract of
leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae)**

Flávia Raquel Santos LUCENA^{1*}, Edvaldo Rodrigues de ALMEIDA², Jaciana dos Santos AGUIAR¹, Teresinha Gonçalves da SILVA³ Valdênia Maria Oliveira de SOUZA⁴ Silene Carneiro do NASCIMENTO¹

¹Laboratory Culture of Cells. Federal University of Pernambuco. 50670-901 Recife PE. Brazil.

²Laboratory of Evaluation of Psychobioactive Drugs and its Toxicology. Federal University of Pernambuco. 50670-901 Recife PE. Brazil.

³Laboratory of Bioassays for research and development of drugs. Federal University of Pernambuco. 50670-901 Recife PE. Brazil.

⁴Laboratory of Immunology of Parasitic Diseases and Experimental Schistosomiasis – Lika - University of Pernambuco. 50670-901 Recife PE. Brazil.

ABSTRACT

Cissus sicyoides belongs to the Vitaceae family. It is popularly known as “insulina, cipo-pucá, bejuco caro, puci, anil trepador”. It has also demonstrated a vasoconstrictor effect, and an antibacterial activity. In Brazil, *C. sicyoides* was evaluated for its anticonvulsant and anti-diabetic properties. Phytochemistry studies identified and isolated from its aerial parts sitosterol and resveratrol compounds which are pointed to have antitumor activity. The goal of this study was investigate the cytotoxic and antitumor activities of *Cissus sicyoides* hidroalcoholic extract as well its ability to recruit leukocytes cells to injured tissue. *Cissus sicyoides* did not demonstrate cytotoxic activity but showed an inhibition of tumor growth in front of the tumors tested. The extract had a strong chemotactic effect on the 24 hours after treatment. The hidroalcoholic extract of *Cissus sicyoides* presented antitumor activity which was prompt by T lymphocytes recruitment to the local lesion and suggest a new pathway to antitumor activity by activation of lymphoid lineage.

*Correspondence author. Flávia Raquel Santos Lucena. Department of Antibiotics. Federal University of Pernambuco. Recife PE – 50670-901 Brazil.

E-mail address: flavia_19lucena@yahoo.com.br

1. Introdução

Cissus sicyoides belonging to the Vitaceae family comprises of about 165 genus and 1370 species, which are distributed throughout the tropics, mainly in Brazil and the Caribbean. It is popularly known as “insulinas, cipo-pucá, bejuco de porra, bejuco caro, puci, anil trepador” and its originality is from the Dominican Republic [1]. It has also demonstrated a vasoconstrictor effect on guinea-pig aorta rings [2], and an antibacterial activity [3]. In Brazil, *C. sicyoides* was evaluated for its anticonvulsant property, where it is used against epilepsy and cytotoxic activity [4; 5; 6]. The fact that treatment with tea induced an increase in the amount of chromosomal damage in bone marrow cells without altering the cell division cycle was also demonstrated [7]. The central antinociceptive effect of *C. sicyoides* on mice and the action of dry leaves extract in pregnant rats and offspring postal development was also demonstrated [8;9;10]. Phytochemistry studies identified and isolated from the aerial parts of *C.sicyoides* a new coumarin glycoside 5,6,7,8-tetrahydrocoumarin-5 β -xylopyranoside which was obtained together with known coumarin sabandin, two flavonoids kaempferol 3-rhamnoside and quercetin 3-rhamnoside and two steroids among them sitosterol which is pointed to induce apoptosis together with TNF- α and antitumor activity [11;12]. Leaves of the genus *Cissus* contain sterols, quinones and phenolic compounds. Anthocyanins, saponins and flavonoids are also found in the leaves plants and fruits [12;13] in their phytochemistry studies demonstrated that *C. sicyoides* has in its leaves hydroxystilbene resveratrol another compound responsible to antitumor activity. Resveratrol has pleiotropic effects, altering many different signaling pathways (i.e., nuclear factor- κ B, Rb-E2F, p53, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, and mitosis-activated protein kinase pathways), leading to suppression of tumor cell proliferation,

adhesion, invasion and metastasis, reduced signs of inflammation and angiogenesis, and induction of apoptosis and differentiation [14]. [Fig.2] However, we found no reference about antitumor activity of *Cissus sicyoides*. The inflammatory process consists of a sequence of events that affect vascularity (Vasodilatation increased permeability and expression of adhesion molecules) [15], the leukocytes dynamics on the blood, which are attracted to the focus inflammatory tissue is important because These cells go to the tissues from the peripheral blood to diapedese, and realize its protective functions such as phagocytosis by neutrophils and monocytes, release of cytokines by T helper lymphocytes (CD4+) and cytotoxicity by T lymphocyte cytotoxic (CD8+) [16]. The goal of this study was investigate the cytotoxic and antitumor activities of *Cissus sicyoides* hydroalcoholic extract as well to study its ability to recruit leukocytes cells to the injured tissue.

2. Materials and Methods

2.1 Botanic Materials and Extract Preparation

Aerial parts of plants were collected in the Várzia District at Rua Maria Jaboatão nº 115, Recife, Brazil during the period of September to March, during the harvest time when the plants produce fruits. The plant was identified by Marlene Carvalho de Alencar, Curator of the Geraldo Mariz Herbarium – UFPE. The collected specie was deposited in the Herbarium under the register 50.541. The leaves were washed and dried in the laboratory at room temperature then dried in an oven for 15 days at $\pm 45^{\circ}\text{C}$, then triturated manually. Ethyl alcohol and water was added at a proportion of 70:30 (v/v). The leave, water and alcohol mixture was then reposed for 48 hr, followed by mechanical agitation for also 48 hours, then submitted to rote - evaporation. The extract was dissolved in a physiologic serum solution containing Tween 80 (0,025%) [17].

2.2 Animals used in the pharmacological tests:

For the tests, Swiss albino female mice (*Mus musculus*) were used, weighing between 30-35 grams, with average age of two months. The animals were monitored according to the norms of the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The experiments were conducted according to the National Cancer Institute protocol [18] and the approval by the UFPE- Animal Experimentation Ethic Committee.

2.3 Neoplastic cells used in the tests:

The cytotoxicity tests were conducted using three lines of cells: NCI-H292 cells (mucoepidermoid lung carcinoma cells), HEp-2 cells (larynx carcinoma epidermoid) and KB cells (mouth Carcinoma epidermoid).

1.4 Cytotoxic activity:

The cells (HEp-2, KB and NCI-H292) were maintained in DMEM - Minimum Essential Medium Eagle modified Dulbecco's. (Sigma), [19] supplement with 10% fetal bovine serum (Gibco), 1% solution of antibiotic (penicillin 1000 UI/mL + streptomycin 250 mg/ml) and 1% de L-glutamin 200mM. For cytotoxicity determination a cellular suspension of 10^5 cells/mL, was prepared in DMEM . The suspension was distributed in culture plaques with 96 wells (225µl in each well). The plaques were incubated at 37°C in a CO₂ (COLE PARMER) incubator. After 24 hr (25 µl/well) was added to the tested substances and the plaques were reincubated at 37°C [20]. Evaluation of cytotoxic activity was realized by colorimetric essay MTT bromete method (3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) in a PBS concentration of 5mg/mL. The plaques were placed in an oven at 37°C for 2 hours. At the end of this time, the culture medium along with the excess MTT material were aspirated, mixed with 100 µl of DMSO and added to each well to dissolve the Formazan crystals [21;

22] An optic reading was realized in an automatic plaque reader BIOPLUS (BIO 2000) at 540mm.

2.5 Antitumor Activity:

The animals received 0,2 mL of a suspension (5×10^6 cells/animal) prepared from a cellular suspension of 25×10^6 cellules/mL (animal donator). After injected 0,2 mL of the suspension in the right axillary region of the healthy animals, the treatment was initiated 24 hours later. The donator animals were sacrificed with xilasin. These animals were divided in groups, the first being the control group, received a saline solution (NaCl 0,9%). The second group was submitted to a treatment with *C.sicyoides* hidroalcoholic extract to valuate the antitumor activity. The extract dosages were based on D L₅₀ as referred by [8]. The animals received a dose of 300mg/kg and 600mg/kg of body weight via intraperitoneal injection. At the end of the treatment, the animals were sacrificed with a fatal dose of xilasin, the tumors were removed, and weighed to evaluate the tumor inhibition. The same was adopted to the control animals. The tumor inhibition was calculated according to [23]. The average corporal weight of the animals in the control and treated groups were also observed.

2.6 Migration of cells verification (peripheral blood)

The animals were anesthetized with a solution of 100 µL (2:8) containing xylazine / Ketamine to count total leukocytes and lymphocytes from the blood. Samples were collected by cardiac puncture in the amount of 0.5 ml and preserved in 0,001 mL of EDTA 10% and subsequently subjected to automated counting (3200 BC) the blood slides was prepared, in duplicate, immediately after collection. Slides were stained with hematoxylin and eosin analysis cell was counted in optic microscope (1000x). The analysis was performed 2, 6, 24 hours after treatment.

2.7 Migration of cells verification (peritoneal cavity)

The peritoneal cavity received, ip, 4 mL of sterile solution PBS 10 mM EDTA. Were aspirated around 3mL of peritonitis, which were submitted to the refrigerated centrifuge for 7 minutes at 1500 rpm. The supernatant was collected and the pellet diluted in 100 μ L and 500 μ L of PBS + 0.1% of BSA. The slides were analyzed as described above.

2.8 Statistical analyses

To the cytotoxic and antitumor data were analyzed by analysis statistical software GraphPad Instat 3.0. The results were submitted to the paired T test and analysis of variance (ANOVA), followed by the test of multiple comparisons of Tukey-Kramer. The migration activity was analyzed by (Wilcoxon) and Mann-Whitney tests.

2. Results:

3.1 Cytotoxic Activity

The *C. sicyoides* hidroalcoholic leave extract did not demonstrate cytotoxic activity at tested concentrations, ($CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$).

3.2 Antitumor Activity

The hidroalcoholic extract from the leaves of *C. sicyoides* showed an inhibition of tumor activity in sarcoma -180 of 48,7 and 62% to the doses of 300 and 600mg/kg respectively, when compared to tumors with the control group. (Table 1) when considered Ehrlich Carcinoma the inhibition was 69 and 84,4% to the doses of 300 and 600mg/kg weight respectively in comparison with control group (Table 2). Considering the change in weight of animals were seen significant differences in weight of animals belonging to the Ehrlich

carcinoma group in the dose of 300mg/kg. The results were considered significant when showed tumor inhibition growth above 40% according to the protocol of [18].

3.3 Leukocytes migration evaluation

Regarding the number of leukocytes in peripheral blood, the hydroalcoholic extract of *C. sicyoides* not led to change in normal values of these cells in any of the times studied, as compared to the control group animals (Graphic 1). In the case of leukocytes into the peritoneal cavity (Graphic 2), the extract had a strong chemotactic effect on the 24 hours, since there was a greater quantity of these cells in the group that received the extract in relation to that received saline. There was no statistical difference between the numbers of leukocytes in groups in 6 h group. Considering the number of lymphocytes, we observed that within 24 hours the extract led to a lymphocytopenia in the peripheral blood (Graphic 3). Otherwise, the analysis of peritoneal cavity showed that there was a significant amount of lymphocytes due to the presence of the extract within 24 hours, compared to the control group. These results suggest that the lymphocytopenia observed reflected the migration of these cells to peripheral blood until the peritoneal cavity (Graphic 4).

3. Discussion

Among the medical properties attributed to plants and a gamut of varieties encountered in tropical countries, among them Brazil, there are numerous researches with the objective of identifying efficient activities against cancer, since then several studies are being made to find active substances against cancer [20]. There are various indications of *C. sicyoides* being used as popular medicine; many confirmed by well known methodologies recognized in international literature, this plant is used like an anticarcinogenic in the treatment of gall bladder cancer [13] and was verified in this study that the hidroalcoholic extract produced from *C. sicyoides* leaves did not demonstrate cytotoxic activity at the concentrations tested,

($CI_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$) and to the plant extract to be considered active the CI_{50} should be less than or equal to $30 \mu\text{g/ml}$ for plant extracts [18]. Meanwhile, when realized the antitumor activity *in vivo* was observed that the hidroalcoholic extract of the *C sicyoides* leaves presented an inhibition to Sarcoma – 180 of 48,7% to the 300mg/kg and 62% to the 600mg/kg treatments. In relation to Ehrlich Carcinoma the inhibition was the 69% in 300mg/kg treatment and 84,4% in 600mg/kg treatment suggesting that the antitumor activity could be related to the metabolism of active compounds in secondary metabolites. This interaction is impossible to be visualized *in vitro*, once that the culture *in vitro* metabolic reactions like in live organisms does not exist, tested substances and a gambit of reactions with hormones, enzymes and liver metabolism are capable to influence the functions of tested substances in organism. This antitumor activity can be related to the presence of sitosterol which is pointed to induce apoptosis together with TNF- α and antitumor activity [11] and hydroxystilbene resveratrol another compound responsible to antitumor activity. Resveratrol has pleiotropic effects, altering many different signaling pathways (i.e., nuclear factor- κB , Rb-E2F, p53, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, and mitogen-activated protein kinase pathways, leading to suppression of tumor cell proliferation, adhesion, invasion and metastasis, reduced signs of inflammation and angiogenesis, and induction of apoptosis and differentiation [14]. In relation to cells migrations was verified no changes in the number of total leukocytes between the treated and control groups but the results demonstrated that the extract had a strong chemotactic effect on the 24 hours. In relation to the lymphocytes number (important against tumor development) the results showed that the extract led to a lymphocytopenia on the peripheral blood. Otherwise, the analysis of peritoneal cavity showed that there was a significant amount of lymphocytes due to the presence of the extract within 24 hours, compared to the control group. These results suggest that lymphocytopenia observed reflects the migration of these cells to peripheral blood until the peritoneal cavity. Moreover, the

stimulation of leukocyte influx becomes important in protecting against the tumor. In this study, we found that the hydroalcoholic extract from the leaves of *C. sicyoides* was able to attract lymphocytes to the site of its application. Knowing that in the line lymphoid cells are cells that are specialized in the death of tumors, like CD8 + lymphocytes cytotoxic cells and release of cytokines by T helper lymphocytes (CD4+) [16; 24]. These results prompt the potential of hydroalcoholic extract from the leaves of *C.sicyoides* by lymphoid cell stimulation / attraction pathway. In conclusion the hidroalchoolic extract of *Cissus sicyoides* presented antitumor activity which was prompt by T lymphocytes recruitment to the injured tissue and suggest a new pathway to antitumor activity by activation of lymphoid lineage.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial assistance made by CAPES - Brasil (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

4. References

- [1] F. L. Beltrame, J. L. Sartoretto, R. B. Bazotte, R. Estudo Fitoquímico e Avaliação do Potencial Antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (VITACEAE) *Quim. Nova* 24 (2001) 783-785.
- [2] M.T. Pepato, A.M. Baviera, R.C. Vendramini, M.P.Perez, C. Kettelhutid, I.L. Brunetti, *Cissus sicyoides* (Princess wine) in the long terme treatment of streptozotocin–diabetic rats. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37 (2003) 15-20.
- [3] M.D. Garcia, M.T. Saenz, R. Puerta, A. Quilez, M.A. Fernandez, Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. *Fitoterapia*, 70 (1999) 71-73.
- [4] E. Elisabetsky, J. Marschner, D. O. Souza, Effects of Linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex *Neurochemical Research* 20 (1995) 461-465.
- [5] E. Elisabetsky, G. P. Coelho de Souza, M. A. C. dos Santos I. R Siqueira, T.A. Amador, D.S. Nunes, Sedative properties of linalool *Fitoterapia*. 66 (1995) 407- 414.
- [6] E. Elisabetsky, L.F Brum, D.O. Souza, Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine* 6 (1999) 107-113.
- [7] M.T. Sáenz, M.D. Garcia, A. Quilez, M.C. Ahuamada, Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Phyther. Res.* 14 (2000) 552-554.
- [8] E.R. Almeida, F.R.S. Soares, F.R.S. Lucena, J.R.G. Oliveira, J.F.C. Albuquerque, G.B.L Bosco. Central antinociceptive effects of *Cissus sicyoides* on mice. *Pharmaceut. Biol.* 44 (2006) 304-308.
- [9] E.R Almeida, J.R.G. Oliveira, F.R.S. Lucena, R.P.F. Soares. The action of extract of the dry leaves of *Cissus sicyoides* in pregnant rats, *Acta. Farm. Bonaer.* 25 (2006) 421-424.
- [10] E. R. Almeida, J.R.G. Oliveira, F.R.S. Lucena, R.P.F. Soares, J. B. Cavalcanti , G. B. L. Couto. Embriofetotoxic effect and offspring postnatal development exposed to hydro-alcoholic fraction extract of *Cissus sicyoides* during Wistar rats pregnancy. *J. Medic.Plan. Res.* 1 (2007) 109-112.
- [11] C. Park, D. Moon, C-H. Rhu, B. T. Choi, W. H. Lee, G.-Y. Kim, Y. H. Choi, β -Sitosterol Induces Anti-proliferation and Apoptosis in Human Leukemic U937 Cells through Activation of Caspase-3 and Induction of Bax/Bcl-2 Ratio, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 1317-1323.
- [12] F. L. Beltrame, A. Ferreira, D. A. G. Cortez, Coumarin Glycoside from *Cissus Sicyoides* *Nat.Prod. Res.*, 16 (2002) 213-216.

- [13] M. Toledo, F. Reyes, F. Laderoza, F. Fancis, S. Draettao, Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sicyoides*) J. Food Science, 48 (1983) 1368-1369.
- [14] B. Bharat, L. Aggarwal, L. A. Bhardwaj, S. Rishi, P. Navindra, S.S. Shishodia, Y. Takada, Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer res.* 24 (2004) 3 - 60.
- [15] K.D. Bhoola, C.D. Figueroa, K. Worthy, Bioregulation of Kinins; Kallikreins and Kinases. *Pharmacol. Rev.* 44 (1992) 4-80.
- [16] H. Baumann, J. Gauldie, The acute phase response. *Immunol. Today* 15 (1994) 74-80.
- [17] E. R, Almeida, Estudo da atividade antinociceptiva central do extrato hidroalcoólico das sementes de *Dioclea grandiflora* Mart ex. Benth (Fabaceae) e dois de seus constituintes químicos: Dioclenol e Dioflorina. Tese (Doutorado)-Universidade Federal da Paraíba. Paraíba, João Pessoa, 2002.
- [18] R.I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. Macdonald, A.M. Schumacher, B.J. Abbott. Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems – *Cancer Chemother. Rep.* 3 (1972).
- [19] H. B. Eagle, Combinations for mammalian cell culture. *Science.* 8 (1971) 500 –503.
- [20] M.C.C.D. Costa, S.C. Nascimento, Atividade citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). *Acta. Farm. Bonaer.* 22 (2003) 155-158.
- [21] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65(1983) 55–63.
- [22] M. C. Alley, D. A.Scudiere, A. Monks, M. L. Hursey , M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker, M. R. Boyd, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using amicroculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48(1988) 589-601.
- [23] Z. Machon, L.Kuczynski, J. Gioldanowski, Z.Wieczorek, M. Zimecki, B. Blaszczyk, M. Mordaski, J. Wieczorek, L. Fiszler-Maliszewska, Chemical and biological properties of 2- pyridyl-benzil-carbinol. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 29 (1981) 217-223.
- [24] J. Ferreira, M.M. Campos, J.B. Pesquero, R.C. Araujo, M. Bader, J.B. Calixto, Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptiveresponses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41 (2001) 1006–1012.

Table 1Antitumor activity *Cissus sicyoides* (Sarcoma 180)

Groups	Animal Weight (g) \pm D	Tumor Weight (g) \pm SD	Inhibition (%)
Control (NaCl 0,9%).	33.1 \pm 0.44	1.97 \pm 0.21	0
Treated (300mg/kg)	33.8 \pm 0.32	1.01 \pm 0.08	48,7**
Treated (600mg/kg)	35, 9 \pm 0.21	0,75 \pm 0.05	62 **

used doses 300mg/kg and 600mg/kg by intraperitoneal injection

** P<0,01

Table 2Antitumor activity of *Cissus sicyoides* (Ehrlich Carcinoma).

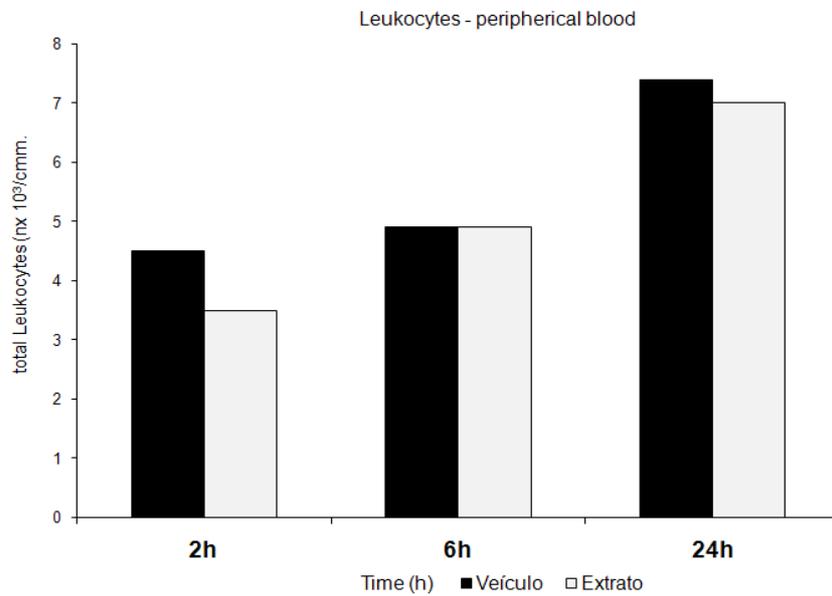
Groups	Animal Weight (g) \pm SD	Tumors Weight (g) \pm SD	Inhibition (%)
Control (NaCl 0,9%)	36.5 \pm 0.96	2.09 \pm 0.24	0
Treated (300mg/kg)	32.6 \pm 0.71*	0,65 \pm 0.07**	69,0**
Treated (600mg/k)	35,6 \pm 0,79	0,32 \pm 0.05**	84,4**

Dose used = 300mg/kg intraperitoneal injection.

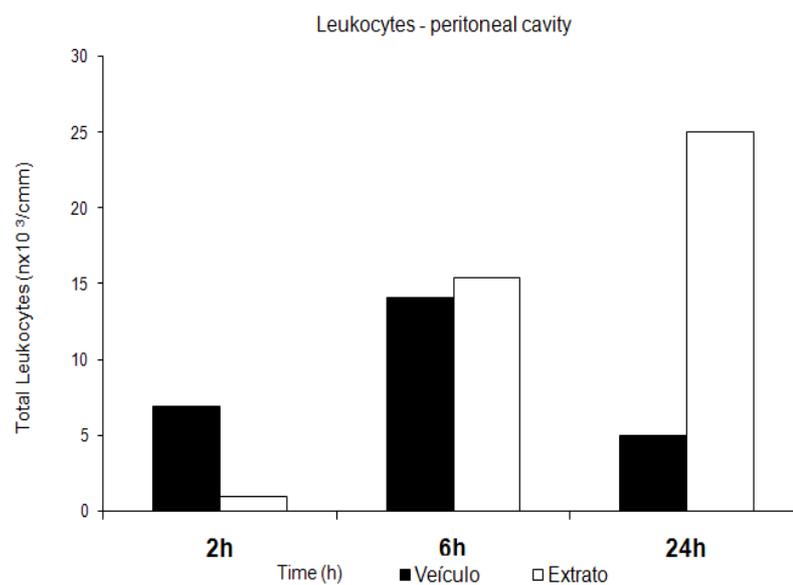
*P<0,05

**P<0,01

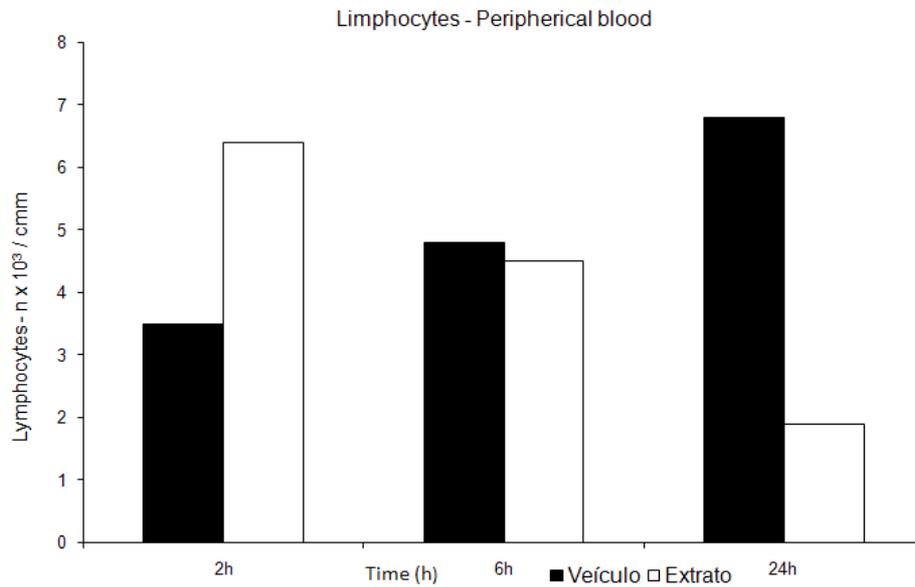
Graphic 1 - Leukocytes migration to peripheral blood. Given 300mg/kg doses of extract of *Cissus sicyoides* by I.P. injection. Referential values (4-12)



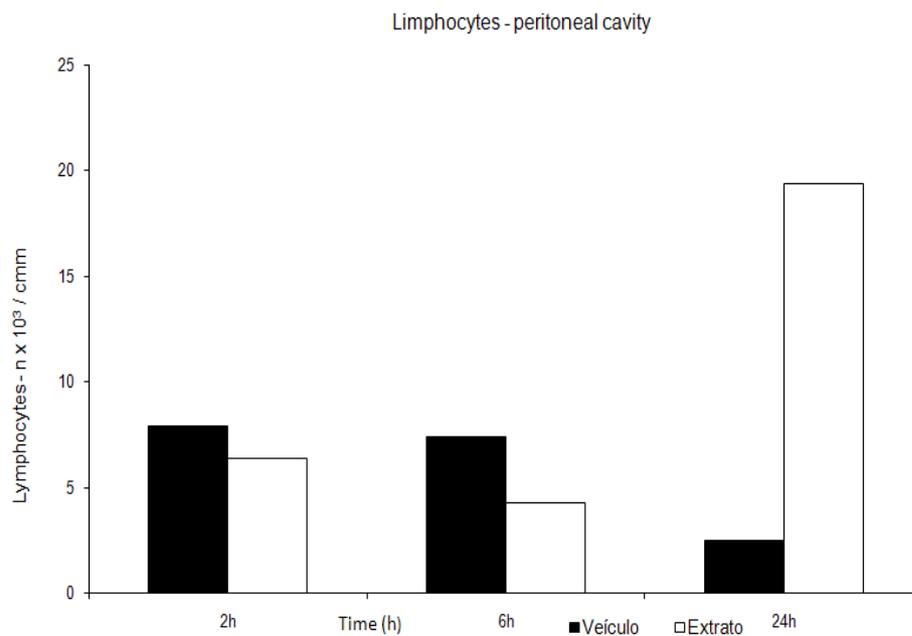
Graphic 2 - Leukocytes migration to Peritoneal Cavity. Given 300mg/kg doses of extract of *Cissus sicyoides* by I.P. injection. Referential values (4-12)



Graphic 3 - Lymphocytes migration to peripheral blood. Given 300mg/kg doses of extract of *Cissus sicyoides* by I.P. injection. Referential values (3-9).



Graphic 4 - Lymphocytes migration to peritoneal cavity. Given 300mg/kg doses of extract of *Cissus sicyoides* by I.P. injection. Referential values (3-9).



ANEXO

6.

ANEXOS

**(Resultados, Discussão e Conclusões – Versão
Português)**

1. RESULTADOS:

1.1 Atividade citotóxica

O extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* não demonstrou atividade citotóxica nas concentrações testadas, tendo apresentado $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$. Segundo o protocolo de Geran 1972 extratos brutos de plantas só devem ser considerados ativos quando a $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$.

1.2 Atividade Antitumoral:

O extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* apresentou inibição no crescimento tumoral no Sarcoma -180 de 48,7 e 62% para as doses de 300 e 600mg/kg respectivamente quando comparado aos tumores do grupo controle (tabela 1). Em relação ao Carcinoma de Ehrlich a inibição tumoral foi de 69,0 e 84,4% respectivamente (tabela 2). Considerando a variação de peso dos animais, foram observadas diferenças significativas no peso dos animais pertencentes ao grupo tratado do Carcinoma de Ehrlich na dose de 300mg/kg. Foram considerados significativos os resultados cujos tumores apresentaram inibição do crescimento acima de 40% segundo o protocolo de Geran (1972). Neste estudo não foi observada melhora da atividade antitumoral pelo uso do Imunoglucan®, quando realizado o tratamento do extrato em associação com o imunoestimulador (tabelas 3 e 4). O Imunoglucan® pareceu ainda interferir na atividade direta do extrato uma vez que, quando feito o tratamento apenas com o extrato hidroalcoólico foi verificada a existência da atividade antitumoral. Em relação aos pesos dos animais dos grupos controle e tratado frente ao Sarcoma 180 não foram observadas diferenças significantes. Os animais pré-estimulados apresentaram sinais de toxicidade nos grupos que foram pré-tratados com o Imunoglucan®, esses sinais compreenderam agitação, piloereção ao longo do tratamento e estiramento das patas traseiras após a administração da dose.

1.3 Avaliação do recrutamento de células

O extrato Hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* não alterou o número de leucócitos totais no sangue periférico estando dentro dos valores de referência 8 (4-12) em nenhum dos tempos estudados, em comparação aos animais injetados apenas com o veículo (gráfico 1). Em relação aos leucócitos totais na cavidade peritoneal (gráfico 2), o extrato apresentou um intenso efeito quimiotático nas 24 horas, visto que existiu uma maior quantidade destas células no grupo que recebeu o extrato em relação ao que recebeu o veículo (figuras 1 e 2). Analisando o tempo de 6 horas após a injeção, foi notado que a quantidade de leucócitos entre os grupos tratados com extrato e o grupo controle não sofreram alterações. Ao analisar o número de linfócitos (importantes na defesa contra tumores), foi observado que nas 24 horas o extrato levou a uma linfocitopenia no sangue periférico (gráfico 3). Do contrário, a análise do lavado peritoneal (gráfico 4) mostrou que houve uma significativa quantidade de linfócitos devido à presença do extrato nas 24 horas, quando comparado ao veículo (figuras 3 e 4). Estes resultados sugerem que a linfocitopenia observada no sangue periférico refletiu a migração destas células para a cavidade peritoneal.

Tabela 1

Atividade antitumoral *Cissus sicyoides* (Sarcoma 180)

Grupos	Peso animais (g) \pm SD	Peso tumores (g) \pm SD	Inibição (%)
Controle (NaCl 0,9%).	33.1 \pm 0.44	1.97 \pm 0.21	-
Tratado (300mg/kg)	33.8 \pm 0.32	1.01 \pm 0.08**	48,7
Tratado (600mg/kg)	35, 9 \pm 0.21	0,75 \pm 0.05**	62,0

dose utilizada 300mg/kg por via intraperitoneal.

** P<0,01

Tabela 2

Atividade antitumoral de *Cissus sicyoides* (Carcinoma de Ehrlich).

Grupos	Peso animais (g) \pm SD	Peso tumores (g) \pm SD	Inibição (%)
Controle (NaCl 0,9%)	36.5 \pm 0.96	2.09 \pm 0.24	-
Tratado (300mg/kg)	32.6 \pm 0.71*	0,65 \pm 0.07**	69,0
Tratado (600mg/kg)	35,6 \pm 0,79	0,32 \pm 0.05**	84,4

dose utilizada 300mg/kg por via intraperitoneal.

*P<0,05

**P<0,01

Tabela 3

Atividade antitumoral de *Cissus sicyoides* com Imunoglucan (Sarcoma 180).

Grupos	Peso animais(g) \pm SD	Peso tumores(g) \pm SD	Inibição (%)
Controle ^a	35.4 \pm 3.4	1.69 \pm 0.15	42
Imun. + Trat. ^b	31.1 \pm 3.1	0.98 \pm 0.13**	<40
Imun. + Sal. ^c	32.3 \pm 1.48	1.45 \pm 0.09 ^c	<40

Dose utilizada 300mg/kg por via intraperitoneal.

a Salina

b Pré-estimulados e tratados com extrato de *Cissu sicyoides*.

c Pré-estimulados e tratados com salina

*P<0,05

**P<0,01

Tabela 4Atividade antitumoral de *Cissus sicyoides* com Imunoglucan (Carcinoma de Ehrlich).

Grupos	Peso animais(g) \pm SD	Peso tumores (g) \pm SD	Inibição (%)
Controle^a	34.8 \pm 1.0	1.28 \pm 0.19	<40
Imun. + Trat.^b	34.7 \pm 1.13	1.03 \pm 0.03	<40
Imun. + Sal.^c	33.0 \pm 0.88	0.96 \pm 0.03	<40

Dose utilizada 300mg/kg por via intraperitoneal.

a Salina

b Pré estimulados e tratados com extrato de *Cissu sicyoides*.

c Pré estimulados e tratados com salina

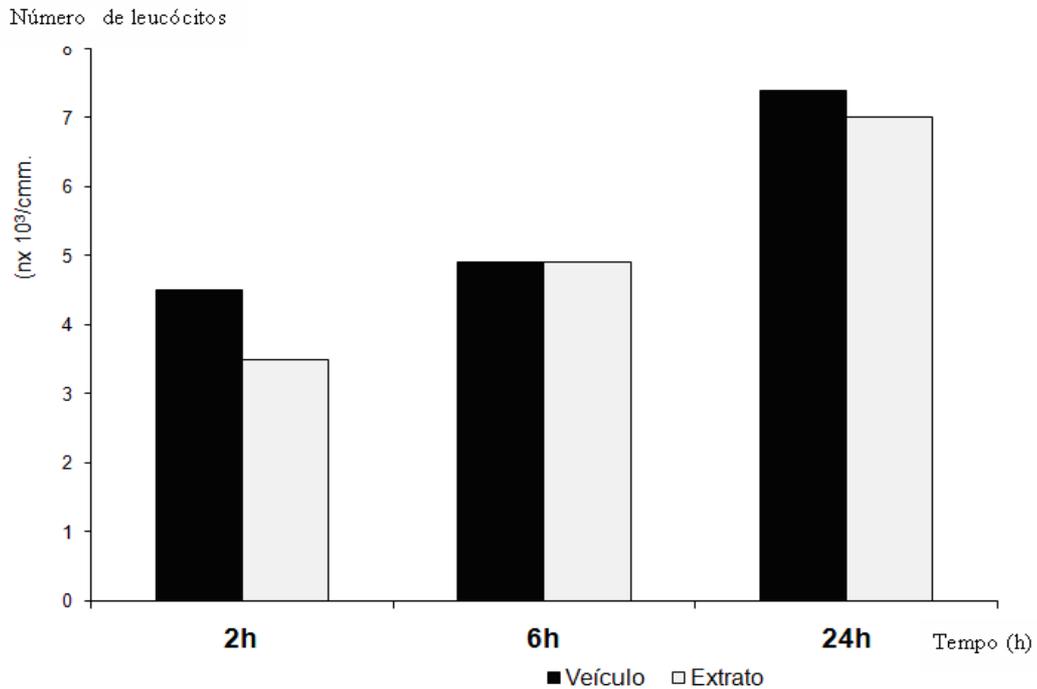
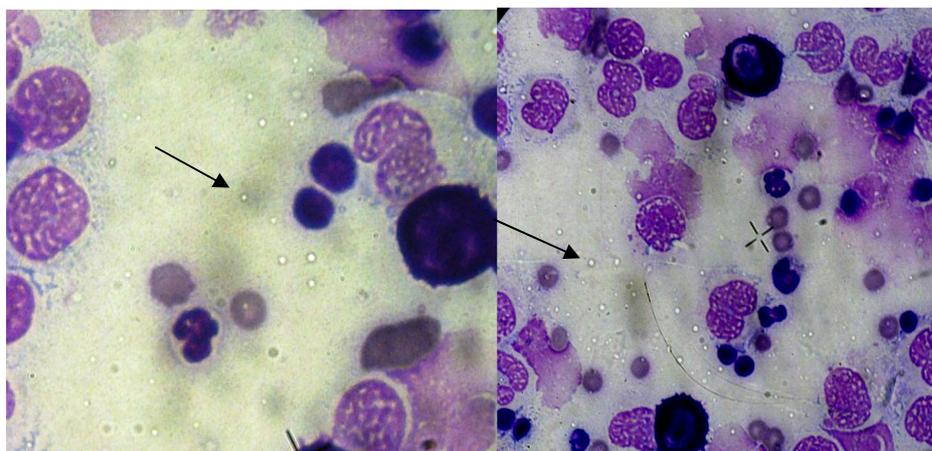
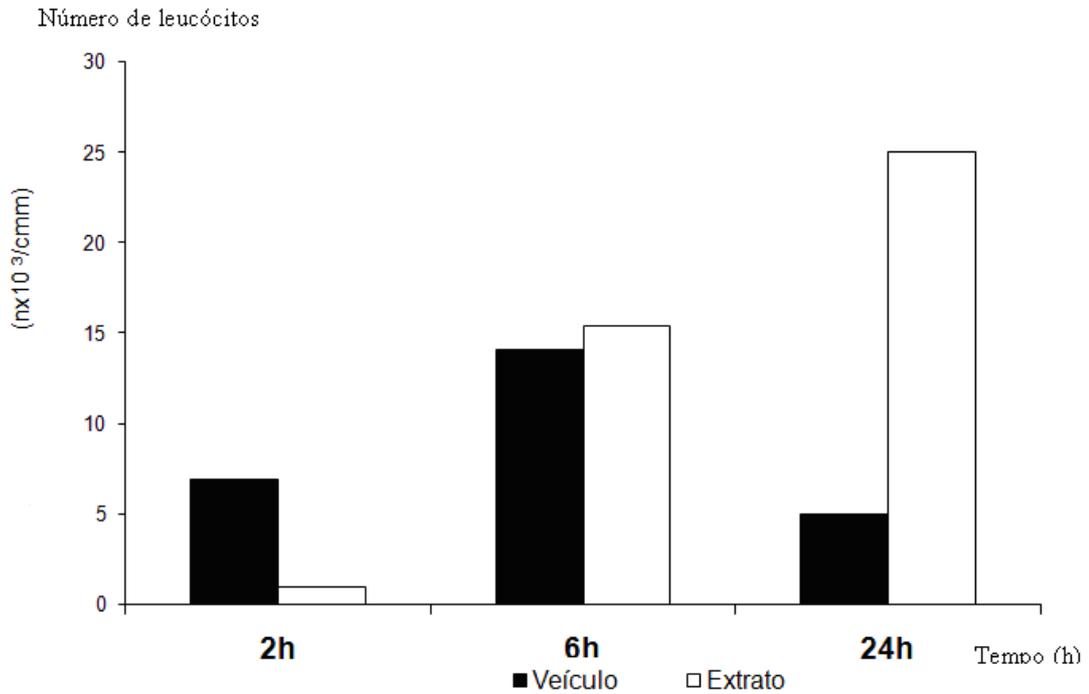
Gráfico 1 Migração de Leucócitos totais para o Sangue periférico. Dose: 300mg/kg extrato de *Cissus sicyoides* I.P. Valor Referencial (4-12)

Gráfico 2 Migração de Leucócitos totais para a Cavidade Peritoneal. Dose: 300mg/kg extrato de *Cissus sicyoides* I.P. Valor Referencial (4-12).



(A) Veículo

(B) Tratado

Figura 2- Mostra quantidade de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos pertencentes ao grupo Veículo x Tratado (300mg/kg *C. sicyoides*) 1000xM.O. Tempo 24 horas

Gráfico 3 Migração de Linfócitos para o sangue Periférico. Dose: 300mg/kg extrato de *Cissus sicyoides* por I.P. Valor Referencial (3-9).

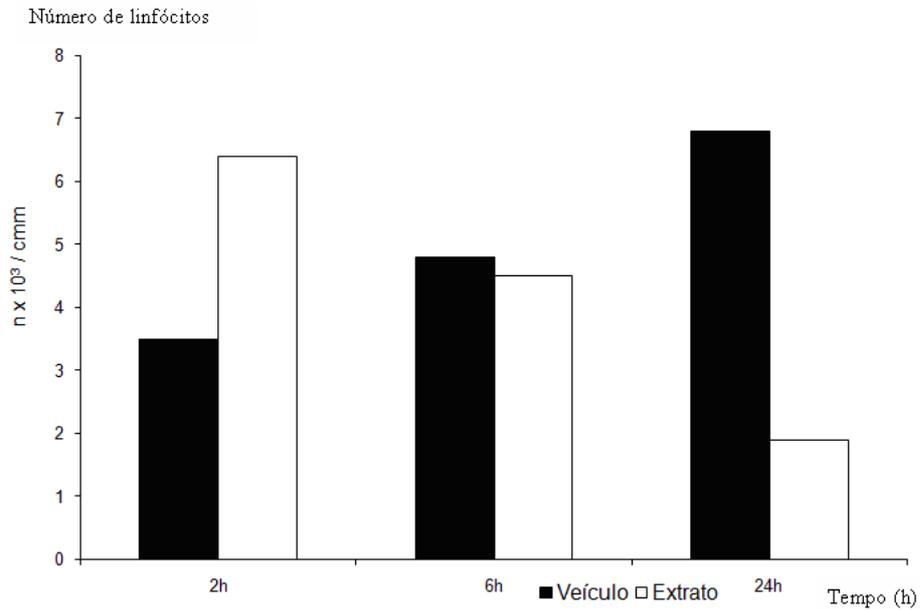
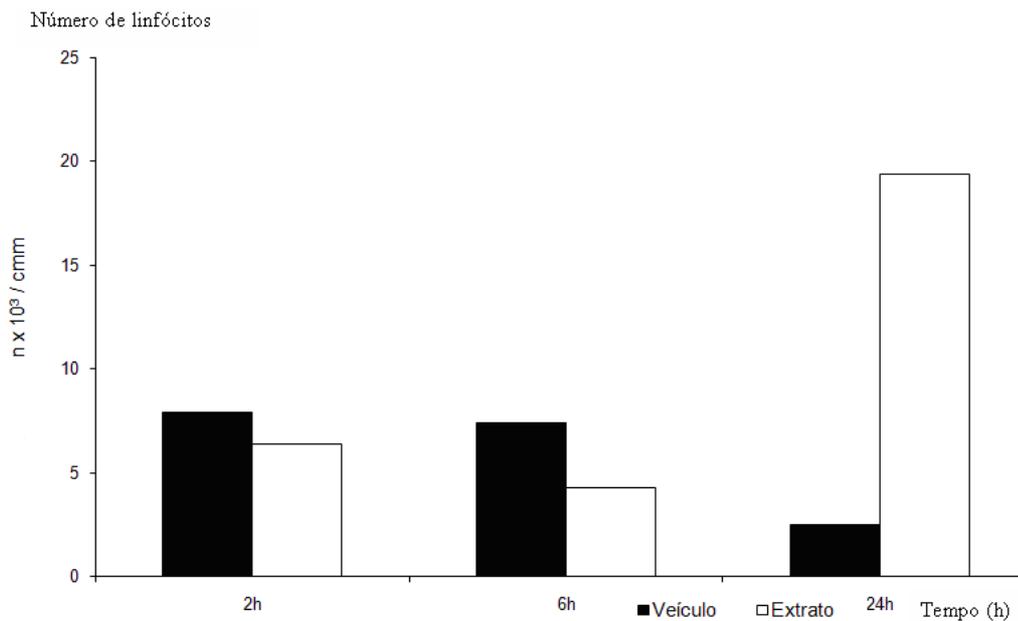


Gráfico 4 Migração de Linfócitos para a Cavidade Peritoneal. Dose: 300mg/kg extrato de *Cissus sicyoides* por I.P. Valor Referencial (3-9).



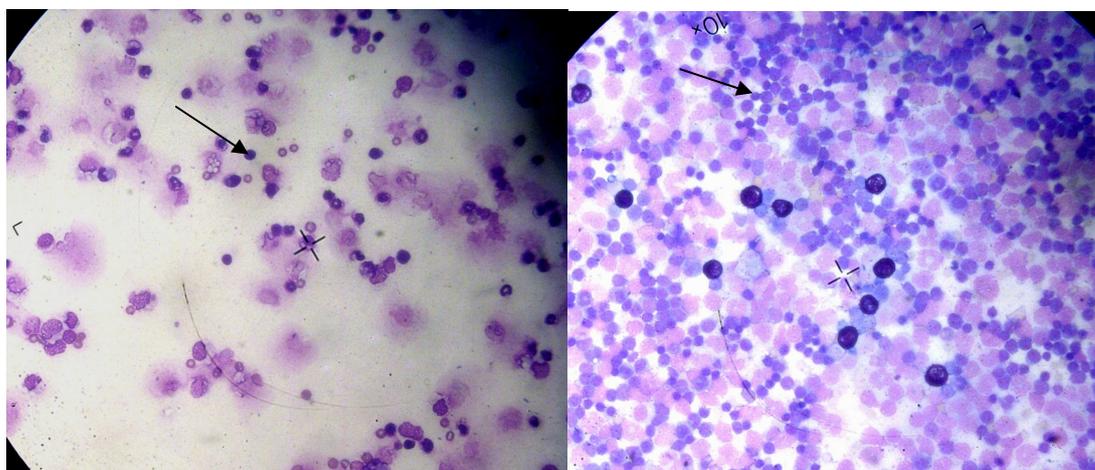
**(A) Veiculo****(B) Tratado**

Figura 2 - Mostra quantidade de linfócitos na cavidade peritoneal de camundongos pertencentes ao grupo Veiculo x Tratado (300mg/kg *C. sicyoides*) 400x M.O. Tempo 24 horas

2. Discussão

Diante das várias propriedades medicinais atribuídas as plantas e a gama de variedades encontradas em países tropicais, dentre eles o Brasil, inúmeras são as pesquisas que objetivam a identificação de princípios ativos eficazes contra o câncer. Em 1960, o National Cancer Institute, iniciou um *screening* biológico para extratos de uma grande variedade de recursos naturais (COSTA, 2002). Desde então várias são as pesquisas que visam encontrar substâncias ativas contra o câncer.

Várias são as indicações de usos medicinais de *Cissus sicyoides* pela população sendo, muitas destas indicações confirmadas através de metodologias reconhecidas pela literatura científica internacional, uma vez que, a mesma também é usada como anticarcinogênica no tratamento de câncer de vesícula biliar (QUÍLEZ., et al., 1996), foi verificado no estudo proposto que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* não demonstrou atividade citotóxica nas concentrações e linhagens testadas.

Entretanto, quando realizada a atividade antitumoral *in vivo* foi verificado que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* apresentou inibição da atividade tumoral para o Sarcoma 180 de 48,7 e 62% para as doses de 300 e 600mg/kg de peso respectivamente. Em relação ao Carcinoma de Ehrlich as inibições foram de 69 e 84,4% para as doses anteriormente citadas, demonstrando que tal atividade pode estar relacionada com a metabolização dos compostos ativos em metabólitos secundários, metabolização esta impossível de ser observada *in vitro* uma vez que, na cultura *in vitro* não existem reações metabólicas como em um organismo vivo que expõem a substância testada a uma gama de reações com hormônios e enzimas que são capazes de influenciar diretamente na função das substâncias testadas no organismo.

Esta atividade antitumoral pode estar relacionada também à presença de substâncias que possuem atividade antitumoral, dentre elas: o sitosterol, que é apontado por induzir a apoptose em conjunto com o TNF- α (PARK et al ., 2007), e o hidroxistilbene resveratrol que tem efeitos pleiotrópicos, alterando diversas vias de sinalização como o fator nuclear- κ B, gene p53 e proteínas quinases, levando à supressão da proliferação celular do tumor, da aderência, poder invasivo e de gerar metástases, reduzindo sinais de inflamação e angiogênese, e promovendo a indução de apoptose e diferenciação (BHARAT et al., 2004).

O Imunoglucan® é uma glucana insolúvel em água, com peso molecular em torno de 6.500 Da (HASSID et al., 1941) é constituído por moléculas de glicopirranose (glicose) unidas

por ligações β – glicosídicas entre os carbonos 1 e 3. Esta molécula não apresenta ramificações laterais sendo, portanto uma longa cadeia de unidades de glicose (HEBRON, 2005). Extraída da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, segundo a literatura os polissacarídeos extraídos de fungos têm sido investigados por apresentarem uma variedade de respostas biológicas de defesa tais como: atividade antitumoral, antiinflamatória e imunomoduladora (WASSER, 2002). Essas atividades, porém, estão extremamente ligadas às características químicas, físicas e estruturais de cada polímero, como massa molecular (número de unidades por molécula), configuração anomérica (α ou β), conformação (linear, ramificada, helicoidal, agregação entre cadeias), presença de grupamentos carboxilas dentre outros, e ainda tipo e grau de substituição dos monômeros, posições das ligações glicosídicas etc. sendo desta forma a caracterização química dos polímeros necessária para o direcionamento das suas aplicações biológicas (MACEDO et al., 2002).

No presente estudo não foi observado uma melhor resposta em relação à atividade antitumoral pelo uso do Imunoglucan®, quando realizado o tratamento do extrato em associação com o imunoestimulador.

Vários fatores devem ser levados em consideração como os citados anteriormente em relação à estrutura química dos polímeros, exemplo disto é que Zhang et al (2000) relataram que a lentinana, uma glucana β -(1-3) com ramificação em C-6, somente apresentou atividade antitumoral após ter sido hidrolisada parcialmente para a obtenção de um polímero menor ($1,6 \times 10^4$ Daltons) enquanto que a esquizofilana e grifolana apresentaram atividade antitumoral apenas com massas moleculares superiores a 1×10^4 Daltons.)

(BORCHES et al., 1999). Portanto verifica-se que a massa molecular, conformação e a modificação química dos polissacarídeos afetam as ações antitumoral e imunomodulatória. (SCHMID et al., 2001).

Estudos posteriores são necessários para uma melhor elucidação da atividade imunoestimuladora do Imunoglucan®, outros estudos se fazem necessários no tocante à utilização de novos esquemas posológicos uma vez que, os sinais de toxicidade apresentados pelos animais, bem como o bloqueio da atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico de *C. sicyoides* podem ser indicativos de uma hiperestimulação do sistema imune (GOODMAN, 1992), ainda devem ser levadas em consideração propostas de modificações da estrutura secundária do polissacarídeo objetivando a interpretação bem sucedida da atividade biológica já que as atividades podem estar diretamente relacionadas com a estrutura química das moléculas (SCHMID et al., 2001).

Estudos que pudessem oferecer maiores informações a cerca da atividade antitumoral apresentada pelo extrato hidroalcoólico de *C. sicyoides* foram realizados e foi verificado que o extrato hidroalcoólico de *C. sicyoides* teve um forte efeito quimiotático no tempo de 24 horas, uma vez que se verificou uma maior quantidade de leucócitos totais no grupo que recebeu o extrato em relação aos que receberam salina. Considerando o número de linfócitos, observou-se que no tempo 24 horas o extrato levou a uma linfocitopenia no sangue periférico, porém, a análise da cavidade peritoneal mostrou que houve uma migração significativa de linfócitos para a cavidade peritoneal.

Estes resultados sugerem que a linfocitopenia observada refletiu a migração destas células para a cavidade peritoneal. É sabido que o processo inflamatório pode ter como consequência a angiogênese do tecido cicatrizado/reparado, facilitando as metástases, por outro lado, a estimulação do influxo leucocitário torna-se importante na defesa contra o tumor, pela atração de células linfóides citotóxicas (BAUMANN; GAULDIE, 1994).

Neste estudo, foi observado que o extrato Hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* foi capaz de atrair linfócitos para o local da sua aplicação. Sabendo que entre a linhagem linfóide se encontram as células especializadas na morte de tumores linfócitos citotóxicos (CD8+) e células que liberam citosinas linfócitos T helper (CD4+) (FERREIRA et al., 2001), estes resultados demonstraram o potencial antitumoral do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* através estimulação/ atração de células linfóides para o local estimulado sugerindo que a atividade antitumoral apresentada pelo extrato pode está intimamente relacionada com a ativação da linhagem linfóide .

3. Conclusões

1. O extrato hidroalcoólico de *Cissus sicyoides* não apresentou atividade citotóxica frente às linhagens tumorais HEP-2 , KB e NCI- H292.
2. O extrato de *Cissus sicyoides* apresentou atividade antitumoral *in vivo* para o Sarcoma 180 de 48,7 e 62 % e Carcinoma de Ehrlich de 69 e 84,4% nas doses de 300 e 600mg/kg de peso respectivamente.
3. Os animais pré – estimulados com Imunoglucan® apresentaram sinais de toxicidade como agitação, piloereção ao longo do tratamento e estiramento das patas traseiras após a administração da dose.
4. A atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico de *Cissus sicyoides* não foi potencializada pelo uso do Imunoglucan®
5. O extrato hidroalcoólico de *Cissus sicyoides* apresentou efeito quimiotático, pois foi observada a atração de linfócitos para o local da sua aplicação.
6. Estes resultados demonstraram o potencial antitumoral do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* através estimulação/ atração de células linfóides, para o local estimulado sugerindo que a atividade antitumoral apresentada pelo extrato pode está intimamente relacionada com a ativação da linhagem linfóide .