



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

EDUARDO MIRANDA BRANDÃO

EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO EXTRATO AQUOSO
DO *PLECTRANTHUS AMBOINICUS* NA FORMA ASCÍTICA
DO CARCINOMA DE EHRLICH

RECIFE
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

EDUARDO MIRANDA BRANDÃO

**EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO EXTRATO AQUOSO
DO *PLECTRANTHUS AMBOINICUS* NA FORMA ASCÍTICA
DO CARCINOMA DE EHRlich**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor.

Orientador
Prof. Dr. Claudio Moura Lacerda

Orientadora Externa
Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza

RECIFE
2012

Catálogo na Publicação
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B817e Brandão, Eduardo Miranda.
Efeito antineoplásico do extrato aquoso do *Plectranthus amboinicus* na forma ascítica do carcinoma de Ehrlich / Eduardo Miranda Brandão. – Recife: O autor, 2012.
118 folhas : il. ; tab.; quadr.; 30 cm.

Orientador: Drº. Claudio Moura Lacerda.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, 2012.
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Carcinomatose. 2. *Plectranthus amboinicus*. 3. Carcinoma de Ehrlich ascítico. 4. Extrato aquoso de *Plectranthus amboinicus*. 5. Carcinomatose peritoneal. I. Lacerda, Claudio Moura (Orientador). II. Título.

617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-222)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIRETOR SUPERINTENDENTE**

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fábio de Oliveira Vilar

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

"EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO EXTRATO AQUOSO DO PLECTRANTHUS
AMBOINICUS NA FORMA ASCÍTICA DO CARCINOMA DE ERHLICH"

EDUARDO MIRANDA BRANDÃO

APROVADA EM: 28/03/2012

ORIENTADOR INTERNO: CLAUDIO MOURA LACERDA

COMISSÃO EXAMINADORA,

Prof. Dr. CARLOS TEIXEIRA BRANDT - CCS/UFPE

Prof. Dr. - SALVADOR VILAR CORREIA LIMA - CCS/UFPE

Prof. Dr. MAGDALA DE ARAUJO NOVAES - CCS/UFPE

Prof. Dr. JOSÉ GUIDO CORRÊA DE ARAUJO JÚNIOR - CCS/UFPE

Prof. Dr. LUIZ EDUARDO CORREIA MIRANDA - UPE

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com:

Referencias: adaptado do International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver). Disponível no endereço eletrônico [HTTP://www.icmje.org](http://www.icmje.org).

Universidade Federal de Pernambuco. Serviço de Biblioteca e Documentação. Estrutura de apresentação de dissertação de teses, sob a forma de artigos científicos, conforme “Proposta dos Programas de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde(CCS), da Universidade Federal de Pernambuco “. Recife: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

DEDICATÓRIA

*A Rosana, minha esposa, bússola e porto seguro
nessa nossa longa jornada.*

*A Pedro, Paulo e Maria, filhos, que representam o
que de melhor pude fazer e que são minhas
maiores recompensas.*

*A Lourdinha Miranda, autora de meus dias, pelo
seu amparo silencioso, fervoroso e permanente.*

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Claudio Moura Lacerda*, pelo incentivo e motivação para realização deste trabalho e pelo exemplo de liderança como Chefe de Serviço e Professor de Cirurgia.

À *Profa. Ivone Antonia de Souza*, pela sua completa colaboração, elevado espírito científico e pela obstinada e silenciosa dedicação.

Ao *Prof. Carlos Brandt*, pelo estímulo e permanente e valiosa contribuição.

À *Profa. Daisy Lima*, pelo empenho e sempre pronta disponibilidade na análise citológica do material e por ter permitido a utilização do seu laboratório, o Centro Integrado de Colposcopia e Colpocitologia (CICC)

Ao *Prof. Márcio Melo*, pela orientação dedicada, qualificada disponibilidade na análise dos aspectos citométricos e por ter franqueado a estrutura do Setor de Hematologia do Laboratório Marcelo Magalhães.

À *Dra. Ana Paola Almeida Diniz Gurgel*, empenhada pesquisadora que iniciou os estudos sobre o tema desse trabalho em nosso meio, na UFPE, e pela valiosa contribuição de sua Tese.

Ao *Dr Thales Paulo Batista*, pela valiosa contribuição na revisão do texto e sugestões.

Ao *Dr Leonardo Severiano de Albuquerque*, mestrando em Química da UFRPE por sua louvável colaboração durante a fase de experimentação.

À *Dra Daniele Sá* mestranda em Farmácia da UFPE, por sua contribuição decisiva durante a execução do experimento.

À *Dra Camila Sarchesti*, pela judiciosa e pertinente análise estatística.

À *Rosa Germano, Assistente Social*, pela sempre pronta e valiosa colaboração em todos os momentos.

À *Simone Antonia da Silva*, pela valiosa colaboração e interesse na digitação e correção dos textos.

À *Jacqueline Germano*, pela colaboração dedicada e eficiente na coleta dos dados.

À professora *Tereza Laranjeiras*, pela revisão bibliográfica minuciosa e eficiente.

À *Natália Guedes Barbosa* pela revisão final e formatação, feitas com empenho e profissionalismo.

“São as aulas os seminários das riquezas mais preciosas que pode ter qualquer Estado. São a mina mais rica e certa donde se extraem os homens grandes, sem a qual não podem subsistir os Impérios, as Monarquias, as Repúblicas; sem ela vacila a Igreja, os Estados perigam, a Justiça deserta, a desordem, a iniquidade campeiam; mais serviços faz uma pena à sociedade um dia que milhares de espadas em muitos anos (...) as luzes que ilustram as Nações, iluminam os Povos, as Ciências e as Artes com que o mundo se governa devem-se às Letras”

Luis dos Santos Vilhena. Carta XII, 1921¹

“... não há enfermidade contra a qual não haja ervas em esta terra, nem os índios naturais dela têm outra botica ou usam de outras medicinas”.

Frei Vicente do Salvador, século XVI²

RESUMO

A carcinomatose peritoneal é um tema relevante, estimando-se aproximadamente 46.000 casos novos por ano nos EUA e, em 2012, 17.700 casos novos no Brasil. Foi ressaltada a necessidade de estudos experimentais e novas abordagens com uso de quimioterápicos e agentes biológicos. A Peritonectomia com Quimioterapia Hipertérmica Intraperitoneal e Citoredução (HIPEC) tem sido usada como recurso de tratamento atual. O Brasil tem a maior biodiversidade do planeta e o Departamento de Antibióticos (DA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) acumula considerável experiência científica com o uso experimental de derivados de plantas no tratamento de tumores. A partir de estudo experimental prévio do DA, quando se avaliou o efeito antineoplásico do Extrato Alcoólico da planta *Plectranthus amboinicus* (Pa), foi feito o presente estudo em camundongos Albinos Suíços da espécie *Mus Musculus*, nos quais foi realizada indução da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich (CEA) a partir da injeção intraperitoneal (ip). O experimento compreendeu um grupo tratado de 6 animais (G1) e outro controle (G2) de igual número avaliados num período de 9 dias. No dia 1 (D1) foi feita a injeção ip, em G1 e G2, de 0,3 ml de líquido ascítico com CEA. A partir desta data foi feita avaliação de parâmetros clínicos, como peso, piloereção, mobilidade e medições abdominais longitudinais e transversas. Do D3 até o D9 foi feita injeção diária ip de 200 mg/kg de Extrato Aquoso de Pa (EAPa) no G1. No G2 foi feita, no mesmo período, injeção ip de 0,5 ml de solução fisiológica a 0,9%. No D9 os animais foram sacrificados e analisados: volume da ascite, presença de implante tumoral na parede abdominal, aspecto da ascite. Foram encaminhadas amostras, de G1 e G2, para estudo citométrico e citomorfológico. Foram avaliados na citometria o número de leucócitos totais, mononucleares e polimorfonucleares, além da contagem das células de CEA. Na citologia foram avaliados aumento do volume nuclear, hiper Cromasia, alterações da relação núcleo-citoplasma, irregularidades do contorno nuclear, cromatina com distribuição irregular, nucléolos anormais ou múltiplos e mitoses atípicas. Observou-se aumento significativo de peso no G2, que todos os animais do G1 apresentaram piloereção e a mobilidade foi igual em G1 e G2. Constatado maior medição abdominal transversal no G2. Foi observado significativo menor volume de ascite no G1 e que 66% dos animais do G2 tiveram implantes tumorais na parede abdominal contra nenhum no G1. Foi observado um maior número de leucócitos e de células tumorais no G2. Os aspectos citomorfológicos foram iguais em ambos os grupos. Conclui-se que o EAPa promoveu menor aumento do peso dos animais, toxicidade tolerável, e não causou alterações da mobilidade. No G1 houve menor aumento de uma medição abdominal e não houve implantes na parede abdominal. Também constatou-se que o EAPa promoveu melhor controle da ascite e menor contagem de celular tumorais no líquido ascítico. Não houve diferenças citomorfológicas entre os dois grupos. Conclui-se que o EAPa produz efeito antineoplásico na forma ascítica do carcinoma de Ehrlich.

Palavras-chave: Carcinomatose peritoneal. *Plectranthus amboinicus* (Pa). Carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA). Extrato Aquoso de *Plectranthus amboinicus* (EAPa).

ABSTRACT

Peritoneal carcinomatosis is a major public health issue, with an estimated 46,000 new cases per year in the U.S. and an expected 17,700 new cases in Brazil in 2012. Emphasis has been laid on the need for experimental studies and new approaches with the use of chemotherapy and biological agents. The peritonectomy procedure with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and cytoreduction (HIPEC) is currently being used in treatment. Brazil has the greatest biodiversity on the planet and the Department of Antibiotics (DA) of the Federal University of Pernambuco (UFPE) has acquired considerable scientific experience with the experimental use of plant derivatives in the treatment of tumors. From a previous experimental study in the DA, when we evaluated the antineoplastic effect of alcoholic extract of the plant *Plectranthus amboinicus* (Pa), the present study was conducted in Albino Swiss mice of the *Mus musculus* species, who were submitted to the induction of the the ascitic form of Ehrlich carcinoma (EAC) by intraperitoneal (ip) injection. The experiment comprised a group of 6 treated animals (G1) and a control group (G2) of six untreated ones, evaluated over a period of 9 days. On day 1 (D1) an ip injection of 0.3 ml of ascitic fluid with EAC was made in both G1 and G2. From this date an assessment was made of clinical parameters such as weight, piloerection, and mobility and measurements were taken of the longitudinal and transverse abdominal diameters. From D3 to D9 a daily ip injection of 200 mg / kg of aqueous extract Pa (AEPa) was given in G1. During the same period G2 received an ip injection of 0.5 ml of 0.9% saline solution. On D9 the animals were sacrificed and an analysis made of the volume of ascites, the presence of tumor implantation in the abdominal wall and the appearance of the ascites. Samples from both groups were sent for cytometry and cytomorphology studies. Cytometry evaluated the total leukocyte count, including the percentages of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes, and the Erlich cell count. Cytology evaluated the increase in nuclear volume, hyperchromasia, changes in the nucleus-cytoplasm ratio, nuclear contour irregularity, uneven distribution of chromatin, abnormal or multiple nucleoli and atypical mitoses. There was a significant weight increase in G2. All G1 animals showed piloerection, and mobility was similar in G1 and G2. A greater transverse abdominal diameter was noted in G2. A significantly lower volume of ascites was observed in G1, and 66% of the G2 animals had tumor implants in the abdominal wall as against none in G1. Cytometry revealed a greater number of leukocytes and tumor cells in G2. The cytomorphological features were the same in the two groups. It is concluded that the AEPa resulted in a lower weight gain in the animals, tolerable toxicity and no changes in mobility. In G1 there was a smaller increase in abdominal diameter and there were no implants in the abdominal wall. It was also found that the AEPa produced a better control of ascites and a lower tumor cell count in the ascitic fluid. There were no cytomorphological differences between the two groups. It is concluded also the AEPa produced antineoplastic effect in ascitic form of Ehrlich carcinoma .

Keywords: Peritoneal carcinomatosis. *Plectranthus amboinicus* (Pa). Ehrlich ascites carcinoma (CEA). Aqueous extract of *Plectranthus amboinicus* (AEPa).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Peritoneal Cancer Index (PCI) ¹¹	9
Figura 2 <i>Plectranthus amboinicus</i> “ <i>in natura</i> ” (Fonte: Montanari ⁷⁶)	60
Figura 3 Implante na parede abdominal (G2)	76
Figura 4 Citologia cels Carcinoma de Ehrlich G1-F-(Tratado)	78
Figura 5 Citologia cels Carcinoma de Ehrlich G2-F (Controle)	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dose de EAPA 200mg/kg (G1) e solução salina 0,5ml (G2) - 7 dias (D3 a D9)	67
Tabela 2	Peso inicial dos animais	67
Tabela 3	Peso dos animais (g) do Dia 1 ao Dia 9 (D1-D9)	68
Tabela 4	Estatísticas descritivas dos pesos dos animais segundo grupos, do primeiro ao nono dia.	68
Tabela 5	Medição abdominal transversa/longitudinal (T/L) em mm dos grupos	70
Tabela 6	Estatísticas descritivas da medição abdominal transversa (mm) segundo o grupo - do primeiro ao nono dia (D1-D9).....	71
Tabela 7	Estatísticas descritivas da Medição Abdominal Longitudinal (mm) segundo o grupo - do primeiro ao nono dia (D1-D9).....	72
Tabela 8	Parâmetro clínico piloereção dos grupos G1 e G2	73
Tabela 9	Parâmetro clínico mobilidade dos grupos G1 e G2	73
Tabela 10	Volume da ascite (ml)	74
Tabela 11	Estatísticas descritivas do Volume da Ascite (ml) segundo os grupos	74
Tabela 12	Aspecto da ascite	75
Tabela 13	Implante tumoral na parede abdominal - Ausente (A) / Presente (P)	75
Tabela 14	Distribuição de frequência dos grupos segundo o Implante tumoral na parede abdominal	75
Tabela 15	Líquido ascítico - Aspectos citométricos	76
Tabela 16	Estatísticas descritivas dos aspectos citométricos segundo grupo.....	77
Tabela 17	Líquido ascítico - Aspectos citomorfológicos	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FU	5 Fluoro-uracil
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
CBDCA	Carboplatina
CDDP	Cisplatina
CEA	Carcinoma de Ehrlich ascítico
DA	Departamento de Antibióticos da UFPE
EAPa	<i>Extrato Aquoso Plectranthus amboinicus</i>
HIPEC	<i>Hipertermic Peritonectomy and Intraperitoneal Chemotherapy</i>
Ip	Intraperitoneal
Iv	Intravenoso
OHP	Oxalapatina
Pa	<i>Plectranthus amboinicus</i>
PCI	Peritoneal cancer index
PET-CT	<i>Positron Emission Tomography and Computed Tomography</i>
PIXE	<i>Proton-induced X-ray emission</i>
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNIONCO	Clínica Unidade de Cirurgia e Oncologia

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Peso dos animais G1-G2 / D1 a D9.....	69
Gráfico 2 - Box-Plot comparativo do volume da ascite entre os grupos.....	74
Gráfico 3 - Box-Plot comparativo da contagem de células do carcinoma de Ehrlich entre os grupos.....	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICATIVA	2
1.3 OBJETIVOS.....	3
1.3.1 Geral	3
1.3.2 Específicos.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 CARCINOMATOSE PERITONEAL	4
2.1.1 Importância epidemiológica	4
2.1.2 Mudança nos paradigmas de tratamento	4
2.1.3 Padrão de disseminação regional.....	5
2.1.4 Modelos de classificação	8
2.1.5 Tratamento	10
2.1.5.1 Ressecção cirúrgica.....	10
2.1.5.2 Quimioterapia intraperitoneal.....	13
2.1.5.3 Hipertermia intraperitoneal.....	15
2.1.5.4 Cirurgia citoredutora associada à quimioterapia intraperitoneal hipertérmica	16
2.1.5.5 Outras terapias antineoplásicas intraperitoneais.....	17
2.1.6 Palição	18
2.1.7 Modelos de indução de tumores peritoneais em animais e quimioterapia intraperitoneal	19
2.1.8 Uso de vegetais e seus derivados como agente terapêutico em humanos.....	37
2.1.9 Políticas mundiais e brasileiras para uso de fitoterápicos	38
2.1.10 Uso de fitoterápicos no tratamento das neoplasias	41
2.1.11 Uso experimental de fitoterápicos no tratamento da carcinomatose peritoneal	45
2.1.12 Carcinoma de Ehrlich	57

2.1.13 Plectranthus Amboinicus	59
2.1.13.1 Aspectos botânicos	60
2.1.13.2 Aspectos químicos	61
3 MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1 Casuística e local do estudo	62
3.2 Delineamento do estudo	62
3.3 Seleção	62
3.3.1 Caracterização da amostra	62
3.4 Variáveis do estudo.....	63
3.5 Procedimentos	63
3.5.1 Procedimentos técnicos	63
3.5.1.1 Preparação do extrato	63
3.5.2 Procedimentos cirúrgicos – primeira intervenção	64
3.5.2.1 Obtenção do carcinoma Ehrlich na forma ascítica	64
3.5.3 Procedimentos experimentais – segunda intervenção.....	64
3.5.3.1 Avaliação citométrica e citológica	65
3.6 Procedimentos analíticos.....	66
3.7 Procedimentos éticos da pesquisa.....	66
4 RESULTADOS	67
4.1 Distribuição do peso dos animais segundo os grupos do 1º ao 9º dia	67
4.2 Distribuição do parâmetro clínico medição abdominal transversa/longitudinal.....	69
4.3 Distribuição dos parâmetros clínicos piloereção e mobilidade dos animais	73
5 DISCUSSÃO	80
6 CONCLUSÕES	90
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE - Artigo da Tese.....	102
ANEXO - Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa.....	112



1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

Carcinomatose peritoneal é uma das fronteiras da moderna Oncologia. Dada a multiplicidade de suas apresentações e diversidade na abordagem terapêutica, ao longo do tempo, foram propostos sistemas de classificação dessa entidade e, paralelamente, novas e desafiantes modalidades terapêuticas. Há um esforço global no sentido de se aprofundarem os estudos farmacológicos no sentido de se identificarem substâncias quimioterápicas e outros agentes biológicos que exerçam efeito máximo sobre a superfície peritoneal e possam promover resposta eficiente nesse território^{1,6}. Dessa forma, no Congresso Internacional Sobre Neoplasias Peritoneais, em 2008, o Prof. Paul Sugarbaker, convocou os pesquisadores ligados a essa atividade em todo o mundo a aprofundarem as pesquisas experimentais sobre diferentes modalidades de tratamento dessa enfermidade⁷.

O Brasil contém a maior biodiversidade do planeta e estão documentados, por centros de pesquisa brasileiros e internacionais, os efeitos de derivados de plantas sobre tumores peritoneais experimentais. O Departamento de Antibióticos da UFPE tem experiência de seis décadas na pesquisa desse tipo de neoplasias^{11,21,100,105,110}.

Os tumores podem ser originados de carcinomas primárias locais e de sítios à distância. Na maioria dos casos o diagnóstico se estabelece a partir de sinais e sintomas vagos e muitas vezes é dado em fases tardias da doença¹².

Essa afecção é uma entidade frequente e, na maioria das vezes fatal, implicando em curtos períodos de sobrevida e intensa morbidade caracterizada por fenômenos oclusivos digestivos de difícil tratamento e palição precária^{4,14}.

No sentido de minorar os sintomas e, eventualmente, curar pacientes com carcinomatose, foram introduzidas técnicas que associam a ressecção cirúrgica máxima dos tumores localizados no peritoneo, muitas vezes associada a ressecções multiviscerais. No entanto, a doença residual macro ou microscópica se situava como empecilho para uma resposta terapêutica adequada^{6,12,17}. Dessa forma, foram

associados à cirurgia o uso de substâncias como quimioterápicos, bem como elementos radioativos, terapia genética, anticorpos monoclonais e derivados de plantas, além de medidas físicas, entre elas a hipertermia, que procuravam expandir os resultados da cirurgia^{5,18,20}.

1.2 JUSTIFICATIVA DA INVESTIGAÇÃO

Há embasamento sobre o uso de derivados de plantas no tratamento das neoplasias, e importantes trabalhos a respeito de seu uso na carcinomatose, produzidos por universidades brasileiras, americanas e europeias, além de centros de pesquisa orientais, os quais estimulam o aprofundamento desse tema^{24,28}.

O Departamento de Antibióticos da UFPE acumulou, ao longo do tempo, considerável experiência no uso de derivados de plantas no tratamento tópico ou sistêmico de neoplasias. A utilização de um derivado da planta *Plectranthus amboinicus* (*Pa*) no controle de tumores experimentais na forma sólida foi demonstrada naquela instituição em estudos prévios^{11,100}.

O interesse específico sobre a forma ascítica do carcinoma de Ehrlich, e a utilização de um derivado bruto do *Pa* sob a forma de extrato aquoso no controle da ascite experimental norteou o estudo atual^{11,100}.

Foi concebido um modelo experimental que contemplasse a utilização de animais portadores da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich e que fossem submetidos a tratamento intraperitoneal com o extrato aquoso do *Pa*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação antineoplásica do extrato aquoso do *Plectranthus amboinicus* (EAPa), utilizado por via intraperitoneal, no tratamento da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich.

1.3.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar parâmetros clínicos de toxicidade do EAPa na ascite neoplásica;
- 2) Avaliar parâmetros biométricos, citométricos e citomorfológicos da ação do EAPa na evolução da ascite neoplásica.



2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMATOSE PERITONEAL

2.1.1 Importância epidemiológica

Estima-se que 10 a 15 % dos 130.000 casos novos anuais de câncer colorretal nos Estados Unidos da América desenvolverão carcinomatose peritoneal em alguma etapa de sua evolução²⁹. Ainda nesse país, 75% dos casos novos de carcinoma de ovário, 50% dos de estômago e 31% dos de apêndice virão a desenvolver disseminação peritoneal da neoplasia¹³. Somados aos 1500 casos novos anuais de tumores primários do peritônio, em sua maioria mesoteliomas, calcula-se que, por ano, acontecerão aproximadamente 46.000 casos de carcinomatose peritoneal, somente nos EUA¹⁴.

No Brasil, estimam-se, para 2012, 30.140 casos novos de câncer colorretal, 20.090 de câncer de estômago e 6.190 casos novos de neoplasias malignas de ovário. Não há referência, nas estatísticas oficiais brasileiras, aos tumores primários do peritônio e às neoplasias do apêndice. Com base nesses dados, confrontados com os percentuais referidos, calcula-se que ocorrerão aproximadamente 17.700 casos de carcinomatose peritoneal nesse período³⁰.

2.1.2 Mudança nos paradigmas de tratamento

Considerando os estigmas relacionados com a mortalidade associada a essa afecção, quase inexorável e ligada a intensa morbidade, foram propostas mudanças dos paradigmas de abordagem dessa doença²⁹. Dessa forma, terapias mais agressivas, incluindo ressecções tumorais extensas e multiviscerais, com inclusão de áreas alargadas do peritônio, associadas ao uso de substâncias intraperitoneais, como agentes quimioterápicos e biológicos, além de medidas físicas, como a hipertermia, passaram a ter lugar no arsenal terapêutico dessa afecção¹⁰⁷.

Assim, o conceito tradicional de que a carcinomatose peritoneal representa uma doença incurável e intratável foi expressivamente modificado ao longo do tempo. Evidências embasadas e cientificamente demonstradas indicaram que a abordagem agressiva da doença peritoneal através da combinação de recursos terapêuticos e associação de modalidades de tratamento podem ter impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, provocando efetiva redução da progressão tumoral e consequente controle dos sintomas^{14,17}. Apesar de ser possível correlacionar diferentes modalidades de carcinomatose peritoneal, o tipo histológico primário determina o manuseio clínico da doença regional bem como a probabilidade e o padrão de recorrência após terapia. Como a maioria das demais neoplasias avançadas, o foco na palição dos sintomas é destacado, essencialmente no que se refere a controle da ascite e da obstrução intestinal. Dessa maneira, é necessário encarar a carcinomatose peritoneal como uma doença com características diferentes do acometimento neoplásico visceral³².

2.1.3 Padrão de disseminação regional

Dada a complexidade e multifatorialidade das diferentes formas de apresentação clínica da carcinomatose peritoneal são necessários métodos de classificação dessa entidade para que se possa estabelecer uma rotina de abordagem diagnóstica e terapêutica dessa doença. Assim, foram estabelecidos critérios de classificação e estratificação dos pacientes portadores dessa enfermidade, não só para que se pudesse estabelecer comparação sistematizada em estudos prospectivos multi-institucionais e internacionais, mas também para que se agrupassem pacientes que se beneficiassem de uma ou outra modalidade terapêutica em um dado momento, com a resposta terapêutica máxima¹³. Além disso, é essencial a compreensão biológica e fisiopatológica de apresentação da carcinomatose para que se possa imprimir racionalidade e sistematização ao seu tratamento²⁰.

A existência do chamado “fenótipo tumoral” permitiria a proliferação de um grupo minoritário de células, que tivessem o referido fenótipo, dessa maneira se estabelecendo a proliferação descontrolada que caracteriza as neoplasias. Um grupo

amplamente majoritário de células desprendidas no peritônio não teria esse fenótipo e, conseqüentemente, não obteria condições nutricionais e vasculares de proliferação. A esse fenômeno se designou “ineficiência metastatizante”³⁸.

A cavidade peritoneal é um espaço virtual revestido por células mesoteliais que contém uma extensa rede capilar linfática e vascular. A membrana basal sob essa camada de células se comporta como uma barreira contra o fluxo de material celular. A cavidade é preenchida por pequeno volume de líquido, com características próprias de produção, circulação e absorção. Em algumas situações anormais, incluindo a presença de malignidade, poderá ser modificado o fluxo de produção e absorção do líquido peritoneal, havendo alteração na pressão hidrostática intraperitoneal. A absorção de líquidos se faz através do peritônio, sendo que a maior parte do mesmo retorna à circulação porta. Material celular e proteínas não ultrapassam a membrana basal e são absorvidos pelos canais e poros linfáticos localizados primariamente na superfície peritoneal do diafragma e no grande omento. A carcinomatose peritoneal se caracteriza pelo bloqueio desses canais pelas células tumorais, o que provoca impedimento ao fluxo do líquido peritoneal³³.

Existem canais com comunicação direta entre o peritônio e linfáticos adjacentes concentrados no diafragma. O uso intraperitoneal de partículas marcadas com iodo 125 foi utilizado para verificar o papel desses canais na absorção de macromoléculas ao longo do diafragma e do peritônio parietal e facilitou a compreensão desse fenômeno³¹.

O fluxo de líquido e material celular no abdômen é determinado, entre outros fatores, pela ação da gravidade e pelos movimentos do diafragma e das alças intestinais. O padrão desse fluxo determina o percurso de partículas sólidas nesse ambiente e, conseqüentemente, o padrão de disseminação de células tumorais na cavidade peritoneal. Esse fenômeno explica porque as localizações mais comuns dos implantes peritoneais são o quadrante inferior direito, a superfície diafragmática direita, o omento e o peritônio pélvico³⁴.

Hagiwara, em 1993, estudou a presença de filtros imunológicos, denominados por ele de “milk spots”, concentrados, principalmente, no omento, ligamento

hepatoduodenal, base do mesentério, fundo de saco de Douglas e apêndices epiploicos, que tem função similar aos linfonodos, expressa por ação de filtragem linfática e imunológica agindo como “áreas de armadilhas” para aglomerados de células tumorais. Portanto, segundo esse autor, a localização dos “milk spots”, o constante movimento das vísceras abdominais, o ritmo de esvaziamento do líquido peritoneal e a ação da gravidade, são fatores que, em conjunto, determinam o padrão de disseminação tumoral peritoneal³⁸. Esses elementos seriam “portões” que permitem a entrada das células tumorais na camada subperitoneal, onde se estabelecem condições de nutrição e irrigação que possibilitam sua multiplicação. Essa localização corresponde aos achados clínicos da carcinomatose peritoneal, que acomete inicialmente os sítios referidos⁵⁰.

A carcinomatose peritoneal pode se originar de tumores primários da superfície peritoneal, como os mesoteliomas, mas também pode ser resultante da disseminação de tumor originado em víscera intra-abdominal, podendo abranger desde as lesões de baixo grau histológico e comportamento biológico indolente como o adenocarcinoma mucinoso do apêndice e alguns casos de câncer de ovário, até lesões de alto grau e comportamento agressivo como os tumores do estômago, cólon ou pâncreas. Podem também ocorrer metástases sistêmicas simultâneas à carcinomatose peritoneal. Por outro lado a disseminação peritoneal pode ser resultante de lesões neoplásicas primárias em sítios extra-abdominais, como os melanomas ou os tumores da mama. Naturalmente cada uma dessas neoplasias tem padrões de disseminação particulares e devem ser analisadas individualmente. Os órgãos intraperitoneais, principalmente o ovário e o apêndice cecal são a fonte mais comum de tumores diagnosticados de início com carcinomatose peritoneal^{35,36}.

As neoplasias gastrintestinais podem ser causa de carcinomatose peritoneal por dois mecanismos distintos: nos tumores de alto grau, mal diferenciados a disseminação tumoral se faz por invasão direta de órgãos com posterior dispersão das células e depósitos tumorais à distância, geralmente associados a disseminação linfática e hematogênica^{20,32}. Já os tumores de baixo grau, bem diferenciados, se caracterizam por disseminação via “fenômeno de explosão por pressão”, como ocorre nos tumores mucinosos do apêndice e do ovário, nos quais o crescimento

tumoral lento permite mudanças do volume das células tumorais com ruptura das mesmas com conseqüente contaminação tumoral peritoneal⁴. Esse fenômeno é verificado em tumores de baixo ou nenhum potencial maligno. Causas menos comuns de carcinomatose peritoneal incluem disseminação hematogênica de tumores extra-abdominais, como acima relatado, ou implantes iatrogênicos após manipulação de tumores como nas biopsias de hepatocarcinomas ou de tumores da vesícula biliar³⁷.

A simples presença de células tumorais livres no ambiente peritoneal não corresponde sistematicamente à presença de carcinomatose, pois a aderência, implantação e posterior proliferação celular demandam todas as fases necessárias para o estabelecimento e crescimento de uma neoplasia³⁸.

Os pré-requisitos que favorecem a instalação de metástases linfáticas ou hematogênicas não se aplicam sistematicamente à disseminação peritoneal. A regulação da adesão das moléculas, correlacionadas com o “fenótipo de aderência tumoral” e o baixo poder antigênico dessas células tumorais podem explicar porque as mesmas escapam da vigilância imunológica³⁹.

Para que ocorra crescimento tumoral nos locais de implantes peritoneais é obrigatório o crescimento de vasos para nutri-los, mas implantes se mostraram capazes de absorver nutrientes do líquido ascítico, principalmente nos tumores de baixo grau^{40,41}.

2.1.4 Modelos de classificação

Uma condição essencial para a racionalidade na indicação do tratamento da carcinomatose é que se defina um sistema de classificação e estratificação dos pacientes objetivo e reprodutível, a partir de dados de imagem e de achados visuais na cirurgia e, assim, se possam estabelecer meios que permitam estudos comparativos metodologicamente corretos¹³.

Entre os diversos sistemas propostos o mais adotado é o sugerido por Sugarbaker, que divide o abdome em 12 regiões, e a cada uma atribui um escore de 0 a 3, variando de ausência de tumor visível até diâmetro de 5cm ou conflúente⁴.

A soma das áreas avaliadas corresponde ao índice de câncer peritoneal (PCI), sendo o número máximo 36. As vantagens desse sistema são a reprodutibilidade e permitir avaliação da possibilidade de citoredução escalonada, a partir de limites de PCI previamente descritos. É também possível utilizar esse sistema como guia para reoperação nas reincidências, com a requantificação da extensão tumoral e a respectiva estratificação^{6,42}.

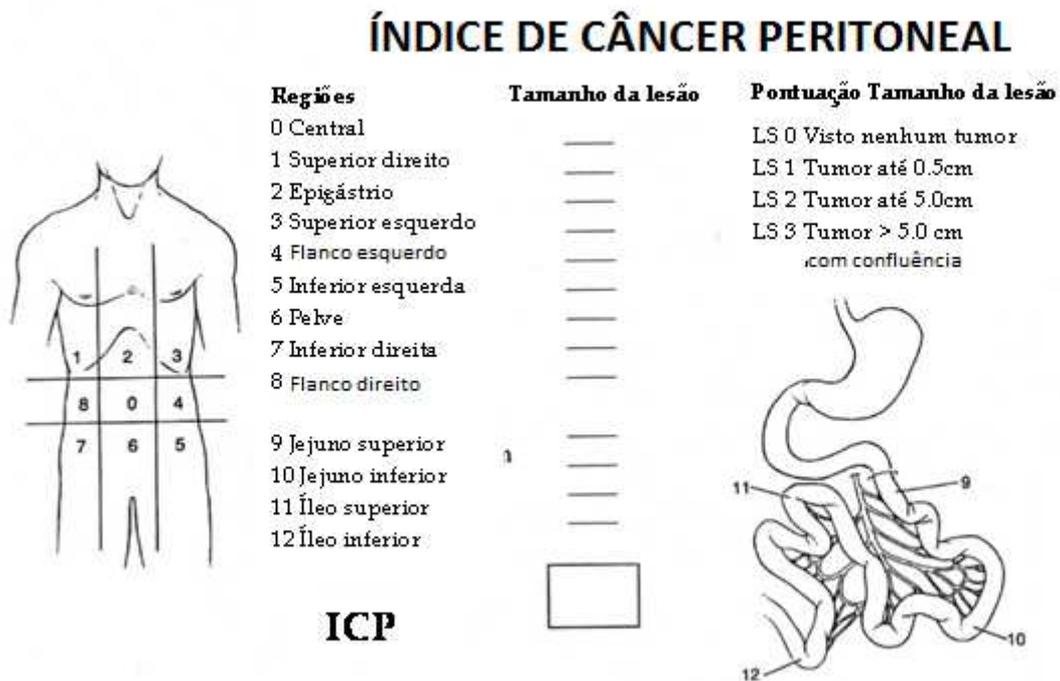


Figura 1 - Peritoneal Cancer Index (PCI)¹¹

Outro índice de estadiamento da carcinomatose foi descrito por Gilly, em 1994 estabelecendo 5 estágios, de 0 a 4, definidos desde ausência de lesão macroscópica (estádio 0) até implante maior que 2 cm (estádio 4). A vantagem desse sistema é a simplicidade e a reprodutibilidade, além do que, com a sua utilização é possível estabelecer o “downstaging” após a citoredução, o que fornece elementos para o planejamento de tratamento complementar pós-operatório. A maior desvantagem é que esse método não permite avaliar a ressecabilidade e também não pode quantificar a distribuição dos implantes peritoneais³².

Um terceiro sistema foi proposto no Japão e é específico para o câncer gástrico. Esse modelo relaciona a invasão serosa (S0 - ausência de invasão até S3 -

invasão de órgão adjacente), avalia os linfonodos (N1 - linfonodo perigástrico até N4 - linfonodo para aórtico), bem como o envolvimento peritoneal (P0 - ausência de metástases peritoneais até P3 metástases peritoneais difusas) até metástases hepáticas (H0 - ausência até H3 - metástases em ambos os lobos). Também a simplicidade e reprodutibilidade é sua maior vantagem, além da possibilidade de avaliar “downstaging” e recorrência. Entretanto não permite localização anatômica da carcinomatose, o que, comprovadamente, pode estabelecer diferenciais de evolução da doença, bem como é falho na avaliação do tamanho dos implantes e sua quantificação⁴³.

Um último modelo foi proposto por Zoetmulder, na Holanda em 2002, que corresponde ao modelo de Sugarbaker simplificado, descrevendo as lesões em quatro gradações de tamanho de grandes (maiores que 5cm) até inexistentes e diminuindo o número de regiões do abdome de 12 para 7. A maior vantagem desse sistema é a validade para estadiamento de carcinomatose por câncer colorretal. Pode também estabelecer correlação com índice de complicações e é válida para seleção e estratificação de pacientes. No entanto é deficiente porque algumas regiões abdominais não são referidas⁴⁴.

A partir de consenso realizado em 2006, durante o “5th International Workshop on Peritoneal Surface Malignancy” em Milão, Itália, o modelo de Sugarbaker foi considerado o melhor sistema de avaliação intraoperatória de carcinomatose e, a partir de então, proposta a sua utilização como sistema padrão nos estudos a serem realizados⁴⁵.

2.1.5 Tratamento

2.1.5.1 Ressecção cirúrgica

A ressecção cirúrgica poderá ser indicada quando tecnicamente factível, e quando proposta em um paciente que demonstre condição clínica que permita o procedimento. Um pré-requisito básico para essa indicação é que a neoplasia esteja restrita à cavidade abdominal, o que poderá ser definido com da utilização dos

exames de imagem convencionais, além da utilização de PET CT, exame incluído na rotina de avaliação para ressecção peritoneal³⁵.

A ressecção cirúrgica é o tratamento de eleição para pacientes com carcinomatose peritoneal secundária a tumores benignos e também para os tumores malignos de baixo grau, como os tumores de apêndice, mesoteliomas e tumores de ovário. A citoredução máxima é desejada, mas frequentemente não é possível devido à natureza difusa dessa doença. O objetivo do tratamento cirúrgico é a palição dos sintomas causados pela compressão tumoral sobre órgãos intra-abdominais, principalmente segmentos do aparelho digestivo, bem como o controle da ascite. Um retardamento no crescimento tumoral é uma consequência da ressecção⁴⁶.

Nos pacientes com tumores peritoneais benignos, a ressecção cirúrgica completa é eficiente para controle dessa condição, o que não é possível nas neoplasias malignas, quando se impõe, além da ressecção cirúrgica, algum tipo de terapia adicional que controle a doença microscópica residual no ambiente peritoneal e evite as reincidências⁴⁷.

Nas séries publicadas analisando o efeito da terapia combinada na abordagem dos tumores peritoneais, o índice de citoredução foi, unanimemente, considerado como o fator prognóstico mais importante nos diversos tipos de tumores analisados^{33,35,46}.

Em estudos experimentais o interesse é focado na utilização de drogas e substâncias citotóxicas utilizadas por via intraperitoneal após cirurgias de citoredução. Nessa situação, especificamente no que se refere a quimioterápicos, a atuação dessas drogas se faz por penetração em superfícies tumorais de 5mm ou menos, e essa penetração depende de vários fatores, como peso molecular da droga, densidade tecidual do tumor e permeabilidade de sua estrutura ao citostático utilizado⁴⁸.

Para pacientes com tumores malignos, mesmo após remoção macroscópica completa da neoplasia, é predominantemente aceito que deverá ser feita terapia local complementar, pois há doença microscópica residual. Uma avaliação pré-operatória minuciosa, no sentido de avaliar a extensão da neoplasia, e um planejamento

terapêutico cuidadoso são importantes para maximizar a ressecção cirúrgica e a eficiência do tratamento complementar³⁶.

Ressalte-se que o conhecimento dos padrões de disseminação de cada neoplasia em particular, obrigatoriamente tem que ser considerado e incluído na racionalidade do planejamento cirúrgico e do tratamento complementar. Os sítios mais frequentes de implantação tumoral são o grande e o pequeno omentos, o ligamento falciforme e o hilo esplênico. Além desses, o peritônio que reveste os músculos diafragmas, especialmente à direita, a região pélvica e o mesentério são sedes habituais de depósitos neoplásicos. Habitualmente a remoção completa do pequeno e grande omento é possível e normalmente é incluída no procedimento cirúrgico. Quando envolvido, o peritônio diafragmático pode ser ressecado completamente, devendo ser tomadas as devidas cautelas para se evitar lesão da musculatura com comunicação para a cavidade pleural. Essa circunstância pode ensejar complicações pós-operatórias, como o pneumotórax e os derrames pleurais, bem como possibilitar escape de substâncias citotóxicas para a pleura, aumentando a absorção sistêmicas das mesmas e provocando ação deletéria no parênquima pulmonar (Pneumonite e hepatização)⁴⁹.

A ressecção das goteiras parieto-cólicas direita e esquerda e do peritônio pélvico geralmente é realizada. Quando o baço ou o hilo esplênico estão acometidos pelo tumor é realizada esplenectomia. Nessa situação deverá ser avaliada, pré-operatoriamente, a utilização de vacinas contra germes encapsulados, pois dificilmente haverá indicação de seu uso após a cirurgia, tendo em vista o contexto habitual do período pós-operatório¹³.

A presença de tumor de significativo volume na pélvis e no mesentério requerem ressecção local. Na pelve, nas mulheres, a peritonectomia completa do peritônio não visceral poderá se completada pela histerectomia total e salpingo-forectomia bilateral. Eventualmente será necessária ressecção anterior do reto em monobloco e, nesse caso, após a realização de anastomose coloretal deverá ser realizado estoma proximal, tendo em vista os riscos de vazamento no local da anastomose⁴⁹.

Considerando a morbidade relacionada às ressecções intestinais em um contexto de paciente com neoplasia extensa, comprometimento nutricional e cirurgia de grande porte, deverá se optar por medidas locais especialmente a fulguração de pequenas lesões, para tratamento dos implantes ali localizados. Depósitos neoplásicos na superfície do intestino delgado, desde que pequenos e superficiais, ou do mesentério deverão ser tratados com fulguração utilizando cautérios com ponta esférica⁴⁶.

O ligamento hepatoduodenal é a área mais desfavorável à remoção completa na carcinomatose avançada, e a sua ressecção deve ser considerada quando avaliada a possibilidade de citoredução eficiente e total em outras áreas do peritônio. De uma forma geral a extensão da ressecção peritoneal deve ser governada pela possibilidade objetiva de citoredução completa⁴².

Evidentemente, a remoção integral da doença microscópica não é possível, mesmo porque normalmente não é realizada peritonectomia completa, no intuito de preservar áreas íntegras do peritônio e limitar a morbidade pós-operatória. Por outro lado, a história natural desse grupo de doenças demonstra a necessidade freqüente de reintervenções para tratar recorrências locais. Dessa maneira, a manutenção da integridade do maior segmento possível de tubo digestivo deve ser sempre considerada, para que seja preservada ao máximo a capacidade absorptiva do mesmo³⁷.

2.1.5.2 Quimioterapia intraperitoneal

A adição de quimioterapia por via intraperitoneal visa atuar sobre a doença residual de pequeno volume e microscópica. Estratégias de citoredução agressiva vêm ganhando ampla aceitação nos últimos anos, mas não tiveram suas bases plenamente estabelecidas. É consensual que há importante incremento no prognóstico quando a citoredução completa é obtida, provavelmente devido a características biológicas do tumor ou intervenção em estágio precoce da doença. Adicionalmente, o recurso de uso local de quimioterápico, permite a utilização de altas concentrações do mesmo sem que haja absorção sistêmica e, conseqüentemente,

toxicidade. Foram estudadas as concentrações plasmáticas e peritoneais de diversos quimioterápicos utilizados por via peritoneal, tendo se constatado proporções entre as concentrações peritoneais e plasmáticas que oscilaram desde 20: 1 para o cisplatina até 1000:1 para o paclitaxel¹³.

Vantagens farmacocinéticas associadas com uso intraperitoneal de drogas antineoplásicas	
Agente	Relação pico peritoneal cavitário / concentração plasmática
Carboplatin	18
Cisplatin	20
Mitomycin C	72
Methotrexate	92
5-Fluorouracil	298
Doxorubicin	474
Mitoxantrone	620
Paclitaxel	>1000

Quadro 1 - Relação pico peritoneal / concentração plasmática de quimioterápicos¹²

Esses agentes são empregados por via peritoneal com limitado espectro de toxicidade regional, utilizando dose-limite e sem implicar em efeitos colaterais sistêmicos⁴⁷.

Analisando-se pacientes com câncer de colon com alto risco de recorrência local, que foram submetidos a quimioterapia intraperitoneal ou sistêmica com 5 fluorouracil foi observado uma taxa menor de toxicidade e de recorrência no grupo tratado por via intraperitoneal. Entretanto, não foi observada vantagem na sobrevida entre os dois grupos⁴⁹. Por outro lado, observa-se em trabalho randomizado e cooperativo de fase III, aumento da sobrevida (49x41 meses) quando utilizada cisplatina por via intraperitoneal comparado com a utilização sistêmica dessa droga, nos tumores do ovário estágio III⁴⁷.

É necessária cuidadosa avaliação em estudos bem planejados para que seja avaliado cada componente individual e seu respectivo impacto no tratamento da

carcinomatose, quais sejam a citoredução, a quimioterapia e a hipertermia, bem como suas associações em diferentes modalidades⁴⁸.

Os primeiros estudos se mostraram imperfeitos pela ausência de grupos controle, bem como pela ineficiência dos sistemas de estadiamento. Por outro lado, não há consenso quanto à extensão da citoredução e à amplitude da ressecção peritoneal³².

Outros estudos, ao longo do tempo, vem demonstrando o efeito de drogas citotóxicas como adjuvante de ressecção de tumores peritoneais e análises farmacológicas são essenciais para que seja definido um padrão de uso para cada neoplasia em particular. Teoricamente, somente drogas não específicas para determinada fase de ciclo celular podem ser utilizadas, pois o efeito das mesmas se fará em uma só oportunidade, durante o procedimento terapêutico. É mandatório que se defina a elegibilidade do uso de uma droga citotóxica a partir de estudos experimentais que testem a mesma *in vivo* e *in vitro*, avaliem a sua atividade antitumoral e seu eventual sinergismo com a hipertermia. Essa fase será sucedida por estudos fase I que avaliem a toxicidade e determinem a dose máxima tolerada. Em seguida estudo fase II avaliará a resposta clínica antitumoral em neoplasia específica. Posterior estudo em fase III determinará a eficácia relativa em estudos randomizados e, em função destes, poderá ser adotado o uso clínico na rotina. Também a influência das diversas soluções carreadoras utilizadas tem que ser considerada, bem como os diversas modalidades de hipertermia^{13,17,20,42}.

2.1.5.3 Hipertermia intraperitoneal

O papel da hipertermia não está bem definido, apesar das vantagens teóricas apontadas na sua associação com a quimioterapia intraperitoneal. Estudos preliminares demonstraram que a hipertermia incrementa a penetração dos quimioterápicos nas células malignas e possível efeito sinérgico com as drogas citotóxicas¹⁹.

A maioria das séries acrescentam à quimioterapia intraperitoneal a hipertermia, utilizando sistemas de perfusão peritoneal contínua conectados a sistemas de aquecimento de soluções³⁷.

Estudos experimentais demonstraram efeito local da quimioterapia, nessas circunstâncias, em lesões de 10mm ou menos. Nessas avaliações foi demonstrado que a oferta intratumoral e o conseqüente efeito citotóxico da cisplatina tinham relação direta com a temperatura até um limite de 43°C. Houve uma oferta quatro vezes maior dessa droga com o uso da hipertermia e um efeito intratumoral mais homogêneo. Também foi demonstrado efeito da hipertermia sobre as ligações dos quimioterápicos com o DNA das células tumorais e que esse efeito tinha reação linear com a concentração dos mesmos^{15,50}.

2.1.5.4 Cirurgia citoredutora associada à quimioterapia intraperitoneal hipertérmica

A associação da cirurgia citoredutora com a quimioterapia intraperitoneal e hipertermia, é designada por uma sigla: HIPEC (*Hipertermic Intraperitoneal Perfusion and Chemotherapy*), consagrada em todo o mundo^{32,42,44,49,51}.

A utilização de circuitos de perfusão associados a dispositivos de aquecimento passou a ser adotada nesses casos. A temperatura intraperitoneal é mantida entre 41 e 42°C durante aproximadamente 60 minutos. Atualmente está disponível na Europa dispositivo específico para quimioterapia intraperitoneal com HIPEC e a legislação já obriga a utilização desse equipamento nesses casos⁵².

Nesse procedimento são instalados termômetros na cavidade peritoneal e distribuídos de modo a garantir a hipertermia em níveis estáveis e uniformes. Os agentes mais comumente utilizados na HIPEC são a cisplatina e mitomicyn C, empregados inicialmente no tratamento dos mesoteliomas e dos tumores gastrointestinais. Estudos fase II foram feitos definindo a padronização da HIPEC e seus resultados nesses dois grupos de pacientes¹³. Foi também planejada quimioterapia pos-operatória intraperitoneal com uso de 5-FU e Paclitaxel³⁴.

As complicações relacionadas com a HIPEC, considerada a condição oncológica e clínica do paciente, bem como a extensão da cirurgia e procedimentos associados, implica, na maioria dos estudos, em morbidade em torno de 25% e mortalidade média de 5%³⁶.

O primeiro trabalho prospectivo randomizado com avaliação de longo prazo (8 anos) avaliando os resultados da HIPEC foi publicado por Verwall et al, em

2008⁵². Foram estudados dois grupos, totalizando 105 pacientes. Em um grupo foi realizada apenas quimioterapia sistêmica e no outro citoredução associada à HIPEC e quimioterapia sistêmica. A sobrevida média foi de 12.6 meses no grupo controle e de 22.2 meses no grupo HIPEC ($p=0.0280$) e a sobrevida em 5 anos para os pacientes que fizeram ressecção R0 e HIPEC foi de 45%. Dessa forma foi demonstrado que a HIPEC aumenta a sobrevida em pacientes com carcinomatose secundária a tumores colo-retais, e também verificado que há um subgrupo selecionado de pacientes que tem sobrevida prolongada nessa situação⁵².

Outra evidência da eficácia da HIPEC foi publicada por Elias et al, em 2009 quando foi analisada a sobrevida a longo prazo de pacientes com carcinomatose peritoneal secundária a tumores colo-retais submetidos a quimioterapia sistêmica com drogas de uso atual e eficiência comprovada (oxalaplatin e irinotecan) avaliados retrospectivamente versus pacientes tratados com citoredução e HIPEC. Foram analisados 48 pacientes em cada grupo e a sobrevida em 5 anos foi de 51 % para o grupo HIPEC e 13 % para o grupo quimioterapia sistêmica. Também foi verificado que a sobrevida média foi de 62.7 meses para o grupo HIPEC *versus* 23.9 meses para o grupo controle ($p<0.05$). Foi concluído que a HIPEC promove considerável ganho na sobrevida⁶.

2.1.5.5 Outras terapias antineoplásicas intraperitoneais

A possibilidade de limitar a exposição sistêmica a drogas citotóxicas através de uso regional desses agentes é especialmente atrativa para novas modalidades de tratamento. A terapia fotodinâmica utiliza agentes sensibilizantes por via endovenosa (photofrin) que tem afinidade pelas células tumorais. Após tempo de fixação dessas substâncias nas células tumorais, o peritônio é exposto à irradiação a laser, o que provoca a formação de radicais intracelulares. Os resultados iniciais no tratamento da carcinomatose peritoneal e da sarcomatose são encorajadores, mas foi observada importante toxicidade local e sistêmica¹⁶.

Outra abordagem consiste na utilização de terapia genética, através da aplicação direta de vetores nos depósitos tumorais, com conseqüente incremento da eficiência de transdução¹⁸.

Outra modalidade de tratamento consiste na utilização intraperitoneal de microesferas impregnadas por cisplatina, que permitem liberação gradual dessa substância por 14 dias. Apesar de, no modelo animal utilizado, não ser observado efeito terapêutico maior que o uso de cisplatina aquosa, foi observada menor toxicidade e a possibilidade de utilização de doses maiores escalonadas⁵³.

2.1.6 Palição

A ascite neoplásica refratária pode provocar impacto na qualidade de vida e na sobrevida do paciente com carcinomatose. Dez a quinze por cento dos pacientes com câncer gastrointestinal desenvolvem essa condição. A terapia conservadora com diuréticos é eficiente em aproximadamente metade dos pacientes, e não existem trabalhos randomizados que confirmem esse dado. O uso de espironolactona, com dose inicial de 150mg/dia pode ser necessário para controlar a ascite¹².

A drenagem do fluido através de paracentese e a realização de desvios peritoneo-venosos provocam resolução imediata, mas tem complicações relevantes, como infecções e hipoalbuminemia, além de não ser uma solução definitiva. Os procedimentos (shunts) de Denver e Leveen removem o líquido ascítico e o drenam para a circulação sistêmica, e permitem controle prolongado da ascite em aproximadamente 70 % dos pacientes⁵⁴.

Há relatos isolados do uso intraperitoneal de bevacizumab, anticorpo monoclonal inibidor do VEGF, no tratamento da ascite secundária a tumores de ovário refratária ao tratamento convencional. A comprovação da utilidade desse recurso deverá ser definida em estudos melhor dimensionados⁵.

2.1.7 Modelos de indução de tumores peritoneais em animais e quimioterapia intraperitoneal

Os modelos de disseminação tumoral peritoneal tiveram sua demanda provocada pelo estudo clínico dos tumores malignos de predominante disseminação peritoneal, especialmente os tumores do ovário. Foi estabelecida a racionalidade da utilização de substâncias ou drogas por via peritoneal, na suposição de que seu efeito se faria com mais eficiência no local e, eventualmente, seria potencializado pela ação sistêmica da mesma substância aplicada no peritônio¹³.

A utilização de substâncias por via intraperitoneal associada ao uso da mesma, ou de outras drogas, por via venosa, também teve sua utilização implementada, com a denominação de tratamento bidirecional¹².

Dessa maneira, foram criados modelos experimentais de tumores transplantados em animais. As primeiras referências consistentes, de nosso conhecimento, a respeito desse assunto datam de 1979, quando Costa et al, utilizaram cultura de células de carcinoma de colon produzidos por indução química em ratos BD IX. Foram criados 4 modelos experimentais de disseminação tumoral: subcutânea, pulmonar, hepática e peritoneal. Observado que essas metástases tinham as mesmas propriedades biológicas dos tumores primários. A partir desse modelo foram projetados estudos de imunoproliferação, imunoterapia, quimioterapia e terapia antiangiogênica, além de testes com substâncias anticoagulantes⁵⁵.

Um modelo semelhante foi obtido por House & Maley, em 1983 que estudaram um grande número de ratos com câncer de colon (240 no grupo experimento e 150 no grupo controle) tratados apenas com cirurgia, comparados a animais tratados com cirurgia associada a quimio ou imunoterapia adjuvantes. Observada similaridade entre o comportamento biológico das lesões e as manifestações do tumor de colon em humanos. Dessa maneira foram detectadas metástases no fígado, nos linfonodos nos pulmões e no peritônio em 27 % dos animais. Foi observado um percentual menor de metástases e um menor crescimento tumoral no grupo que fez tratamento adjuvante e esses valores foram

estatisticamente significantes. Houve também um menor crescimento dos linfonodos mesentéricos, bem como uma maior sobrevida no grupo da adjuvância⁵⁶.

Takada, em 1984 trouxe uma importante contribuição á compreensão da biologia dos tumores experimentais estudando ratos da raça WF submetidos a transplante intraperitoneal de carcinoma de colon espontâneo derivado de duas linhagens de animais machos e fêmeas de uma mesma ninhada. Esse tumor correspondia à 16ª a geração de transplantes. Observado que nas primeiras gerações a histologia dos tumores transplantados correspondia a adenocarcinoma tubular bem diferenciado, mas havia uma mudança gradual para o padrão medular tubular, com progressiva indiferenciação, em torno da 16ª geração. Essa observação provocou a necessidade de avaliação de características histológicas dos tumores experimentais, em um dado tempo, como base para a compreensão das respostas comparativas aos tratamentos⁵⁷.

Também a ação antineoplásica de bactérias, especificamente os streptococos, foi estudada por Saji , em 1985. Foi avaliado o efeito citostático intraperitoneal de uma solução de streptococcus denominada OK-432. A mesma foi administrada por via ip na dose de 50 KE / kg no 6º dia após inoculação ip das células tumorais. Foi estudado microscopicamente o exsudato peritoneal, a cada dia. Verificado um marcante incremento de neutrófilos na ascite 24 horas após a administração do OK-432, com surgimento mais tardio dos macrófagos e linfócitos. Ao decréscimo gradativo dos neutrófilos correspondeu crescimento do volume tumoral. Verificada “formação em roseta” com deposição de neutrófilos em torno das células tumorais. Posteriormente essas formações provocavam destruição e desaparecimento das células neoplásicas. Esses efeitos não foram observados quando e fez injeção mais tardia do OK-432 (após o dia 6) ou nos casos não tratados com essa substância⁵⁸.

Outros tipos de interferência sobre a evolução de tumores experimentais foram utilizadas. Minárovits , em 1987 estudou o efeito de células singênicas peritoneais (PC) de ratos no crescimento de quatro tipos de tumores transplantáveis: o fibrosarcoma BA F1, o mastocytoma, o adenocarcinoma Sp4 e o carcinoma pulmonar de Lewis. Verificado que as PC, estimuladas por peptona protease, causavam incremento do crescimento tumoral, enquanto a injeção ip de ácido poli IC

tinha efeito contrário. Esse efeito foi observado apenas no fibrosarcoma BAF1 e no adenocarcinoma Sp4, sendo o mastocytoma e o carcinoma de Lewis insensíveis à inibição pelo ácido poli IC⁵⁹.

Um estudo da Universidade Duke, em 1987, avaliou o efeito da hipertermia em cães da raça Beagle, em termos de distribuição de temperaturas, bem como a farmacocinética e toxicidade da cisplatina. Administrada CDDP na dose de 65mg/m² por via ip, diluída em soro fisiológico em cães submetidos a hipertermia regional a 41.5 °C por 60 minutos comparados a cães que não utilizaram a hipertermia. Constatado, inicialmente, que as concentrações intraperitoneais de CDDP eram 22 vezes maiores que os níveis séricos e que o tempo de meia vida da droga no peritônio era o dobro nos animais submetidos à hipertermia. Por outro lado a concentração total de CDDP no plasma e na urina não diferiu entre os dois grupos. Observada uma “área sob a curva” da concentração versus tempo maior no grupo submetido à hipertermia. A toxicidade foi semelhante nos dois grupos, expressa por vômitos fugazes, e não se traduziu do ponto de vista bioquímico. O mesmo estudo avaliou o uso *in vitro* do CDDP diluído em soro fisiológico submetida a temperaturas de 38 a 44 °C, sendo observado que a oferta de metabólitos de CDDP foi aumentada em até 30% com o incremento da temperatura. Em conclusão, foi verificado que a temperatura provoca um aumento da geração e retenção de metabólitos reativos do CDDP na cavidade peritoneal⁶⁰.

Outras substâncias foram utilizadas em modelos experimentais. Em 1988 Jeannin, na França, avaliou o uso de lentinan em um modelo de câncer de colon em ratos BDIX, submetidos a injeção intraperitoneal de células tumorais singênicas, para indução de carcinomatose peritoneal. Feita injeção ip de 2 mg /kg de lentinan, totalizando cinco injeções com intervalo de 2 dias entre as mesmas, iniciadas 14 dias após a injeção das células neoplásicas, quando os ratos tinham numerosos nódulos peritoneais com dimensão entre 1 e 5 mm. Observado que 60% dos animais tratados com a dose ideal de lentinan tiveram regressão completa dos tumores 42 dias após o tratamento e que essas respostas foram duradouras (até 210 dias), o que foi confirmado quando foram eutaniados os animais. O grupo não tratado morreu com progressão tumoral entre o 40º e o 70º dias pós-tratamento⁶¹.

Um novo modelo de indução de tumores no peritônio e no fígado foi proposto na Austrália, em 1988, por Archer & Gray. Esses autores utilizaram ratos Wistar Wag e linhagem de células 192 NRC derivadas de tumores de colon induzidos por DMH(1,2 dimethylhydrazida) as quais foram cultivadas em microesferas de polystireno com carga iônica positiva. Houve crescimento tumoral na confluência das esferas, com formação de pseudópodes que aderiam firmemente às células, possibilitando infusão das esferas sem deslocamento das mesmas. A injeção de 5×10^4 esferas tumorais na veia porta produziu uma média de 35 nódulos hepáticos. Observado que não houve progressão das esferas para as veias hepáticas, pois não houve disseminação tumoral pulmonar. Por outro lado a injeção intraperitoneal de 5×10^3 esferas tumorais, após delicada escarificação do peritônio com gaze, produziu uma média de 65 nódulos tumorais peritoneais, com uma média de diâmetro de 1.6 mm 14 dias após a injeção. O crescimento tumoral progrediu, tanto no fígado como no peritônio, até a morte dos ratos 36 dias após a inoculação. As vantagens desse método foram destacadas pela reprodutibilidade do modelo e pela permanência dos tumores nas áreas implantadas, sem ocorrência de metástases, e, portanto, sem interferência de tumores em outros sítios em uma modalidade de tratamento⁶².

Um modelo de carcinomatose peritoneal utilizando coelhos foi utilizado no Japão por Hagiwara em 1988 que, além de fazer estudo comparativo em animais, paralelamente fez estudo clínico não controlado utilizando o mesmo princípio do experimento. Utilizada mitomicina c com partículas de carbono ativado (MMC-CH) por via ip em coelhos portadores de carcinomatose peritoneal induzida por transplante do carcinoma VX2 comparada à utilização de solução aquosa da mitomicina C pela mesma via, com as doses, respectivamente de 1mg/kg e 0.185mg/kg. A toxicidade foi equivalente nos dois grupos. Houve um aumento estatisticamente significativo da sobrevida no grupo MMC-CH. O estudo clínico preliminar constou de oito pacientes com câncer gástrico e disseminação peritoneal, utilizando 60 a 100mg de MMC-CH ip ao término da laparotomia. Após seguimento de mais de um ano observado que o tempo médio de sobrevida foi de 13.9 meses enquanto no grupo histórico a sobrevida foi de apenas 6.5 meses e que a toxicidade foi temporária e tolerável³⁸.

Um modelo experimental avaliando a terapia alvo e os anticorpos monoclonais, foi estudado por Fjeld et al, em 1992. É sabido que, mesmo com a utilização de anticorpos monoclonais altamente específicos, uma oferta dos mesmos a tecidos normais e o alto resíduo de ação no sangue e nos fluidos corpóreos extravasculares constituem um problema não resolvido. Foram utilizados dois modelos experimentais compreendendo situações comparáveis a tumores ginecológicos e outras formas de neoplasias peritoneais, visando especificamente a mensuração de parâmetros de reações de terapia alvo. No primeiro modelo células de hibridoma foram inoculadas no peritônio para simular carcinomatose peritoneal e os anticorpos monoclonais produzidos pelo tumor foram utilizados como um marcador tumoral sérico. No segundo modelo as células tumorais foram contidas em uma câmara microporosa, mimetizando um tumor localizado. Esse método permitiu controle da carga sobre um alvo imunológico e mensurações da concentração do anticorpo injetado no interior do alvo⁶³.

A avaliação do efeito do uso intraperitoneal da fração beta da interleucina 1 (rhIL-1beta) em modelos de implante peritoneal foi feita por Malik, em 1992. Nesse estudo foi avaliado o uso ip de rhIL-1beta em ratos submetidos a implante intraperitoneal de três linhagens de câncer de ovário humano (HU, OS e LA). A injeção da interleucina conduziu a uma produção de ascite dose-dependente bem como a controle de nódulos sólidos tumorais localizados no peritônio e na superfície das vísceras em duas linhagens tumorais (HU e LA). No tipo OS somente altas doses de rhIL-1beta (1 micrograma/dia) permitiram efeito antitumoral eficiente. O efeito da interleucina se deu por ação citotóxica direta e não foi relacionado pro indução do influxo neutrofílico peritoneal. Por outro lado, o Fator de Necrose Tumoral Recombinante (rh TNF) também promove efeito antitumoral nos nódulos peritoneais e na ascite, porém de modo diverso da rhIL-1beta. A análise do líquido peritoneal nos portadores de tumores mostraram que o rh TNF induz à formação de Interleucina, mas essa indução não produz efeitos significativos⁶⁴.

Um outro tópico relevante diz respeito ao uso de amostras de tumores experimentais implantados no tecido subcutâneo e seu efeito na produção de carcinomatose peritoneal. Li, em 1993, implantou o carcinoma SKOV3 no subcutâneo de ratos sob a forma de aglomerados e suspensão de células injetadas no peritônio dos animais, simulando um modelo de carcinoma de ovário com ascite. O estudo histológico e citológico dos implantes peritoneais e do líquido ascítico, respectivamente, inclusive com microscopia eletrônica, mostrou tratar-se de adenocarcinoma. A imunohistoquímica e a marcação imunocitoquímica com o anticorpo monoclonal COC 166-9 mostraram aspectos idênticos às células do tumor SKOV3. A sobrevida média dos animais foi de 68.7 dias e este modelo foi confirmado como um recurso para estudo de quimioterapia e imunoterapia intraperitoneais⁶⁵.

O primeiro modelo de transplante ortotópico de carcinoma de ovário humano foi descrito por Fu & Hoffman, em 1993 que relataram a utilização de amostras de câncer de ovário histologicamente intactas e que foram implantadas através de técnica microcirúrgica sob a cápsula do ovário de ratos. Houve crescimento local dos tumores e assumiram um padrão de disseminação tumoral, incluindo implantes no peritônio parietal e omento, além da produção de ascite⁶⁶.

Outro modelo de transplante de tumores humanos foi descrito por Wang, em 1994. Esse autor estudou a ação de um inibidor da metaloproteínase, substância de reconhecido efeito estimulante sobre o crescimento tumoral e sua disseminação. Em um modelo de câncer de colon humano transplantado em ratos foi utilizado o inibidor de metaloproteínase BB-94 (batimastat). Fragmentos do tumor de 1 a 1.5 mm foram implantados no colon de 40 ratos atímicos. Foi feita administração intraperitoneal de 30mg/kg de BB-94 diariamente por 60 dias e depois três vezes por semana, iniciando o tratamento sete dias após a implantação do tumor. Houve redução significativa do crescimento tumoral no grupo tratado, bem como redução da invasão local e regional. Também no grupo tratado houve diminuição da ocorrência de metástases, e quando elas ocorreram se restringiram à cavidade abdominal. Houve um aumento estatisticamente significativo da sobrevida no grupo tratado com BB-94 (média de 140 versus 110 dias)⁶⁷.

O uso de quimioterápicos de outros tipos em tumores humanos implantados também foi descrito. Pratesi, em 1995 testou o efeito intraperitoneal do topotecan, um análogo da camptotecina solúvel em água, em dois modelos de carcinoma de ovário humano transplantados no peritônio de ratos: o tumor IGROV-1, originado de pacientes não tratadas e o tumor A2780, produto de resistência à cisplatina produzida *in vitro*. No caso do IGROV-1 a dose de 10mg/kg de topotecan foi oferecida quatro vezes a cada quatro dias. Houve marcante incremento da sobrevivência no grupo tratado e foram curados quatro de nove ratos. Quando comparados esses resultados com drogas previamente testadas como cisplatina, carboplatina e doxorubicina em doses e agenda ideais os efeitos do topotecan foram sensivelmente melhores. No tratamento do tumor resistente A2780 também houve boa resposta, pois a maioria dos ratos viveu mais que 100 dias e a maior parte destes estavam sem sinais de neoplasia ativa. Outro dado indicativo da alta responsividade desses tumores ao topotecan foi a elevada expressão da enzima topoisomerase I, indicando a utilidade do uso dessa droga em protocolos clínicos⁶⁸.

Para que se estabelecesse um modelo animal com indução de tumores no peritônio, foram de fundamental importância científica os estudos implementados pelo Prof. Gerrit Los, do Departamento de Terapias Experimentais, do Instituto de Câncer da Holanda, na cidade de Amsterdam⁴⁰. Esse autor publicou uma série de trabalhos, a partir de 1989, demonstrando a sistematização da indução de tumores peritoneais em ratos, bem como diversos estudos farmacológicos de importância fundamental para a compreensão da terapia antineoplásica intraperitoneal^{15,39,40,50,69-71}.

Dessa maneira, em 1989, foi publicado o primeiro estudo de uma série, o qual considerava um modelo clínico de câncer de ovário e o embasamento teórico do uso de substâncias citostáticas (quimioterápicos) por via intraperitoneal. Esses dados apontavam o fato de que essas drogas poderiam ser administradas por essa via, considerando estudos prévios com a cisplatina, 5-FU, mitoxantrone e antraciclina, mostrando concentração, em alguns casos de até três vezes maior no ambiente peritoneal em relação aos níveis plasmáticos³⁹.

Uma vantagem adicional da administração intraperitoneal de citostáticos é a penetração direta das drogas no tumor, fato pouco conhecido à época. Havia descrição de uma capacidade diferenciada de penetração em função do tipo de droga utilizado, observando-se a presença intranuclear de doxorubicina nas seis primeiras camadas (externas) de um tumor sólido do ovário. Também foi observada, em

relação a outro citostático, o 5-Fu, a penetração em mais de 60 camadas celulares do tumor^{25,72}.

No trabalho inicial de Los, foi avaliada a relação entre a penetração tumoral da droga e a resposta clínica, baseado em modelo que guardava estreita relação com o câncer de ovário e com outras técnicas de transplantes tumorais para o peritônio. Foram utilizados ratos machos Wag/Rij, com 8 a 12 semanas de vida e peso de 220 a 260g. O tumor utilizado foi o CC 531, derivado de carcinomas originados no colon de ratos expostos a um carcinógeno conhecido, o methylazoxy-methanol. Esse tumor se caracteriza pela formação de nódulos peritoneais e fase pré-terminal exsudativa. A densidade de 2×10^6 células foi definida como padrão e já era previamente conhecido o tempo de duplicação do tumor de 16h /ciclo celular. As drogas citotóxicas utilizadas foram o 5-Fu, a doxorubicina, a mitoxantrona e a cisplatina. Foi feita injeção intraperitoneal de quatro diferentes concentrações de células tumorais, inclusive a padrão acima referida (2×10^6). A localização e o crescimento tumorais foram determinados a partir de repetidas laparotomias do 14º ao 35º dia após a inoculação. O tempo de duplicação tumoral foi definido em um grupo de 10 ratos submetidos a laparotomias diárias, sendo definido como 3.9 dias. Verificou-se que os nódulos tumorais se implantaram preferencialmente no diafragma, peritônio parietal e mesentério. O diâmetro tumoral foi avaliado baseado na média aritmética de três medidas dos tumores realizada por calibradores digitais. Feitos também implantes subcutâneos e hepáticos, os últimos com injeção de suspensão de células tumorais através da veia porta. A sensibilidade do tumor CC 531 foi testada para as diferentes drogas pelo ensaio clonogênico, utilizando curvas determinadas em seis meios de cultura tissular. As colônias contendo mais de 50 células foram submetidas a escorpe sete dias após a instalação do meio tissular. Todas as medições foram triplicadas. Foram quantificadas as concentrações intratumorais da cisplatina após injeção ip e iv e medidas através de espectroscopia de absorção atômica (FAAS). Também foi feita medida da concentração no plasma e na cavidade peritoneal de cisplatina ministrada por via venosa, com estabelecimento de curvas de tempo de concentração (AUC) de 0 a 1440min. Como resultados se observou que a “pega” tumoral se instalou, a partir de diferentes quantidades de células implantadas, com

mais eficácia no grupo de 2×10^6 , quando se constatou, após cinco semanas do implante, em 80% dos animais, a disseminação neoplásica peritoneal. Observou-se que quantidades adicionais de células não provocaram aumento do percentual de “pega”, sendo estabelecido que 2×10^6 seria a concentração padrão a ser utilizado nos estudos subsequentes. O crescimento e localização de nódulos tumorais na cavidade peritoneal foram avaliadas em diferentes momentos após a inoculação do volume padrão acima referido. Observada presença de implantes a partir da terceira semana pós - implante, os quais tinham diâmetros que oscilavam entre 1 e 5mm e estavam presentes em 80% dos animais na quinta semana. Também constatado que em períodos acima desse prazo não havia incremento nesse percentual ou qualquer informação adicional útil. Na avaliação escalonada dos casos foi verificado que a expressão macroscópica dos tumores se fazia nas três primeiras semanas, o que indicava esse período seria o ideal para estudos microscópicos. O fato de que 20% dos animais não apresentarem tumores após o implante também indicou a necessidade de uma margem maior de casos para que se pudesse imprimir poder estatístico à casuística. Observou-se que o padrão topográfico de distribuição dos implantes obedecia à mesma disposição observada nos tumores de ovário, colons e estômago vistos em humanos, demonstrando, dessa maneira, a similaridade entre o comportamento do tumor CC 531 e as neoplasias *in anima nobile*³⁹.

Um dado relevante destacado no estudo foi o de que, diferentemente do previsível em tumores de rápido crescimento e em um ambiente de vascularização pobre (o peritônio), não havia áreas de necrose detectáveis nas amostras histológicas.

Esse fato foi confirmado quando estudada a vascularização dos nódulos através da injeção endovenosa do corante fluorescente Hoechst 3342, quando foi constatada boa vascularização tumoral em secções de biópsias de congelação. No que se refere à sensibilidade do tumor CC531 aos diversos quimioterápicos acima citados foram injetados por via ip em doses previamente conhecidas, inclusive usadas em níveis correspondentes a estudos em humanos. A sensibilidade *in vitro* foi maior com o 5 Fu e menor com cisplatina, após 1h de exposição, na proporção de um fator 200 para 2 da DL 50, respectivamente. A farmacocinética da cisplatina intraperitoneal também foi avaliada. Observado que a área sob a curva de tempo - concentração no

plasma e líquido peritoneal foi favorável à via intraperitoneal, com um fator ip de 9561 *versus* iv de 1497, indicando que havia uma difusão direta da droga do peritônio para o tumor. Essa vantagem da via ip sobre a iv também se expressou sob a forma de maior sobrevida nos ratos submetidos à cisplatina ip *versus* iv, demonstrando a correlação entre a concentração tecidual de cisplatina e a resposta tumoral. Esse estudo de Los, lançou as bases para a compreensão da fisiopatologia da carcinomatose peritoneal e da farmacocinética do uso de citostáticos por via intraperitoneal. A partir desse estudo se aventou uma alternativa terapêutica para um grande número de portadoras de tumor de ovário nos estádios III e IV, 60% das quais tem doença residual mínima como consequência de níveis insuficientes de citostáticos nos nódulos tumorais a partir das doses máximas utilizadas por via endovenosa³⁹.

A esse trabalho inicial se sucedeu uma série de estudos publicados nos anos seguintes pela equipe do Prof. Los, os quais sedimentaram o conhecimento sobre a carcinomatose peritoneal experimental e a farmacocinética de drogas utilizadas no peritônio em diversas circunstâncias^{15,39,40,41,50,73,69,71}.

Dessa maneira, Nagel , em 1990, destacou o fato de que a medição de implantes tumorais é dificultada pela presença de tumores de diferentes tamanhos e em lugares diversos do peritônio, alguns de difícil quantificação e propôs um modelo de implante de um único fragmento localizado em sítio específico do mesentério. A resposta ao tratamento poderia, então, ser avaliada por laparotomias sequenciais. Medidas do peso dos animais deveriam ser aferidas, como em outros modelos de transplante, como avaliação indireta de toxicidade do tratamento. Nesse trabalho, além da avaliação, especificamente da técnica do implante, foram estudadas a cinética celular e a resposta a drogas injetadas por via intraperitoneal. Utilizado o tumor CC 531 sob a forma de suspensão de 1ml contendo 2×10^6 células, com injeção subcutânea no flanco dos ratos. Após três semanas foi produzido um tumor sólido de cerca de 3cm. Feita excisão do mesmo em cortes em fragmentos de 1.5mm. Observado que o tumor apresentava um centro necrótico e uma periferia com tecidos viáveis. Na porção visualmente viável foi feito “punch” de 3mm de diâmetro, portanto, cada fragmento de tumor media 3mm de diâmetro x 1.5mm de

espessura. O fragmento era imerso em solução salina e implantado no máximo 2 horas após, em temperatura ambiente. O fragmento tumoral era implantado através de laparotomia, sendo feita fixação ao mesentério distal com hemoclipes, com os devidos cuidados para não interromper o fluxo vascular mesentérico. Durante um período de observação de 63 dias foi notado que somente os tumores maiores que 2cm apresentavam uma discreta necrose central, o que discrepava dos tumores semelhantes implantados no subcutâneo, que apresentavam maior índice de necrose.

Foi observado que no mesentério se formava uma rede extensa de vasos no tecido conectivo peritumoral, o que pode justificar esse achado. Foram feitas laparotomias a cada duas semanas para medição do crescimento tumoral. Utilizados calibradores digitais e feita média aritmética de três medições perpendiculares do tumor. Os parâmetros de cinética celular foram analisados utilizando um análogo da thymidina (5' - iododeoxy-uridine (IUdr)) e citometria de fluxo, a partir de injeção intraperitoneal de 30mg/kg de IUdr , com sacrifício dos animais após 7 horas. O conteúdo total de DNA foi analisado associado à medição com citometria de fluxo das frações com células fluorescentes. Foi feita injeção intraperitoneal de cisplatina, na dose de 4mg/kg , 10 dias após a implantação tumoral. A primeira laparotomia foi feita no 17º dia após tratamento e a última no 50º dia. Um dado relevante foi o achado de que em dois grupos de animais foi estudado o impacto das laparotomias no crescimento tumoral e não foi verificada diferença nas medidas dos nódulos tumorais. Houve um retardo no crescimento tumoral associado ao uso de cisplatina ip, e foi demonstrada a factibilidade de monitoração de crescimento de tumores sólidos peritoneais em ratos por laparotomias repetidas, ensejando um modelo cientificamente válido para estudo de drogas antineoplásicas no peritônio⁷³.

O mesmo grupo de pesquisadores , em 1990 , descreveu uma comparação, com base em estudo farmacocinético, entre o uso intraperitoneal de cisplatina (CDDP) *versus* oxaliplatina (1-OHP). A partir da substituição de um radical amina e clorida da molécula de cisplatina, no sentido de se obter menor toxicidade, principalmente renal, e maior efeito citostático se obteve a oxilaplatina, que além das vantagens acima, também não mostrou resistência cruzada com a cisplatina. Considerando-se que estudos prévios demonstraram que havia uma limitação na

profundidade de penetração dos citostáticos nos tumores peritoneais, se impunha a obtenção de drogas que permitissem um uso com doses mais altas. Nesse estudo foram avaliados ratos com tumores da linhagem CC 531 implantados no peritoneo, segundo técnica já padronizada⁷⁰. Após 28 dias da inoculação foi iniciado tratamento ip com cisplatina e oxalaplátin, respectivamente nas doses de 5 mg/kg e 6.6 mg/kg. Foram retirados fragmentos do tumor 4, 24 e 168 horas após o tratamento. Também colhidas amostras de sangue arterial e dosadas suas concentrações. Quando avaliada a biodistribuição de platina comparada com oxalaplátin, não foi constatada diferença significativa na concentração tumoral entre CDDP e 1-OHP, com a diferença aparente de que com a última há distribuição mais homogênea no tecido tumoral, e também que apesar de a concentração máxima de 1-OHP se estabelecer mais tardiamente no plasma, o seu clareamento é mais lento que o da CDDP, o que anula a vantagem inicial da primeira em relação a toxicidade. Também não houve diferença entre a penetração das drogas nos tumores peritoneais, dado que as dosagens foram semelhantes na periferia e no centro da lesão com a utilização de CDDP e 1-OHP. A impressão de que a condição de estrutura lipofílica da 1-OHP seria decisiva para a penetração na estrutura tumoral não foi confirmada, o que indica que há outras propriedades químicas relevantes além dessa. Em conclusão, se observou que não há diferença objetiva na resposta entre essas duas drogas, bem como se questionou a sua vantagem em relação a nefrotoxicidade. Por outro lado a inexistência de resistência cruzada com CDDP permite a utilização alternativa e seqüencial da 1-OHP quando se esgota a resposta à cisplatina⁶⁹.

O estudo de outras drogas para uso intraperitoneal foi avaliado em 1991, pelo Instituto de Câncer Holandes. Foram comparadas doses equimolares de cisplatina (CDDP) e carboplatina (CBDCA) quando foi verificado que o grau de penetração tumoral era menor com CBDCA em relação a esse grau quando utilizada CDDP. Apesar de haver uma vantagem farmacocinética da primeira com um grau de clareamento peritoneal menor, no total de efeitos considerados predominou a vantagem da CDDP. Carboplatina é um análogo da cisplatina, menos nefrotóxico, neurotóxico e emetogênico que ela. Em estudos clínicos a CDDP mostrou-se eficaz em tumores localizados no peritoneo e foi claramente demonstrada a vantagem do

seu uso por via intraperitoneal em relação à via venosa. Doses de até 200mg/kg podem ser utilizadas intraperitonealmente. As vantagens conhecidas do CBDCA em relação à CDDP levaram à realização de estudos comparativos. Os primeiros estudos mostraram vantagem farmacológica da carboplatina, expressa pela eliminação mais lenta na cavidade peritoneal, portanto ação por tempo mais prolongado, bem como uma menor ligação dessa droga às proteínas, o que também caracterizava vantagem.

Também a alta estabilidade e a solubilidade em água foram benefícios observados nessa droga. Foram avaliadas as propriedades de penetração tumoral da CBDCA e a sua ação *in vitro*. Foram também mensuradas a concentração no tumor, nas células e a distribuição da mesma. Baseado em modelo já conhecido de implante do tumor experimental CC 531 foi feito uso ip de CDDP na dose de 5mg/kg ou CBDCA em dose escalonadas de 6 a 49.2mg/kg durante quatro semanas. Foram colhidas amostras de tecidos do fígado, rim, baço e intestinos e também amostras tumorais com intervalos de 4 a 168 horas após o tratamento. Como resultado se obteve que havia uma concentração celular sete vezes maior de CDDP do que de CBDCA. Nos tumores peritoneais nos ratos também houve um achado de sete vezes maior concentração de CDDP, inclusive em doses de níveis equitóxicos (5mg/kg e 30mg/kg para CDDP e CBDCA, respectivamente). Em relação à distribuição tumoral, utilizando PIXE com scan da periferia para o centro do tumor foi notada marcante diferença entre as duas drogas. Não só houve uma concentração maior de CDDP em relação a CBDCA, em um fator de sete vezes, como a concentração da última no centro do tumor foi indetectável. Também foi verificado que a disposição do CDDP foi mais homogênea, o que pode ser atribuído à solubilidade das drogas, entre outros fatores, pois foi demonstrado que o CDDP é mais solúvel em lipídios que o CBDCA, o que implica em melhor passagem do primeiro através de membranas. Além disso, o fato que o CBDCA tem maior peso molecular que o CDDP pode ter contribuído para essa diferença. Outro fator relevante é a pressão intersticial no tumor, que é, sabidamente, maior no centro que na periferia, fato que também deve ser considerado nesse contexto. O estudo da farmacocinética das duas drogas demonstrou uma AUC (área under the curve) maior no grupo que utilizou CBDCA, com maior tempo de "clearance" da droga tanto no plasma como no peritônio, o que

expressa uma vantagem farmacológica dessa droga. Observou-se também que o nível de ambas as substâncias permaneceu nos tumores peritoneais por pelo menos sete dias, o que corresponde ao dobro do tempo de meia vida dessas drogas no plasma, sendo verificado que, também nesse tópico havia vantagem da CDDP sobre a CBDCA. Em conclusão, no conjunto de fatores considerado, não foi demonstrada vantagem com relevância terapêutica do uso de CBDCA sobre a CDDP. A partir dessa constatação a cisplatina foi considerada uma droga adequada para implementação de estudos farmacocinéticos de uso intraperitoneal⁵⁰.

No sentido de buscar condições que otimizassem o uso dessa droga foi acrescentada a hipertermia ao arsenal de recursos utilizados. Dessa maneira, em 1993, Los realizou estudo que associou ao uso de cisplatina a hipertermia, usados intraperitonealmente. Baseado no princípio, já reconhecido, de que a hipertermia aumenta a permeabilidade da membrana celular às drogas, incrementa o transporte celular das mesmas e modifica o metabolismo celular, somado aos fatos de que a hipertermia modifica a farmacocinética da excreção e aumenta a citotoxicidade, os autores elaboraram um modelo de associação de um quimioterápico eficiente e de efeitos já conhecidos (cisplatina) à hipertermia. Apesar de os mecanismos de ativação das drogas pela hipertermia não serem totalmente conhecidos é sabido que o calor, dentro de certos limites, aumenta a reação das drogas com o DNA e induz a inibição do reparo do DNA. Em estudos iniciais, observou-se que a cisplatina, por si só nefrotóxica, tem esse efeito aumentado quando associada à hipertermia de corpo inteiro, mas se descreveu que o uso regional do calor é menos nocivo, pois há uma ação apenas na região tratada. Apesar disso, verifica-se certa toxicidade sistêmica com a associação de CDDP ip e hipertermia, que, mesmo assim é menor que com o uso sistêmico dessa droga. Um efeito adicional favorável da hipertermia regional, é a diminuição do fluxo esplâncnico da droga, o que retarda a absorção sistêmica da mesma, diminuindo a toxicidade. Foram utilizados ratos Wag/Rij submetidos a implante intraperitoneal do tumor CC 531. O tratamento foi iniciado 28 dias após o implante, utilizando 5mg/kg de CDDP diluído em 20ml de NaCl a 0.9% por via ip aquecida a temperaturas escalonadas de 37, 40 e 43 graus Celsius, média de 41,5°C por 60 minutos. Foi testada sensibilidade *in vitro* do tumor CC 531 à CDDP a 37, 40 e

43 graus e testada clonogenicidade com adição de CDDP após 24 horas. Observou-se que a oferta de CDDP foi aumentada com as temperaturas de 40 e 43 graus numa razão de 3.2 vezes mais de 37 para 40°C e de 3.4 vezes mais de 37 para 43°C. Também verificado que nessas circunstâncias de hipertermia havia um decréscimo da sobrevivência celular e um acréscimo na concentração intracelular de CDDP. Em relação à concentração de CDDP nos tecidos foi verificada especial diferença entre a concentração da droga nos intestinos em relação ao tumor, o que foi atribuído ao menor fluxo esplâncnico associado à hipertermia e também observado que houve uma menor concentração proporcional nos rins do que no tecido tumoral. Não obstante houve uma maior nefrotoxicidade no grupo tratado por hipertermia. O dado mais relevante disse respeito à distribuição do CDDP nos tumores peritoneais após seu uso isolado ou associado à hipertermia, o que foi feito medindo os níveis de CDDP através do PIXE em várias secções do tumor. Em todos os pontos medidos a medição intratumoral de CDDP foi maior no grupo que recebeu hipertermia, numa razão de 4.1 vezes maior. Além disso, não houve gradiente tecidual de CDDP no grupo tratado com hipertermia, o que demonstra uma penetração tumoral mais homogênea nesse grupo. Há também um efeito adicional de citotoxicidade, promovido pelos níveis sanguíneos mais elevados de CDDP na hipertermia, conseqüentes ao menor fluxo esplâncnico renal¹⁵.

Apesar da comprovada superioridade do CDDP sobre o CBDCA em condições experimentais, como já descrito acima, a possibilidade de efeito aditivo entre essas duas drogas foi estudada em 1994 por Los , considerando que ambas, em separado, tem comprovado efeito antineoplásico intraperitoneal. É sabido que a penetração da droga no tecido tumoral, associada linearmente à concentração de platina, pode sofrer efeito negativo da resistência tumoral, portanto recursos para maximizar a concentração intratumoral de platina, inclusive com a associação de diferentes derivados da mesma tem relevância. Investigou-se a combinação de CDDP e CBDCA no tratamento de tumores no peritônio de ratos e se avaliou o grau de resposta dessa associação. Foram estudados ratos machos Wag/Rij que foram implantados com células do tumor CC531 injetadas por via peritoneal. Em incubação de células do tumor CC 531 *in vitro* já foi mostrada concentração intracelular de

platina maior nas células submetidas às duas drogas em conjunto de que quando utilizadas separadamente e que nas células residuais após tratamento havia um maior número de células mortas no grupo de tratamento combinado, em número de até 50 % a mais nesse grupo. A capacidade de ligação do CDDP e CBDCA ao DNA foi testada em células de salmão e foi demonstrada maior ligação da platina ao DNA quando usadas as drogas associadas. Os estudos de toxicidade mostraram a necessidade de redução da dose do CDDP em 20%, quando usado da forma combinada e a manutenção das doses de CBDCA, apesar de sua conhecida dose-limite tóxica por mielossupressão, com plaquetopenia e leucopenia. A avaliação da diminuição do crescimento tumoral foi quantificada partir do implante de fragmento do tumor CC 531 medindo 2.5mm de diâmetro e a mesma dimensão de espessura fixado com hemoclipse na face interna da parede abdominal anterior. No décimo dia após o implante os ratos foram tratados com a dose de 3.5mg/kg de CDDP e 30 mg/kg de CBDCA por via ip em associação ou isoladamente além de um grupo em que foi feita CDDP ip e CBDCA iv. Foram feitas laparotomias a cada duas semanas com medição da média dos diâmetros tumorais. Foi demonstrado retardo no crescimento tumoral no grupo de associação de drogas de 30.2 dias, em comparação com 10.5 dias no grupo que usou CBDCA isolada e 16.1 dias no que usou somente CDDP, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Não se pode desconsiderar que a interação entre derivados de platina pode ser sinérgica, aditiva ou ainda antagonística, dependendo da linhagem celular envolvida. Outro fator importante relatado pelos autores, foi o fato de que, considerando que a penetração tumoral a partir do uso intraperitoneal de citostáticos se faz em extensões limitadas (até 2 mm) é necessária a associação de droga com níveis plasmáticos adequados, que permitam uma alta concentração do citostático no tecido intersticial que se situa em torno dos vasos que nutrem o tumor. Consoante com esse princípio, foram obtidos no presente estudo níveis máximos de concentração tumoral com a associação da CDDP ip ao CBDCA ip e iv⁷¹.

Em 1993, o mesmo autor estabeleceu a importância das ligações entre o DNA e os derivados da platina, ressaltando a relevância das regiões GC do DNA na formação de conexões monofuncionais e bifuncionais. Essas ligações têm relação com

a capacidade citotóxica. Mas outros fatores, como a capacidade de reparo do DNA e a habilidade da DNA polymerase de bloquear a reação do DNA com o CDDP devem ser levados em conta. Aparentemente o número de ligações de platina com DNA pode ser incrementado com o calor. É reconhecida a capacidade da hipertermia de potencializar os efeitos citotóxicos do CDDP e CBDCA. Explicações possíveis são o aumento da permeabilidade da membrana celular, a ativação do transporte transmembrana da droga e alterações do metabolismo celular causados pelo calor, causando aumento da interação droga - DNA e inibição do reparo do DNA. Foi avaliado o efeito do calor nas ligações do DNA com derivados de platina, o seu reflexo na concentração intracelular dessas drogas e a sobrevida. A quantificação das ligações platina - DNA foram medidas por teste de imunocitoquímica - peroxidase. Utilizada incubação de células de tumor CC531 submetidas a temperaturas de 37 a 43°C por uma hora e à ação de CDDP e CBDCA. Depois as células do tumor foram fixadas e preparadas para análise imunocitoquímica das ligações do DNA. Notado incremento linear das ligações dos derivados de platina com o DNA com o aumento da temperatura. Por outro lado foi constatada diferença na oferta de CDDP em relação à CBDCA, pois na primeira temperatura acima de 37°C já provocavam aumento da oferta de platina, enquanto na última temperaturas acima de 41.5°C foram necessárias para obter o mesmo resultado, o que pode se dever ao fato de que a CBDCA é menos lipofílica que a CDDP, implicando numa menor capacidade de difusão da primeira. Em conclusão, foi observado que a platinação do DNA era secundária a um incremento na concentração intracelular da droga e não à estimulação de ligações da droga ao DNA¹⁵.

Ainda do mesmo laboratório, em 1994, foi estudada associação de hipertermia ao uso ip de cisplatina ou carboplatina, comparativamente. Observado que há uma conclusão universal que, apesar de comprovado incremento de concentração de citostáticos usados por via ip a penetração direta dessas drogas no tumor é limitada, e se faz no máximo até 3mm a partir da superfície tumoral. Dessa forma, a capacidade de penetração depende também da droga ofertada pela circulação sistêmica. Essencialmente, as drogas de uso ip cujo limite de toxicidade é sistêmico não permitem acréscimo de utilização por via iv, dada a somação de

toxicidade. Esse é o caso de CDDP e CBDCA, que tem efeitos sistêmicos após o uso ip que limitam a dose a ser ofertada. Na verdade, estudos farmacocinéticos em cobaias e humanos demonstraram que a exposição sistêmica a essas duas drogas era idêntica com uso ip ou iv. O uso ip foi reservado para pacientes que falharam após o uso iv. Foi demonstrado que pacientes com doença microscópica, ou doença residual menor que 0.5cm apresentam maior sobrevida após quimioterapia ip, e, não obstante, essas respostas são temporárias, pois esses paciente virão a recorrer no peritoneo. Dessa forma, a utilização de hipertermia é uma maneira de maximizar o efeito local dessas drogas, através de alterações ultraestruturais da membrana celular, incremento do transporte de drogas através da membrana e mudanças no metabolismo celular, pois foram notadas drásticas alterações do equilíbrio entre lipídeos e proteínas com modulação dinâmicas de atividades entre os mesmos. Além disso, já foi demonstrado incremento da citotoxicidade do CDDP e CBDCA com o calor, com um resultado final de retardamento do crescimento tumoral. Foram utilizados ratos Wag/Rij submetidos a transplante intraperitoneal do tumor CC 531 na concentração de 2×10^6 células e implantados fragmentos de 2.5mm fixados na parede abdominal anterior com hemoclipes. Iniciado tratamento 10 dias após o implante. Realizada hipertemia intraperitoneal a 41.5 graus durante 60 minutos e utilizadas doses escalonadas de CDDP (3 a 7mg/kg) e CBDCA (30mg/kg). Avaliada nefro e mielotoxicidade. Como resultado se obteve que foi necessária redução de 33.3% da dose de CDDP para evitar nefrotoxicidade semelhante a 41.5°C quando comparada a 37°C. Também observado dano ao DNA num incremento de medida de 20 para 54 com o uso de hipertermia para o CDDP e de indetectável para 30 no CBDCA. Em relação à concentração de platina foi observado um índice 2.2 vezes maior com CDDP e três vezes maior com CBDCA quando utilizada a hipertermia. No que se refere ao crescimento tumoral, verificou-se que houve retardo de 40 dias em condições de hipertermia com uso de CDDP e de 22 dias no caso da CBDCA⁷¹.

Todos esses estudos lançaram as bases para a compreensão da terapia antineoplásica intraperitoneal e firmaram sólido fundamento para experimentos futuros nessa direção. Por esse motivos são estimulados os modelos farmacocinéticos

para utilização de drogas intraperitonealmente com base na sua ação nesse território⁷².

2.1.8 Uso de vegetais e seus derivados como agente terapêutico em humanos

A utilização de plantas com finalidade terapêutica se reporta às épocas mais remotas da espécie humana. Na pré-história o homem já utilizava vegetais para fins medicinais. Escritos milenares como o Livro Sagrado Indiano (Vedas) e o Grande Livro da Ervas chinês, têm seus ensinamentos ainda hoje utilizados pelas populações desses países e de outras regiões do mundo^{74,75}.

Apesar de um certo declínio no interesse por esse assunto, causado pela descoberta dos antibióticos na segunda década do século XX, secundada pela produção de fármacos sintéticos no período da 2ª guerra mundial, a fitoterapia hoje, amparada pela ciência moderna, reassume importante papel. Os motivos desse novo despertar se concentram nos países pobres, onde, muitas vezes, a utilização de plantas medicinais é a única alternativa disponível, mas também nos países ricos, pressionados por insuportáveis custos dos medicamentos e em busca de uma alternativa terapêutica economicamente mais atrativa⁷⁶.

Além disso, os fitoterápicos tem importância econômica, pois sua produção e venda totalizam um valor estimado de U\$ 22 bilhões ao ano e um crescimento anual de 12%, sendo os maiores mercados compradores os Estados Unidos da América e Alemanha. Em nosso país as informações disponíveis, referentes ao ano de 2001, relatam um volume anual de vendas da ordem de U\$ 550 milhões e um crescimento de 10 % ao ano⁷⁷.

Ressalte-se também a importância das plantas medicinais em pesquisas farmacológicas para o desenvolvimento de drogas e não somente como agente terapêutico direto, pois as mesmas podem servir como matéria prima para que se sintetizem compostos farmacologicamente ativos. Por outro lado, calcula-se que aproximadamente cinquenta milhões de brasileiros não tem acesso a medicamentos, o que amplifica a importância do uso dos fitoterápicos nessas populações⁷⁸.

2.1.9 Políticas mundiais e brasileiras para uso de fitoterápicos

Ao final da década de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou o Programa de Medicina Tradicional (Alma-Ata) que recomenda aos estados-membros o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa aos sistemas nacionais de atenção à saúde, assim como promover o uso racional dessa integração. Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas⁷⁷.

A Assembléia Mundial de Saúde, em 1987, reiterou as recomendações feitas pela Alma-Ata e recomendou aos estados-membros iniciarem programas amplos relativos à identificação, avaliação, preparo, cultivo e conservação de plantas usadas na medicina tradicional, além de assegurar a qualidade das drogas derivadas de medicamentos tradicionais extraídas de plantas, pelo uso de técnicas modernas e aplicação de padrões apropriados e de boas práticas de fabricação (BPF)⁷⁹.

A OMS reforçou a importante contribuição da medicina tradicional na prestação de assistência social, especialmente às populações que têm pouco acesso aos sistemas de saúde, e solicitou aos estados-membros que intensificassem a cooperação entre praticantes da medicina tradicional e da assistência sanitária moderna, principalmente no tocante ao emprego de remédios tradicionais de eficácia científica demonstrada, a fim de reduzir os gastos com medicamentos. Sugeriu, também, que todos esses remédios fossem aproveitados plenamente e que os produtos naturais, em particular os derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas⁸⁰.

Em sua estratégia global sobre medicina tradicional e medicina complementar e alternativa para o período 2002/2005, a OMS reforçou o compromisso em estimular o desenvolvimento de políticas públicas com o objetivo de inseri-las no sistema oficial de saúde dos seus 191 estados-membros. Tal propósito

é firmado porque atualmente apenas 25 estados-membros, entre os quais não se inclui o Brasil, desenvolveram uma política nacional de medicina tradicional como forma de fortalecer a atenção sanitária e de contribuir para a reforma do setor saúde⁷⁷.

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais⁸⁰.

Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais⁸¹.

É reconhecido que apenas cerca de 10% das 250.000 espécies de plantas complexas existentes no mundo foram devidamente investigadas e tiveram suas características químicas e farmacológicas definidas^{80,81}.

No intuito de estabelecer as diretrizes para a atuação do governo brasileiro na área de plantas medicinais e fitoterápicos, elaborou-se a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, que se constitui parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social, como um dos elementos fundamentais na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira⁷⁸.

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, correspondendo de 15 a 20% da reserva mundial, fato associado a uma rica diversidade étnica e cultural. Além disso, nosso país detém um valioso conhecimento tradicional relacionado ao uso de plantas medicinais, ensejando o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. Embora o Brasil possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais⁷⁵.

Outro fator de grande relevância para o desenvolvimento do setor é que o Brasil possui 4,8 milhões de estabelecimentos agropecuários e, desse total, mais de 4,1 milhões (85,1%) são de agricultores familiares, que respondem pela maior parte dos empregos no meio rural e por grande parte dos alimentos produzidos

diariamente. A agricultura familiar representa mais de dois terços dos postos de trabalho no campo. De um total de 17,3 milhões de trabalhadores ocupados na agricultura, mais de 13 milhões trabalham em regime familiar⁷⁴.

Entre os fatores cruciais admitidos na implementação das políticas referentes ao uso de fitoterápicos, deve-se ressaltar a necessidade de minimização da dependência tecnológica e do estabelecimento de uma posição de destaque de nosso país no cenário internacional. Nesse sentido, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações pelos diversos parceiros em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde. Também no ano de 2006 foi editada a Portaria 971, que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde⁷⁵.

Ressalte-se que, desde 1991, em consonância com as iniciativas para a inclusão da fitoterapia no SUS, o Conselho Federal de Medicina (CFM), reconheceu a atividade de fitoterapia, desde que desenvolvida sob a supervisão de profissional médico. Em 1992, formalizou essa prática como método terapêutico, o que exigiu supervisão do Estado e apresentou a necessidade de regulamentação para a formação de recursos humanos. Por sua vez, a então Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde instituiu e normatizou o registro de produtos fitoterápicos no ano de 1995⁷⁵.

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos é baseada, inclusive, nas disposições da OMS e do Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef), que promoveram a Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde em Alma-Ata (Genebra, 1978), quando foi definida a formulação de políticas e regulamentações nacionais referentes à utilização de remédios tradicionais de eficácia comprovada e exploração das possibilidades de se incorporar os detentores

de conhecimento tradicional às atividades de atenção primária em saúde, fornecendo-lhes treinamento correspondente⁷⁸.

Por outro lado, não há controle ou comprovação das propriedades farmacológicas das plantas medicinais no Brasil. A comercialização indiscriminada de plantas, ditas medicinais, em feiras livres e mercados do nosso país implica na indicação e uso inadequado das mesmas. A toxicidade dessas plantas é um sério problema de saúde pública. Adulterações e interações com outras drogas podem ocorrer. As pesquisas para avaliação de segurança e o controle da comercialização são precários, inclusive nas lojas de produtos naturais⁷⁵.

Na tentativa de normatizar métodos de para estudos de toxicologia pré clínica no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou, em 2004, a resolução número 90 designada “Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”⁷⁵.

Todos esses fatos demonstram, cabalmente, a importância do estudo científico das plantas e seus derivados no tratamento das doenças humanas, o que requer empenho e comprometimento institucional dos centros de pesquisa brasileiros nessa direção.

2.1.10 Uso de fitoterápicos no tratamento das neoplasias

É reconhecida a importância de derivados de plantas como agentes antineoplásicos. Dessa forma, medicamentos de uso corrente na prática oncológica, como Vincristina, Vinblastina e Plactaxel tem essa origem⁷⁹.

Vincristina é um alcaloide encontrado em certas plantas apocináceas relacionadas à vinca. Sob a forma de sulfato de vincristina 1mg (Oncovin[®]) é amplamente utilizada na prática oncológica no tratamento das leucemias, linfomas e outros tumores como sarcomas¹².

Vinblastina (DTIC[®]) é um agente alcalóide antineoplásico derivado da vinca. Foi inicialmente produzida a partir de extratos da planta *Catharanthus roseus* e teve suas propriedades antitumorais descritas a partir de 1959 quando eram investigadas ações hipoglicemiantes dessa substância e foi observado efeito mielossupressor e

antileucêmico. Sob a forma de sulfato de vinblastina 10 mg é amplamente utilizado no tratamento dos linfomas, tumores de testículo e nos coriocarcinomas⁷⁹.

O Paclitaxel (Taxol[®]) foi descoberto em 1967, quando foi isolado seu componente na casca da árvore Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*). Observada atividade antitumoral em uma ampla variedade de tumores de roedores. A sua ação se faz pela fixação à proteína tubulina dos microtúbulos e torna a célula incapaz de usar seu citoesqueleto de maneira flexível. Pesquisas adicionais indicaram que o paclitaxel induz à apoptose através de sua ligação com a proteína inibidora da apoptose Bcl-2 (B-cell Leukemia 2), o que a impede de exercer sua função. Importante impacto ambiental e limitação da produção da árvore *Taxus brevifolia* levaram os pesquisadores a desenvolver uma bactéria (*Streptomyces coelicolor*) que fermenta um componente similar ao paclitaxel. Em 1970, foi determinada a estrutura do paclitaxel, que é extremamente complexa. É amplamente utilizado na prática oncológica atual para tratamento dos tumores de ovário, mama, neoplasias de pulmão não pequenas células e sarcomas de Kaposi⁷⁸.

Os análogos etoposídeos (VP-16-213, Vepesid[®]) e teniposídeo (VM-26, Vumon[®]), também tem grande importância nesse contexto⁸¹.

O mercado desses fármacos movimentava aproximadamente U\$ 50 bilhões por ano, o que justifica a busca de novas substâncias bioativas, reativando o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas em um processo sintético de custo racional⁷⁸.

Há muitas outras substâncias atualmente estudadas e com ampla perspectiva de utilização médica e oncológica, prenunciando a importância crescente dos medicamentos derivados de vegetais, muitos destes já utilizados empiricamente, com outras finalidades, pela população de diversos países, inclusive do Brasil^{78,82}.

Dada a enorme biodiversidade do nosso país certamente há um vasto leque de possibilidades que necessitam ser exploradas e cientificamente avaliadas. Evidentemente, para que se obtenha um produto final para uso clínico é necessária uma longa trajetória laboratorial e experimental em animais para que se possam utilizar esses medicamentos de forma segura e eficiente. Dessa forma, estudos

experimentais procuraram traçar diretrizes nesse sentido. Dados recentes demonstraram a importância de derivados de plantas na prevenção e tratamento de tumores. Inúmeras citações na literatura destacam essa realidade^{82,86}.

Yoon, em 1995, descreveu o uso do extrato aquoso da planta *Viscum album coloratum* (Korean mistletoe), denominado KM-110 em ratos portadores de metástases de melanomas B16-BL6, tumores de colon 26-M3.1 e linfomas L5178Y-ML25. A administração intravenosa do KM-110 na dose de 100µg/animal um dia após a inoculação do tumor provocou significativa inibição das metástases pulmonares dos referidos tumores. Também foi observada a inibição do crescimento das metástases hepáticas e esplênicas. Por outro lado foi obtida expressiva redução do tumor primário. Análise *in vivo* da angiogênese mostrou redução dos vasos relacionados com o tumor no grupo tratado com KM-110. Foi observado que macrófagos peritoneais estimulados por KM-110 por 30 minutos apresentaram intensa atividade do fator de necrose tumoral (TNF-α). Outrossim, foi observada inibição do crescimento *in vitro* de células endoteliais no grupo exposto ao KM-110⁸⁴.

Mais recentemente, se multiplicaram estudos descrevendo a ação de derivados de plantas sobre tumores. Por exemplo, Thoppil, da Universidade de Ohio (USA), em 2011, descreveu que substâncias fito-químicas denominadas terpenoides (também designadas isoprenoides) utilizadas na medicina tradicional na Índia e na China, foram testadas como agentes anticancerígenos em estudos clínicos. Muitas dessas substâncias exibem atividade citotóxica contra uma variedade de células tumorais. Foram definidos, a partir de estudos *in vivo* e *in vitro*, efeitos objetivos na prevenção e tratamento do câncer de fígado⁸⁵.

Em 2011, Asensi descreveu os polifenóis, que são metabólitos secundários de plantas envolvidos na defesa contra diferentes tipos de stress. Extratos com esses componentes são usados há milhares de anos na medicina tradicional oriental. Essas substâncias agem sobre múltiplos alvos nos mecanismos relacionados com a carcinogênese, proliferação celular, apoptose, metastatização e angiogênese. Foi estabelecida correlação entre os efeitos *in vitro* e *in vivo*, além de toxicidade e biodisponibilidade. Observados efeitos antineoplásicos objetivos em melanomas, tumores dos colons e do pulmão. Foram estabelecidas possíveis fórmulas

farmacêuticas, com as respectivas modificações estruturais e suas combinações, bem como as doses e meios de administração no sentido de incrementar seus efeitos biológicos⁸⁶.

Efeitos de derivados de plantas sobre tumores específicos foram estudados com metodologia detalhada e recursos tecnológicos avançados. Rasul, em 2012, estudou o efeito do Magnolol, um componente natural com propriedades antineoplásicas, sobre células de adenocarcinoma gástrico humano denominadas EGC-7901. Analisados apoptose, potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular através de citometria de fluxo. A expressão proteica de Bcl-2, Bax, caspase-3 e PI3K/Akt também foram avaliados. Constatado que o Magnolol induz modificações morfológicas nas células EGC-7901 e os efeitos citotóxicos são ligados a dano no DNA, apoptose e parada da duplicação na fase S. Verificado que esses efeitos são dose - dependentes. Adicionalmente, Magnolol induz autofagia nas células EGC-7901 e apoptose relacionada às vias mitocondriais dependentes de PI3K/Akt. Esses achados produziram evidências de que o Magnolol é um promissor componente no tratamento do câncer gástrico e demanda estudos “in vivo” como monoterapia ou terapia combinada na abordagem dessa neoplasia⁸⁷.

Em outras linhagens tumorais também foi verificado efeito antineoplásico de derivados de plantas. Ellis, em 2011, demonstrou que a Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), principal componente polifenólico do chá verde, com reconhecidas propriedades anti-inflamatórias, anti-oxidantes, anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas tem efeito contra as células do melanoma maligno. Nesse estudo foi demonstrado que a EGCG inibe o crescimento das células do melanoma em doses fisiológicas (0.1 a 1 uM). Verificado que a redução do NF-kB é associada com um decréscimo da produção de Interleucina -1 B pelas células tumorais. Constatado também que os “inflamosomas”, que estão envolvidos a produção de Interleucina -1B, sofrem um decréscimo provocado pela EGCG. A ação *in vivo* e *in vitro* sobre os “inflamosomas” indica um papel chave da EGCG na inibição tumoral. Também foi ressaltada a importância dos “inflamosomas” e da Interleucina -1B como alvos potenciais para futuras terapias no melanoma maligno⁸⁸.

Em relação aos tumores da próstata Liu, em 2011, demonstrou, em culturas de células estromais e epiteliais de tecido prostático, o efeito do Fator Transformador de Crescimento B1 (TGF-B1) na elevação do metabolismo da dehydroepiandrosterona (DHEA) em sua transformação para andrógenos e Antígeno Prostático Específico (PSA). Constatado que as “red clover isoflavonas” (RC) inibem a indução da androgenicidade pelo TGF-B1. Analisadas três dehydrogenases, 3 β -HSD, HSD-17B1 e HSD-17B5, envolvidas no metabolismo da DHEA para testosterona. Constatado que a depleção dos HSD reduz o TGF-B1. Esses dados sugerem uma via conectando uma superprodução de TGF B com o aumento do PSA no câncer de próstata, o que pode ser minorado com o uso de isoflavonas⁸².

No que se refere ao câncer do colo uterino, tumor de grande impacto epidemiológico em nosso meio e segundo tumor feminino mais freqüente no mundo, Zhang, em 2011, estudou a influência da framboesa preta e seus derivados na inibição de modelos pré-clínicos de tumores epiteliais e na formação de tumores nessa região. Analisou três linhagens de células tumorais cervicais humanas, designadas HeLa (HPV16-/HPV18+, adenocarcinoma), SiHa (HPV16+/HPV18-, carcinoma de células escamosas) e C-33A (HPV16-/HPV18-, carcinoma de células escamosas). Essas amostras foram tratadas com extrato etanólico liofilizado de framboesas pretas (RO-ET) nas doses de 25, 50, 100 ou 200 μ g/ml por 1, 3 e 5 dias. A proliferação celular foi medida com ensaio WST1. Citometria de fluxo e análise por microscopia de fluorescência foram utilizados para medir as mudanças apoptóticas celulares. Não foram verificados efeitos tóxicos com o uso do RO-ET e foi constatada inibição significativa no crescimento das células tumorais de maneira dose e tempo-dependentes e que o efeito antineoplásico se manteve após curta permanência do RO-ET no meio de cultura. A citometria de fluxo e a microscopia de fluorescência demonstraram apoptose em todas as linhagens celulares²⁸.

2.1.11 Uso experimental de fitoterápicos no tratamento da carcinomatose peritoneal

A utilização de plantas e seus derivados no tratamento dos tumores peritoneais tem como base o conhecimento empírico e milenar da utilização dessas

substâncias no tratamento de neoplasias. A partir do conhecimento prévio de que alguns componentes da dieta poderiam prevenir e/ou suprimir o desenvolvimento de tumores, pôde-se, por exemplo, identificar os efeitos inibidores do crescimento tumoral a partir do uso de arginina na dieta de ratos portadores de fibrosarcoma UCLA e sarcomas de Jensen⁷⁹.

O mesmo efeito inibitório do crescimento tumoral com a suplementação dietética de arginina foi verificado em tumores do tipo sarcoma 180 em ratos. Sabe-se que esse aminoácido participa dos processos de crescimento dos tecidos normais, e sua supressão na dieta provocaria redução da expansão de tecidos neoplásicos. Alega-se também que ela pode interagir com outros carcinogênicos⁷⁷.

Também foi documentada a redução do número de células neoplásicas no líquido ascítico do tumor experimental L1210 com a utilização de dietas pobres em fenilalanina⁷⁹.

Choy, em 1983, descreveu o uso de derivados de plantas no tratamento da carcinomatose peritoneal. Esse autor estudou o possível efeito antineoplásico do alho associado a um composto manufaturado de uma planta (*Selaginella Doerdeleinii* Hieron), combinado a um produto contendo como principal ingrediente o vegetal *Olderlandia diffusa* e de outro composto derivado de ervas denominado Anticancerlin. Foram utilizados ratos suíços machos com 30 dias submetidos à inoculação intraperitoneal de 0.2 ml de líquido ascítico com 3×10^5 células de carcinoma de Ehrlich. Iniciada oferta dos componentes acima citados quatro dias antes da injeção das células. O grupo controle foi submetido a aplicação intraperitoneal de volume similar de células tumorais e submetido a dieta padrão. Foi observado comportamento dos animais durante dez dias, quando foram eutanasiados e feita medição do volume ascítico e contagem do número total de células com hemocitômetro. Posteriormente foram isolados os componentes lisina, histidina e metionina que demonstraram, isoladamente, efeito antineoplásico e foi estudado um novo grupo de animais com a injeção ip do mesmo volume de células acima referido, mas com a oferta apenas desses componentes isolados e do alho. Observado efeito máximo de redução na contagem das células com a Histidina (82% de inibição) seguida pela Lisina (80%), Metionina (65%) e alho (59%)⁸⁷. Notado que a

baixa solubilidade da Lisina e Histidina era um fator limitante em relação às doses utilizadas. Por outro lado, o tempo de sobrevivência foi ampliado no grupo experimental, obtendo-se um aumento máximo com a Lisina (9 dias) e mínimo com o alho (2 dias). O mecanismo exato de ação dessas substâncias não foi identificado, o que demanda experimentos complementares⁸⁹.

Koshiura , em 1985 , avaliou a atividade antitumoral do extrato de metanol da raiz da *Agrimonia pilosa* Ledeb (AP-M) sobre o sarcoma 180, o met - a Fibrosarcoma e o carcinoma mamário MM-2. Houve inibição do crescimento do sarcoma 180 na forma ascítica após uso intraperitoneal do AP-M e aumento da sobrevivência dos animais. Também no carcinoma mamário MM-2 foi demonstrada intensa citotoxicidade do AP-M *in vitro* e aumento da contagem periférica de glóbulos brancos dois a cinco dias após a injeção intraperitoneal dessa substância. Verificou-se também que as células peritoneais exsudativas adquiriam atividade citotóxica contra o referido tumor. Constatou-se que, além da atividade citotóxica direta do AP-M há mecanismos antineoplásicos sistêmicos mediados pelo hospedeiro a partir do estímulo dessa substância⁸³.

Hirazumi , em 1994, utilizou extrato alcoólico da raiz da planta *Morinda citrifolia* introduzido no peritônio de ratos submetidos previamente a injeção intraperitoneal de solução de 2×10^5 células de carcinoma de Lewis. A injeção ip do extrato alcoólico foi feita diariamente durante quatro dias e foi avaliada a sobrevivência em 50 dias e a evolução da ascite tumoral. Observado que o grupo de animais tratados com o extrato da *Morinda citrifolia* teve um prolongamento de sobrevivência de 40% em relação ao grupo controle e que esse grupo tratado com fitoterápico, quando comparado a animais em iguais condições que se submeteram a quimioterapia convencional com adriamicina e cisplatina também teve significativa melhora na sobrevivência e no controle da ascite⁹⁰.

Em 1995, Babu , descreveu as propriedades citotóxicas e antitumorais da planta *Centella asiática* (L.) Urban, predominante no hemisfério sul, a qual produz um óleo essencial e um glicosídeo flavonoide, com reconhecidas propriedades antitumorais. Utilizado o extrato bruto e frações parcialmente purificadas do mesmo, empregados por via oral. Diluída porção desidratada em metanol a 80%, purificado

em coluna de sílica gel e tratado com solvente de diferentes polaridades. Utilizados ratos suíços albinos de 6-7 semanas. Observado que a fração purificada, de maneira dose-dependente, inibia a proliferação do carcinoma de Ehrlich e do linfoma de Dalton, ambos na forma ascítica. Não foram verificados efeitos tóxicos com as doses utilizadas. Foi sugerido que frações do extrato atuam diretamente na síntese do DNA⁹¹.

Gupta, em 2000, estudou a atividade antitumoral da *Cassia fistula* L., planta encontrada em muitas regiões da Índia e cujas sementes são popularmente usadas para tratamento de icterícia, dermatoses e como anti-inflamatório. Os componentes químicos dessa planta foram previamente identificados, sendo destacados o galactomannan, taninos, alcalóides e antraquinona. Foram estudadas as atividades antineoplásicas das sementes da referida planta, coletada e identificada do ponto de vista botânico. Produzido extrato metanólico (EM) das sementes e os estudos iniciais de toxicidade constataram que a DL 50 era maior que 10g/kg de peso do animal de experimento, demonstrando a sua baixa toxicidade. Utilizados ratos albinos suíços com peso de 20g. Feita injeção intraperitoneal de 10^5 células de carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA) e 24 horas após realizada a infusão do EM por via intraperitoneal nas doses de 100, 200 e 300mg/kg, (respectivamente grupos I, II e III) por nove dias consecutivos. Um quarto grupo, de controle, foi tratado com propileno glicol 5ml/kg intraperitoneal na mesma seqüência dos demais grupos. No décimo dia os animais foram eutanasiados. Cada grupo constava de cinco animais. Os efeitos do EM no crescimento tumoral foram verificados através do volume ascítico, estudo citológico do mesmo e período de sobrevivência. Também foram realizados estudos hematológicos constando da contagem de eritrócitos e leucócitos, bem como contagem total de células nucleadas da medula óssea dos fêmures e feita avaliação do baço.

Demonstrada uma diferença estatisticamente significativa na sobrevivência dos animais submetidos ao uso do EM, quando comparado com o grupo controle. Constatou-se uma sobrevivência máxima (33.3 dias) no grupo que usou a dose de EM de 200mg/kg em comparação com 21 dias do grupo controle (Incremento de 58.6%). Em relação ao controle do volume tumoral foi constatado que o grupo que usou

100mg/kg de EM apresentou um volume ascítico de 1.3ml, o que representa uma diminuição de 60% em relação ao volume ascítico do grupo controle, que foi de 4 ml.

Do ponto de vista puramente quantitativo (no que se refere ao volume da ascite) não foi constatada variação nos grupos tratados com 200 e 300 mg de EM em relação ao grupo controle. O estudo citológico demonstrou que as células tumorais viáveis foram significativamente inibidas nos três grupos tratados. A percentagem de células tumorais mortas detectadas pelo exame "trypan blue" foi maior nos três grupos tratados, quando comparada com o grupo controle, sendo esses efeitos mais pronunciados nos grupos II e III. Essa análise ainda demonstrou um decréscimo do número de mitoses nos grupos tratados com EM, além de alterações degenerativas celulares nesse grupo, o que, em última análise, indica resposta terapêutica. Essas alterações foram expressas sob a forma de vacuolização do citoplasma, redução da intensidade da coloração e "membrane blebbing". Adicionalmente, a análise hematológica demonstrou preservação da contagem de hemácias e leucócitos no grupo I. Também um incremento na contagem das células nucleadas esplênicas e no peso do órgão foi constatado nos três grupos tratados com EM. A contagem de células da medula óssea foi normal no grupo I, o qual demonstrou, nesse aspecto, o melhor resultado entre os grupos tratados. Foi evidenciado um aumento na sobrevivência e uma preservação da função hematopoiética, o que favorece o uso dessa substância com margem de segurança em relação à toxicidade. O estudo concluiu que está claramente demonstrada a atividade inibitória tumoral do EM das sementes da *Cássia fistula* L. na forma ascítica do carcinoma de Ehrlich²⁶.

José, em 2001, descreveu que há crescente interesse no conhecimento da regulação do ciclo celular, especialmente nas quinases ciclinodependentes, como a Cdc 2 quinase, envolvida na transição G2/M da divisão celular através do controle da Cdc 25 fosfatase. Há vários compostos sintéticos e naturais que são, reconhecidamente, inibidores dessas enzimas, e que, portanto, se prestam como agentes ideais no controle da proliferação celular. A planta *Emblica officinalis* (E o), tem frutos que são usados popularmente na Índia no tratamento de numerosas doenças, com atribuídas ações antiinflamatórias e antibacterianas. Também é utilizada em formulações hepatoprotetoras e tranqüilizantes. O *chyavanaprash* é uma

solução vegetal que contém Eo em 50% de sua composição além de 35 outras ervas, às quais são atribuídas propriedades antioxidantes e imunomodulatórias. Analisada a atividade antitumoral do Eo e do *chyavanaprash* em modelos *in vivo* e *in vitro* no que se refere à ação antitumoral, e especialmente à regulação do ciclo celular.

Utilizadas as linhagens celulares de linfoma de Dalton ascítico (LDA) e do carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA). Os animais foram ratos suíços albinos machos de 20-25 g. Frutas frescas de Eo foram submetidas a mistura e posterior centrifugação e liofilização produzindo um extrato aquoso a 10%. Os ratos foram submetidos a injeção intraperitoneal de LDA e CEA no volume de 10^6 células. Após 24 horas da inoculação do tumor diferentes doses de Eo (250mg, 500 mg e 1.25g/kg) e *chyavanaprash* (500mg e 2.5g/kg) foram administrados por via oral. As mesmas doses foram oferecidas por cinco vezes em dias alternados. Observado que os animais portadores de ascite por LDA tratados com Eo na dose de 1.25g/kg tiveram uma significativa redução da ascite tumoral e incremento de 20% de sobrevida. Os animais com LDA tratados com *chyavanaprash* na dose de 2.5g/kg tiveram um incremento de 60.9% da sobrevida. Já os animais portadores de CEA não tiveram qualquer benefício com o uso de Eo ou *chyavanaprash* em qualquer das doses utilizadas, seja no que se refere à sobrevida ou ao controle da ascite. Adicionalmente, foi verificado que o extrato aquoso de Eo provoca inibição da enzima fosfatase cdc 25 de maneira dose- dependente. Os autores defendem que o efeito antineoplásico é atribuível às substâncias emblicanina, ellagotannina e trigallayl glicose, componentes do Eo⁹².

Rajeshkumar, em 2002, descreveu a utilização do extrato aquoso do *Phyllanthus amarus* por via oral em ratos portadores da forma ascítica do linfoma de Dalton e do carcinoma de Ehrlich. Constatado que a concentração inibitória de 50% se situava na dose de 540 microg/ml e que o extrato provocava uma inibição da DNA topoisomerase II e uma redução da atividade da enzima reguladora do ciclo celular cdc25 tyrosina fosfatase. Ao lado desses efeitos foi verificada inibição da ativação metabólica de carcinogênicos e de outros reguladores do ciclo celular, além de interferência no reparo do DNA⁹³.

Gupta e, em 2004, descreveu o uso do extrato metanólico de *Bauhinia racemosa* (EMBR) no carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA). A *Bauhinia racemosa* (Ba) é uma planta de ampla ocorrência na Índia, Ceilão e China. A casca de seu tronco é utilizada popularmente como analgésico, e antidiarréico, além de ser utilizada topicamente em doenças dermatológicas. Estudos farmacológicos mostraram propriedades analgésicas, antiinflamatórias e antimicrobianas nessa planta. Foi também demonstrada citotoxicidade *in vitro* em cultura de células de CA-9 KB.

Alguns constituintes fitoquímicos da Ba foram isolados, principalmente flavonóides, cumarínicos, triterpenóides, esteróides e estilbenos. Esses constituintes demonstram, sabidamente, propriedades farmacológicas importantes, incluindo ação antioxidante e antitumoral, com inibição de radicais livres. Avaliada a ação do EMBR em relação a toxicidade, ação antitumoral, peroxidação de lipídeos e efeito antioxidante. Foi utilizado o extrato metanólico da Ba através de destilação, evaporação e tratamento a vácuo e diluição em propileno-glicol. As células de CEA foram resultantes de manutenção por inoculação intraperitoneal de 2×10^6 e foram utilizados ratos Swiss albinos machos de 20 gramas. Feito estudo inicial de toxicidade em um período de 14 dias. Quatro grupos de 8 animais receberam EMBR por via intraperitoneal nas doses de 50, 100, 200 e 400mg/kg e um 5º grupo (controle) recebeu propileno - glicol 5ml /kg ip. Após 24 h do término do experimento os animais foram eutanasiados e colhido sangue para estudos hematológicos. Verificaram-se sintomas de toxicidade importantes como hipotermia e ereção dos pelos na dose de 400mg/kg. Também dosagem sérica das enzimas hepáticas TGO e TGP foram efetuadas. Quando avaliada a atividade antitumoral foram formados cinco grupos de 12 animais, todos submetidos a injeção de CEA na dose de 0.2ml de 2×10^6 cel por animal por via intraperitoneal e um grupo controle não injetado. Vinte e quatro horas após a inoculação dos cinco grupos em um foi injetada solução salina ip e em 3 grupos as doses escalonadas de EMBR já referidas (50, 100 e 200mg/kg) e em um feita a injeção de quimioterápico standard 5-fluorouracil na dose de 20mg/kg. Em todos foram utilizadas doses diárias durante 14 dias. Após a administração da última dose e 18 horas de jejum seis animais de cada grupo foram eutanasiados para estudo da atividade antitumoral, avaliação hematológica e estudo

dos parâmetros bioquímicos hepáticos. Os outros seis animais de cada grupo foram observados em relação à sobrevida. Os critérios para avaliação de efeito antitumoral consideraram o peso corporal, volume da ascite, contagem de células viáveis e não viáveis, sobrevida média e incremento na sobrevida. No grupo controle o tempo de sobrevida foi de 18 dias e houve incremento do mesmo proporcional às doses crescentes de EMBR, com um máximo de 39.5 dias no grupo tratado com 200mg /kg.

Houve também redução do volume tumoral, volume celular e contagem de células tumorais viáveis nos grupos tratados com EMBR, de maneira dose-dependente. Adicionalmente, observou-se um incremento dos níveis de enzimas antioxidantes no fígado no grupo tratado com EMBR. Os níveis de superoxidase dismutase elevaram-se em até 27.2% com a dose máxima de EMBR e os de catalase aumentaram em 55,6% quando comparado com o grupo controle. Também foi verificada redução da peroxidação lipídica nos animais que usaram EMBR, o que provocou diminuição do MDA, produto final da peroxidação, o qual está presente em altas concentrações no tecido tumoral. Por outro lado foi constatada elevação da glutathione, potente inibidor dos processos neoplásicos, nos grupos tratados, através de sua ação como estimulante do sistema antioxidante endógeno²⁷.

Em nosso meio Vieira, em 2006, demonstrou a utilização de planta encontrada no Nordeste do Brasil denominada *Indigofera suffruticosa*. Foi avaliado o efeito citotóxico e antitumoral do extrato aquoso desse vegetal. A análise toxicológica mostrou baixa toxicidade nas doses utilizadas. O uso intraperitoneal do extrato na dose de 50mg/kg provocou redução de 64.5% do volume tumoral de sarcoma 180 implantado em ratos versus progressão tumoral em 100% dos animais do grupo controle⁸.

Ainda em nosso meio Pagno, em 2006, descreveu a ação da *Vernonia scorpioides* (*V s*), planta utilizada no Brasil para tratamento local de feridas crônicas e úlceras e lesões cutâneas ligadas ao diabetes, sob a forma de extrato alcoólico. Essa planta é denominada popularmente de piracá, enxuga ou erva de São Simão. É uma planta típica de solos pobres e desmatados⁹.

Estudos prévios mostraram que o extrato bruto de *V scorpioides* e suas frações denominadas chloroform e hexane tinham ações antifúngica, bactericida e que

também favoreciam a cicatrização de feridas. Alguns outros componentes também foram isolados na *Vs*, principalmente as lactonas sesquiterpenas além de outros componentes como flavonoides, esteroides e polissacarídeos, tendo sido relatados efeitos anticancerígenos de espécies de *V. scorpioides*⁹⁴⁻⁹⁶.

Estudo inicial observando atividade pro-inflamatória da *Vs* na pele sã motivou a avaliação do efeito do extrato bruto dessa planta no tratamento do carcinoma de Ehrlich (CE) nas formas sólida e ascítica^{97,98}.

Os resultados iniciais promissores levaram os autores a obterem frações de *Vs* com progressiva polaridade, até a obtenção do hexane dichloromethane (DMC) como acetato etílico e fração aquosa, testados na dose de 200mg/kg, quando foi obtida a maior efeito antitumoral. Utilizado o DCM no CE nas formas sólida e ascítica em ratos. Na obtenção do material foram utilizadas amostras frescas de 600g de *Vs* maceradas em 6.000ml de ethanol por sete dias, na ausência de luz. Feita redução do volume inicial para 1/6 utilizando evaporador. Foi acrescentada água (600ml) e realizado fracionamento líquido-líquido utilizando solventes para incrementar a polaridade. As frações obtidas foram hexane (1.16 g), DCM (420 mg), acetato etílico (560mg) e água. Após screening dos componentes, foi confirmada a informação inicial de que a fração DCM mostrava a maior atividade contra as células neoplásicas, expressa por ausência de crescimento tumoral. Feita dissolução em salina 2% para concentrações de 5 a 200mg/kg. As amostras foram congeladas até o dia da aplicação. Feita injeção intraperitoneal diária de DCM na dose de 5mg/kg durante e após a implantação de carcinoma de Ehrlich nas formas ascítica e sólida, durante sete dias. Avaliados sobrevida, peso, número e tipo dos leucócitos peritoneais, número de células tumorais, volume do tumor sólido e ascítico além do desenvolvimento do tumor em células pré-tratadas *in vitro* com DCM. Na avaliação dos leucócitos peritoneais foi feita a adição de 5ml de salina ao líquido peritoneal, seguida de centrifugação e diluição em 200 microl de salina e processados histologicamente com hematoxilina para observação microscópica em 100x.

Realizada a leitura em 5 campos, observando-se a média de contagem de neutrófilos, monócitos, fagócitos e linfócitos. Foi também avaliado o desenvolvimento de tumor a partir de células pretratadas *in vitro* com DCM. Foram

estudados 8 grupos de ratos, com seis animais em cada, e testadas diferentes concentrações de DCM (5 a 200mg / kg) em 6 grupos. O sétimo grupo recebeu 5-FU ip (20mg / kg) e o oitavo solução salina 2%. Feita determinação *in vitro* de citotoxicidade de DCM quando 5×10^6 cells de CE foram tratadas com DCM por 15 minutos e injetadas na cavidade abdominal em um grupo e idêntica quantidade de células foi transplantada sem tratamento prévio em outro grupo. Também realizada, no mesmo estudo, avaliação do efeito do DCM nos CE na forma sólida com a injeção subcutânea de 5×10^6 células na região plantar de ratos em 6 grupos tratados com DCM ip ou por gavagem; um grupo com CE pretratado com DCM, outro com salina ip e outro salina por gavagem, todos durante dez dias. Medido volume tumoral com paquímetro digital diariamente durante o período de observação (10 dias). Os animais foram eutanasiados após sete dias, nos grupos de CE intraperitoneal e após 10 dias nos grupos de CE plantar. Quando avaliados os resultados se constatou que houve inibição total do desenvolvimento tumoral com uso de DCM *in vitro* como por via intraperitoneal. A inibição foi completa quando o DCM foi aplicado imediatamente após o implante tumoral, mas, mesmo quando utilizado três dias após o implante provocou decréscimo do desenvolvimento tumoral. Foi documentado que, diferentemente das drogas antineoplásicas usuais, o DCM provoca um aumento do influxo neutrofílico na cavidade peritoneal, ocorrendo, portanto, ao lado da atividade citotóxica uma atividade inflamatória, a qual é benéfica para o controle tumoral. Foi verificado que os leucócitos peritoneais resgatados, predominantemente macrófagos, existiam em número significativamente maior ($p < 0.05$) no grupo tratado com DCM quando comparado com os grupos que fizeram uso de 5FU ou solução salina a 0.9%. Evidentemente, esse efeito de estimulação leucocitária se contrapõe à habitual depleção leucocitária que ocorre habitualmente no tratamento com agentes citotóxicos convencionais (quimioterápicos). Por outro lado, houve incremento da sobrevivência em duas semanas e os animais mantiveram seu peso por 30 dias no grupo tratado com DCM. Em conclusão, foi demonstrado evidente benefício no tratamento da carcinomatose induzida por carcinoma de Ehrlich com o uso de DCM, o que estimulou os

estudiosos da área a investigar outras modalidades de derivados de plantas como agentes antineoplásicos⁹.

Nascimento, em 2006, descreveu que a planta *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), conhecida popularmente como mastruz é indicada em muitas doenças. Estudou o efeito do *C. ambrosioides* no desenvolvimento do carcinoma de Ehrlich em ratos suíços. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* (5mg/kg) ou com PBS (grupo controle) 48h antes e após a implantação do tumor sólido na planta do pé ou na cavidade peritoneal. Realizadas medidas do tumor sólido a cada dois dias até o décimo quarto dia. Na forma ascítica foi avaliado o volume da ascite e a contagem das células tumorais. Houve inibição significativa do crescimento das formas sólida e ascítica do carcinoma de Ehrlich, após o uso de *C. ambrosioides*, bem como incremento da sobrevivência nesses animais. Foi sugerido que o efeito terapêutico dessa substância se deve a propriedades antioxidantes da mesma³.

Sheela, em 2006, descreveu que o extrato da raiz da planta *Glycyrrhiza glabra* possui potente atividade antiangiogênica e antitumoral. Utilizou extrato aquoso de *G. glabra in vivo* e *in vitro* em cobaias portadores de carcinoma de Ehrlich na forma ascítica e verificou, em ambas as situações, atividade angiostática. Constatada redução dos níveis de citocina VEGF e da densidade de contagem de microvasos no peritônio de ratos tratados com *G. glabra*, evidenciando clara ação antineoplásica¹⁰.

Oršolić, em 2009, investigou o efeito local da quimio-imunoterapia intraperitoneal associada a hipertermia no tratamento de carcinomatose peritoneal produzida por carcinoma mamário experimental (MCA) em ratos. Feita a injeção intraperitoneal de extrato liofilizado de *Caucalis Platycarpus* L (CPL 200mg/kg) e, sete dias após, injeção intraperitoneal de 5×10^6 células de MCA. Imediatamente após a injeção das células tumorais foi feita infusão ip de 2ml de soro fisiológico a 43°C, associado ao uso ip de doxorubicina 20mg/kg, cisplatina 10mg/kg, mitomicina 5mg/kg e 5 FU 150mg/kg. Foram avaliados a sobrevivência e os efeitos colaterais.

Presume-se que há efeito sinérgico entre CPL e drogas citotóxicas, efeito imunomodulador do CPL e também que essa substância promove redução dos efeitos colaterais dos quimioterápicos. Foi obtido um incremento da sobrevivência no

grupo tratado com CPL de 32.5%. Os resultados sugerem um efeito sinérgico da hipertermia, quimioterapia e imunoterapia⁹⁹.

Em pesquisa realizada no Departamento de Antibióticos da UFPE, que resultou em dissertação de Mestrado no Departamento de Ciências Farmacêuticas apresentada em 2007, Gurgel estudou a importância da planta *Plectranthus amboinicus* como alternativa terapêutica. Inicialmente foi avaliada a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico (EH) das folhas do *Plectranthus amboinicus* (EHPa). Adotado como padrão macerado de folhas secas tratados com etanol a 70% durante 72h. O produto desse processo foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório a 45°C°. Utilizados camundongos fêmeas Albino Suíços (*Mus musculus*) com idade de 60 a 90 dias, com peso entre 25 a 35g e mantidos em condições padrão de experimentação animal. Administradas, por via intraperitoneal, doses progressivas de 500, 750, 1125, 1690, 2.535 e 3.800mg/kg do EHPa. Os animais foram observados por um período de 48 horas após administração das doses e avaliados os óbitos para o cálculo da DL50. Feita observação com triagem farmacológica dos efeitos gerais de cada dose administrada, correlacionando-os com dados comportamentais ligados à ação sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e Autônomo. Não houve óbitos em nenhuma dose, não sendo por isso possível avaliar a DL50, se constatando a baixa toxicidade do EHPa. Observada forte ação sobre o SNC durante os primeiros 30 minutos após infusão da substância. Esses efeitos foram caracterizados por reação de fuga, aumento da frequência respiratória, movimentos estereotipados, contorções abdominais e agressividade. A esse quadro se seguiram, após os 30 minutos iniciais, prostração, sonolência e diminuição da frequência respiratória, sugerindo ação depressora do SNC provocada pelo EHPa nessa fase¹⁰⁰.

Posteriormente, baseado nos dados iniciais observados no trabalho acima, em 2009, foi publicado estudo que descreveu os resultados do tratamento com EHPa no tratamento do carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA) transplantado para o tecido subcutâneo de camundongos. Nessa análise foram utilizados animais com as mesmas características e nas mesmas condições acima citadas, os quais foram divididos em cinco grupos de cinco indivíduos. Em todos os animais foi feita injeção de 0.2ml de células de carcinoma de Ehrlich ascítico (1×10^7) no tecido subcutâneo da

região inguinal. No terceiro dia do estudo foi iniciada injeção diária intraperitoneal de solução salina a 0.9 % no grupo controle, metotrexate 10mg/kg no grupo padrão e EHPa nas doses de 100, 150 e 250mg/kg nos três grupos restantes. Após o 7º dia os animais foram eutanasiados e os tumores foram removidos. A inibição tumoral foi calculada a partir da percentagem de redução dos tumores em relação ao grupo controle. Constatada uma inibição significativa do tumor no grupo tratado com EHPa. Os animais tratados com a dose de 100mg/kg apresentaram redução do volume tumoral de 74%, enquanto os tratados com a dose de 150mg/kg tiveram redução de 61%. Os tratados com a dose de 250mg/kg tiveram redução de 27%. Os efeitos antineoplásicos do EHPa podem ser atribuídos a componentes fenólicos como quercitina e luteína, bem como outras substâncias nele existentes como os terpenóides, que têm comprovado efeito antitumoral¹¹.

Esses promissores resultados iniciais motivaram-nos a pesquisar o efeito antitumoral de derivados do *Plectranthus amboinicus*, especificamente na forma ascítica do carcinoma de Ehrlich e avaliar os efeitos locais nessa circunstância e, posteriormente, identificar componentes dessa planta que tenham efeito antitumoral destacado.

2.1.12 Carcinoma de Ehrlich

Os tumores experimentais tem grande importância para o estabelecimento de padrões de replicação neoplásica. O carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA) é um dos mais comuns entre esses tumores. É derivado do adenocarcinoma mamário murino espontâneo que é mantido na forma ascítica por passagens em ratos Suiços singênicos através de transplantes intraperitoneais semanais de 5×10^6 células tumorais¹¹.

A primeira referência a esse tumor se deu em uma fêmea de rato que apresentou um carcinoma mamário espontâneo. Ehrlich e Apolant, em 1905, usaram espécimes desse tumor para transplantes subcutâneos sucessivos entre ratos¹⁰¹.

Em 1932, Loewenthal e Jahn obtiveram a forma líquida desse tumor no peritônio de ratos e denominaram esse tumor de “Carcinoma de Ehrlich Ascítico” (CEA)¹⁰².

Lette, em estudos realizados a partir da década de 1940 forneceu padronização não só para medição desse tumor, mas também para conversões que o tornaram adequados para pesquisas qualitativas e quantitativas¹⁰³.

Após 1948 houve uma rápida difusão do CEA em centros de pesquisa em todo o mundo¹⁰⁴. Trata-se de um carcinoma indiferenciado, originalmente hiperdiplóide, altamente transplantável, isento de regressão espontânea, com curto período de vida e rápida proliferação. Não se identificaram antígenos específicos anti-tumor de Ehrlich. Essa neoplasia, quando injetada no peritônio, provoca efusão, caracterizando ascite. Frequentemente, a virulência tumoral aumenta a partir de transplantes repetidos, de maneira que o grau de proliferação celular tumoral sofre incremento gradativo. Contudo, a desdiferenciação cede gradualmente e as células obtêm controle independente de crescimento, heterotransplantabilidade e conversão na forma ascítica¹⁰³.

O líquido ascítico típico do CEA tem coloração cinza-claro, algumas vezes apresenta certa viscosidade. Contém em torno de 10 milhões de células neoplásicas em cada 0,1ml, caracterizadas por sua homogeneidade de distribuição, o que permite uma precisão quantitativa nos transplantes e possibilita a contagem de células por sistemas simples. O tumor de Ehrlich pode ser transplantado para o peritônio, produzindo a forma ascítica, mas também pode ser implantado no tecido celular subcutâneo, produzindo a forma sólida. Outra vantagem do CEA é que suas células não aderem a superfícies sintéticas *in vitro*. Observa-se que de 4 a 7 dias após o transplante há formação de em torno de 10 ml de líquido ascítico. A replicação celular se dá em duas fases: a primeira de proliferação, na qual há um crescimento exponencial do número de células, seguida por um “plateau”, secundado por uma fase de quiescência, na qual o número de células permanece quase constante.

Durante a transição entre a fase proliferativa e o “plateau” ocorrem mudanças morfológicas e metabólicas nas células, como deterioração estrutural, diminuição do número de mitocôndrias, declínio da síntese de RNA e DNA e perda

de purinas e pirimidinas intracelulares, nucleotídeos, nucleosídeos e bases. Além disso, é observado declínio na concentração de ATP e no seu turnover. Há rápida divisão celular na fase proliferativa e o acúmulo de ascite ocorre paralelamente à proliferação celular. A morte do animal se dá em período variável, em decorrência do aumento da pressão intraabdominal e compressão dos órgãos adjacentes²³.

Observou-se que há aumento da permeabilidade microvascular no peritônio de animais portadores de CEA, com conseqüente ascite, provavelmente mediada por um fator vascular produzido pelas células tumorais. Sabe-se que esse fator não tem aparente efeito nos vasos sistêmicos. Há também referência a inibição da proliferação celular na medula óssea do hospedeiro do CEA, e a sua intensidade depende do tempo de instalação do tumor¹⁰⁴.

Do ponto de vista citomorfológico as células do carcinoma de Ehrlich se caracterizam por se situarem isoladas, grandes, arredondadas, com citoplasma delicado escasso e microvacuolizado. Os núcleos são volumosos com inversão da relação núcleo/citoplasma. Apresentam cromatina granular, irregularmente distribuída. Os nucléolos são proeminentes e de configuração anormal¹⁰⁵.

As características acima descritas situam o carcinoma de Ehrlich como um tumor experimental de tipificação morfológica definida, comportamento biológico previsível e facilidade de transplante. Além disso, a sua reprodutibilidade é fácil, o que permite sua utilização nos diversos centros de pesquisa do mundo de maneira comparável¹¹.

2.1.13 *Plectranthus Amboinicus*



Fonte: Montanari⁷⁸

Figura 2 - *Plectranthus amboinicus* "in natura"

Plectranthus amboinicus Lour. Spreng (Lamiaceae), também conhecido como orégano cubano, tomilho espanhol, orégano bruxo (Porto Rico), Húng chanh (Vietnam), tomilho mexicano, hortelã mexicana e, no Brasil, hortelã da folha graúda, ou hortelã da folha grossa. É uma planta nativa da Ásia Oriental, Leste e Sul da África e distribuída por toda a América. É utilizada amplamente na medicina popular como analgésico e antiinflamatório. Tem como sinônimos *Coleus amboinicus* Lour., *Coleus aromaticus* (Benth), e *Plectranthus aromaticus*. É uma planta perene da família Lamiaceae com sabor e odor semelhante ao orégano¹⁰⁶.

Essa planta é suculenta, tem uma típica haste de tres pontas, própria da família Lamiaceae. Tais folhas são muito finas, verdes e peludas. Ela cresce cerca de 50cm . É utilizada como condimento e, na medicina tradicional, para tratamento de tosse, congestão nasal e , na Indonésia , é tradicionalmente utilizada em uma sopa que, alegadamente estimula a lactação após o parto⁷⁷.

2.1.13.1 Aspectos botânicos

A família Lamicaeae compreende cerca de 220 gêneros e aproximadamente 4.000 espécies. O gênero *Plectranthus* compreende cerca de 300 espécies,

universalmente distribuídas. O caule é quebradiço. As folhas são ovaladas, ápice agudo, bordos dentados e pecíolo grosso. São altamente aromáticas, com forte odor de ervas. As flores são violáceas¹⁰⁶.

2.1.13.2 Aspectos químicos

Os terpenóides, especialmente os diterpenóides, são os metabólitos secundários mais encontrados nos estudos fitoquímicos do gênero *Plectranthus*. A espécie *Plectranthus amboinicus* é rica em flavonóides, como a quercitina a apigenina e o crysoeriol. Foram também identificados açúcares redutores, taninos e esteróide triterpênicos⁹⁴.

O óleo essencial timol foi encontrado em percentual superior a 90% e o carvacrol em torno de 60%. Vitaminas do complexo B e ácido ascórbico também foram identificados em espécimes cultivados na América Central. Ressalte-se que a composição de cada planta varia em função de aspectos variáveis, relacionados ao solo, qualidade e quantidade da água e outras variáveis ambientais. Portanto estudos com plantas devem estabelecer comparações entre espécimes ajustadas a uma mesma condição desses parâmetros²³.



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA E LOCAL DO ESTUDO

Foram estudados 12 camundongos fêmeas de espécie Albino Suíço (*Mus Musculus*), provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Realizada uma amostra por conveniência.

3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo foi de intervenção ou experimental pré-clínico nível I.

3.3 SELEÇÃO

Foram alocados para o experimento 12 camundongos por sorteio, em dois grupos com o mesmo número de animais (6 animais por grupo) :

Grupo G1: grupo experimento - sub-grupos: A a F

Grupo G2: grupo controle - sub-grupos: A a F

3.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os animais do gênero feminino, com peso médio de 30 g e aproximadamente 60 dias de vida, foram mantidos no biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, acondicionados em gaiolas tipo caixa plástica com grades de tamanho 20 cm (largura) por 30 cm (comprimento) por 12 cm (altura), em estante em posição horizontal e com piso revestido por maravalha de pinus.

Utilizado padrão sanitário convencional com limpeza das gaiolas a cada três dias e troca da maravalha.

As gaiolas foram mantidas em ambiente refrigerado com temperatura média de 22 +/- 2 °C e umidade ambiente. Utilizado regime de luminosidade de 12 h claro e 12h escuro. Empregada ração industrializada para roedores do tipo Labina® e água potável *ad libitum*.

Os animais foram marcados com corante (Ac. Pícrico) no sistema cabeça / dorso/ cauda para identificação.

3.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO - BIOMÉTRICAS / OBSERVACIONAIS

Nome da variável	Definição/categorização
Peso	Peso diário do animal
Medição abdominal	Transversal e longitudinal (na medição transversal considerada a maior medida no 1/3 médio do abdome e na medição longitudinal a medida entre a extremidade inferior do esterno e a região anal)
Piloereção	Presença ou ausência
Mobilidade / deambulação	normal / anormal

Quadro 2 - Variáveis do estudo

3.5 PROCEDIMENTOS

3.5.1 Procedimentos técnicos

3.5.1.1 Preparação do extrato

Coletadas folhas da planta *Plectranthus amboinicus* (Pa) em Novembro de 2011 no horto do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba. Há registro desse material no Herbário do IPA - Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, com o código JPA 6550.

Feita maceração das folhas de Pa “in natura” utilizando diluição com soro fisiológico para produção do extrato aquoso bruto (EAPa) no D3 do experimento (primeiro dia de injeção intraperitoneal).

Obtida uma solução do EAPa conservada em refrigeração a 4 graus centígrados.

3.5.2 Procedimentos experimentais – primeira intervenção

3.5.2.1 Obtenção do carcinoma Ehrlich na forma ascítica

Realizada punção peritoneal em camundongos portadores do CEA, oriundos do biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, os quais foram incluídos no programa de replicação periódica deste tumor, segundo rotina do Departamento.

No primeiro dia do experimento (D1) foi feita injeção intraperitoneal nos animais do grupo 1 e do grupo 2 de 0.3 ml de líquido ascítico de animais com a forma ascítica do carcinoma de Ehrlich, o que corresponde a 5×10^6 células.

A partir do terceiro dia (D3) feita, no G1 injeção intraperitoneal diária do EAPa na dose de 200 mg/kg até o nono dia (D9), totalizando, portanto, 7 dias de tratamento.

No grupo G2 feita, no mesmo período (D3 a D9), injeção intraperitoneal de 0.5 ml de solução de soro fisiológico a 0,9%.

3.5.3 Procedimentos experimentais – segunda intervenção

O peso diário foi medido com uma balança eletrônica “Triple Beam Balance” ref. 07932, Marca Ohaus, produzida nos EUA e graduada para 2610g.

A medição abdominal foi feita em mm, utilizando paquímetro manual da marca “Fischer Darex” com escala de 150mm.

No 9º dia os animais dos dois grupos foram eutanasiados com a técnica de luxação cervical.

Após a morte, de imediato, os animais foram submetidos a laparotomia mediana e avaliados:

- 1) Volume da ascite;
- 2) Presença de tumores na parede abdominal;

Foram colhidas duas amostras de líquido ascítico de cada animal, cada uma com 01 ml

3.5.3.1 Avaliação citométrica e citológica

As amostras de 01 ml foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro de 5ml e acrescentados 100 microlitros de heparina sódica e encaminhadas de imediato para estudo citométrico e citológico.

No estudo citométrico, realizado no setor de Hematologia do Laboratório Marcelo Magalhães, foi feita homogenização e centrifugação de 1ml de líquido ascítico com máquina STKS, preparo de lâminas e coloração pela técnica de May-Gruwald-White e contagem total de células pelo contador hematológico Beckman-Coulter Gen'S.

Utilizado para leitura das lâminas microscópio Olympus CX 31 com aumento médio de 1000 vezes

No estudo citológico, realizado no Laboratório CICC (Centro Integrado de Colposcopia e Colpocitologia), foram utilizadas amostras de 01ml do líquido ascítico a fresco, diluídas em 0,2 ml de soro solução salina a 0.9 % e processadas em centrífuga Shandon a 1000 RPM. Em seguida feita fixação com etanol a 99.9% e confeccionadas preparações citológicas coradas pela técnica de Papanicolaou modificada.

Utilizado microscópio óptico e sistema digital de fotografia da marca Leica e realizadas fotos com objetiva de imersão com aumento de 400 e 1000 vezes.

Analisados os seguintes aspectos citológicos:

- 1) Volume nuclear;
- 2) Hiper Cromasia;
- 3) Alterações da relação núcleo/ citoplasma;

- 4) Irregularidade do contorno nuclear;
- 5) Distribuição da cromatina;
- 6) Aspectos do nucléolo e número;
- 7) Mitoses atípicas.

3.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Com o objetivo de caracterizar a amostra estudada, foi feita estatística descritiva com frequências relativas (percentuais) e absolutas (n) das classes de cada variável qualitativa. Para as variáveis quantitativas foram utilizadas médias e medianas para resumir as informações, e desvios-padrão, mínimo e máximo para indicar a variabilidade dos dados.

Para a comparação dos grupos com relação às variáveis qualitativas foi aplicado o teste Exato de Fisher, devido ao número pequeno de observações. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação dos grupos em relação as variáveis quantitativas. Para verificar se houve alteração do peso dentro de cada grupo foi feito teste de Wilcoxon. Optou-se por utilizar apenas metodologias não paramétricas devido ao número pequeno da amostra.

O nível de significância assumido foi de 5%. Os cálculos estatísticos foram realizados no software SPSS for Windows versão 18.0 - Statistical Package for the Social Science.

3.7 PROCEDIMENTO ÉTICOS DA PESQUISA

O experimento foi registrado no Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPE sob protocolo nº 23076.043890/2011-27 (Anexo 1).



4 RESULTADOS

4.1 DISTRIBUIÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS SEGUNDO OS GRUPOS DO 1º AO 9º DIA

Analisando os resultados em relação ao peso dos animais, pode-se afirmar que já no primeiro dia do experimento existe diferença significativa entre os grupos com relação ao peso ($p=0,041$), sendo o grupo controle o que apresentou valores maiores. Quando se analisa a evolução do peso nos 9 dias, verifica-se que no grupo tratado não houve alteração estatisticamente significativa do peso ($p=0,785$), ou seja, esse grupo não apresentou aumento de peso. No grupo controle observa-se aumento significativo do peso entre o 1º e o 9º dia ($p=0,027$) (Tabelas 2 a 4).

Tabela 1 - Dose de EAPA 200mg/kg (G1) e solução salina 0,5ml (G2) - 7 dias (D3 a D9)

	Peso(g)	Dose(mg)		Peso(g)	Dose(ml)
G1A	36	7.2	G2A	44	0.5
G1B	37	7.4	G2B	47	0.5
G1C	39	7.8	G2C	43	0.5
G1D	35	7.0	G2D	47	0.5
G1E	37	7.4	G2E	38	0.5
G1F	34	6.8	G2F	35	0.5

Tabela 2 - Peso inicial dos animais (g)

Sub-grupos	Grupos	
	Experimento G1 (g)	Controle G2 (g)
A	36	44
B	37	47
C	39	43
D	35	47
E	37	38
F	34	35

Tabela 3. Peso dos animais do Dia 1 a Dia 9 (D1-D9) - (g)

Sub-grupos	Grupo																	
	Experimento (G1)									Controle (G2)								
	Peso (g)									Peso (g)								
	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8	D 9	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8	D 9
A	36	36	37	37	37	37	38	36	36	44	44	44	47	48	47	49	50	53
B	37	37	36	37	37	37	37	36	35	47	47	47	49	51	51	50	51	54
C	39	39	38	39	40	41	40	39	39	43	43	43	44	47	47	48	50	53
D	35	35	37	37	39	40	36	36	35	47	47	47	49	53	56	58	61	65
E	37	37	36	37	38	39	38	36	36	38	38	39	40	43	44	44	46	47
F	34	34	35	34	38	37	37	36	36	35	35	36	37	38	40	41	43	46

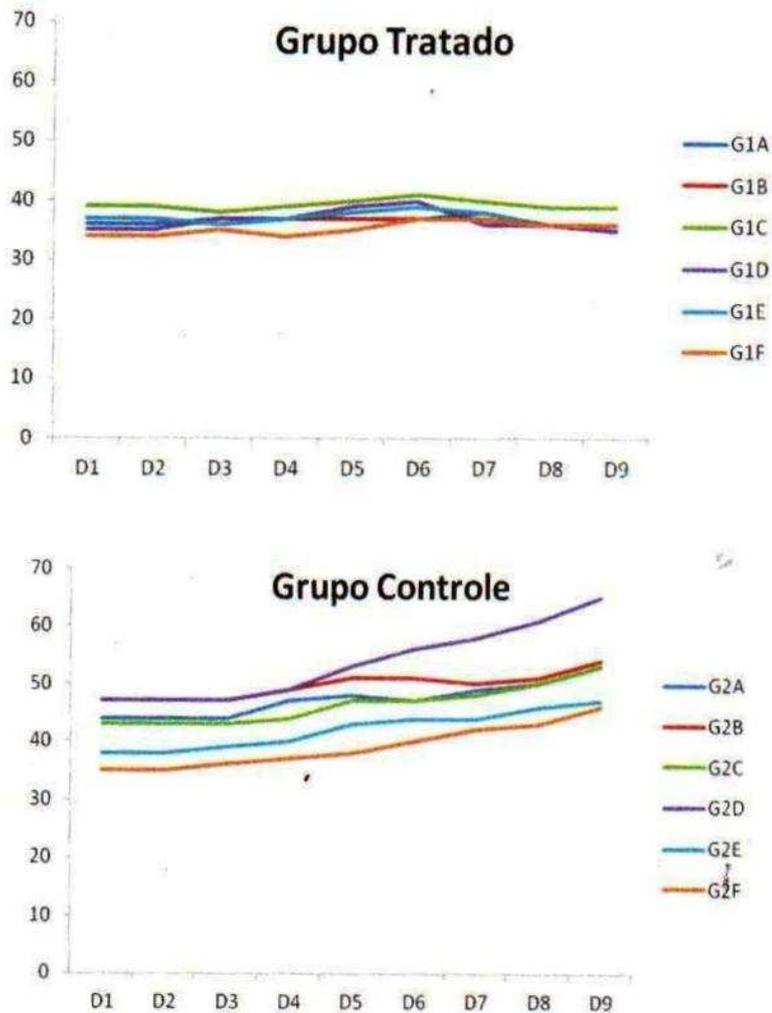
Tabela 4 - Estatísticas descritivas dos pesos dos animais segundo grupos, do primeiro ao nono dia.

	Grupo Experimental (G1)									
	Peso (g)									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Média	36,33	36,33	36,50	36,83	37,67	38,50	37,67	36,50	36,17	
Desvio Padrão	1,75	1,75	1,05	1,60	1,75	1,76	1,37	1,23	1,47	
Mediana	36,50	36,50	36,50	37,00	37,50	38,00	37,50	36,00	36,00	
Mínimo	34	34	35	34	35	37	36	36	35	
Máximo	39	39	38	39	40	41	40	39	39	

	Grupo Controle (G2)									
	Peso (g)									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Média	42,33	42,33	42,67	44,33	46,67	47,50	48,50	50,17	53,00	
Desvio Padrão	4,89	4,89	4,41	4,97	5,46	5,54	5,58	6,11	6,78	
Mediana	43,50	43,50	43,50	45,50	47,50	47,00	48,50	50,00	53,00	
Mínimo	35	35	36	37	38	40	42	43	46	

Máximo	47	47	47	49	53	56	58	61	65
--------	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Gráfico 1 - Peso dos animais G1-G2 / D1 a D9



4.2 DISTRIBUIÇÃO DO PARÂMETRO CLÍNICO MEDIÇÃO ABDOMINAL TRANSVERSA/LONGITUDINAL

Analisando os resultados das tabelas 5, 6 e 7, quando se comparam os grupos com relação à medição abdominal transversa existe diferença estatisticamente significativa, tanto no primeiro dia ($p=0,002$) quanto no nono dia ($p=0,003$). Com relação à medição abdominal longitudinal não houve diferença relevante entre os grupos no primeiro dia ($p=0,818$) e no nono dia ($p=0,485$).

Portanto, houve um valor maior da medição abdominal transversa no grupo controle, ao longo do experimento. Esse fato pode implicar em menor controle da ascite nesse grupo.

Tabela 5. Medição abdominal transversa/longitudinal (T/L) em mm dos grupos

Sub-grupos	Grupo Experimental (G1)								
	D1 T/L	D2 T/L	D3 T/L	D4 T/L	D5 T/L	D6 T/L	D7 T/L	D8 T/L	D9 T/L
A	32/39	30/42	29/43	30/43	30/41	30/39	33/39	32/40	32/41
B	8/43	30/42	29/43	30/43	30/41	30/39	33/45	33/44	33/44
C	29/34	30/34	29/34	30/34	32/45	33/41	33/46	33/46	33/45
D	30/45	31/44	30/44	33/40	34/44	32/42	32/40	33/41	32/40
E	31/40	30/42	34/41	35/44	32/42	32/40	32/40	34/41	33/42
F	30/38	30/39	31/38	33/41	35/44	33/42	30/40	32/42	32/43
Sub-grupos	Grupo Controle (G2)								
	D1 T/L	D2 T/L	D3 T/L	D4 T/L	D5 T/L	D6 T/L	D7 T/L	D8 T/L	D9 T/L
A	34/32	34/36	34/31	34/35	36/31	34/32	33/39	33/40	41/41
B	39/40	40/41	40/42	42/43	42/43	43/43	42/43	41/41	41/41
C	36/41	36/42	35/41	34/43	35/42	36/43	37/42	39/42	42/41
D	42/41	43/42	41/41	43/42	41/41	42/41	42/40	40/41	42/42
E	40/41	39/42	40/41	42/41	41/41	32/40	35/40	38/41	43/42
F	34/35	33/35	34/34	34/35	36/36	38/40	39/40	40/41	41/42

Tabela 6 - Estatísticas descritivas da medição abdominal transversa (mm) segundo o grupo - do primeiro ao nono dia

Grupo Experimental (G1)									
medição abdominal transversa (mm)									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Média	30,00	30,83	30,50	32,00	33,00	32,17	32,00	32,83	32,50
Desvio Padrão	1,41	1,60	1,52	2,00	2,00	1,17	1,09	0,75	0,55
Mediana	30,00	30,00	30,50	32,00	33,00	32,50	32,00	33,00	32,50
Mínimo	28	30	29	30	30	30	30	32	32
Máximo	32	34	33	35	35	33	33	34	33

Grupo Controle (G2)									
medição abdominal transversa (mm)									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Média	37,50	37,50	37,33	38,17	38,50	37,50	38,00	38,50	41,67
Desvio Padrão	3,33	3,83	3,33	4,58	3,15	4,37	3,69	2,88	0,82
Mediana	37,50	37,50	37,50	38,00	38,50	37,00	38,00	39,50	41,50
Mínimo	34	33	34	34	35	32	33	33	41
Máximo	42	43	41	43	42	43	42	41	43

Tabela 7 - Estatísticas descritivas da medição Abdominal Longitudinal (mm) segundo o grupo - do primeiro ao nono dia

Grupo Experimental (G1)									
medição abdominal longitudinal (mm)									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
N	39,83	40,00	39,83	40,33	42,50	40,17	41,67	42,33	42,50
Média	3,87	3,52	3,66	3,50	2,26	1,94	3,01	2,25	1,87
Desvio	39,50	40,50	40,00	40,50	43,00	40,50	40,00	41,50	42,50
Padrão									
Mediana	34	34	34	34	39	37	39	40	40
Mínimo	45	44	44	44	45	42	46	46	45
Máximo	39,83	40,00	39,83	40,33	42,50	40,17	41,67	42,33	42,50

Grupo Controle (G2)									
medição abdominal longitudinal (mm)									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Média	38,33	39,67	38,33	38,33	37,83	38,67	39,83	40,50	41,67
Desvio	3,88	3,27	4,63	4,08	4,58	3,98	1,94	0,84	0,52
Padrão									
Mediana	40,50	41,50	41,00	38,00	38,50	40,00	40,00	41,00	42,00
Mínimo	32	35	31	34	31	32	37	39	41
Máximo	41	42	42	43	43	43	43	41	42

Analisando os resultados das tabelas 10 e 11, quando comparamos os grupos com relação ao volume da ascite existe diferença estatisticamente significativa, sendo a média do grupo tratado-G1 de 2,58 ml e a do grupo controle - G2 12,97 ml ($p=0,002$). Portanto, houve um melhor controle da ascite no grupo tratado.

Tabela 10 - Volume da ascite (ml)

Sub-grupos	Grupos	
	Experimento G1 (ml)	Controle G2 (ml)
A	2,3	7,7
B	2,5	8,2
C	3,2	10,3
D	2,8	20,2
E	2,4	18,4
F	2,3	13,0
Média	2,5	12,9

Tabela 11- Estatísticas descritivas do Volume da Ascite (ml) segundo os grupos

Grupo	Volume Ascite				
	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1	2,58	0,35	2,45	2,30	3,20
G2	12,97	5,28	11,65	7,70	20,20
Total	7,77	6,49	5,45	2,30	20,20

$p=0,002$



Gráfico 2 - Box-Plot comparativo do Volume da Ascite entre os grupos

Tabela 12 - Aspecto da ascite

Sub-grupos	Grupos	
	Experimento G1	Controle G2
A	Hemático turvo	Hemático
B	Hemático turvo	Hemático
C	Hemático turvo/fibrinoso	Seroso turvo
D	Hemático turvo	Hemático
E	Hemático turvo	Hemático
F	Hemático turvo	Hemático

Analisando os resultados da tabela 13 e 14, quando comparamos os grupos com relação a implantes tumorais na parede abdominal houve diferença estatística entre os mesmos, sendo que 66,7% do grupo tratado-G1 os apresentaram ($p=0,051$). De fato, há uma tendência estatística de maior número de implantes na parede abdominal no grupo não tratado.

Tabela 13 - Implante tumoral na parede abdominal - Ausente(A) / Presente (P)

Sub-grupos	Grupos	
	Experimento G1	Controle G2
A	A	P
B	A	P
C	A	A
D	A	A
E	A	P
F	A	P
Percentual	0%	66.6%

Tabela 14 - Distribuição de frequência dos grupos segundo o Implante tumoral na parede abdominal

Implante tumoral na parede abdominal	Grupos				Total	
	Experimento G1		Controle G2			
	N	%	N	%	n	%
Ausente	6	100,0	2	33,3	8	66,7
Presente	0	0	4	66,7	4	33,3
Total	6	100	6	100	12	100

$P=0,051$ (teste Exato de Fisher)



Figura 3 - Implante na parede abdominal -G2

Analisando-se os resultados das tabelas 15 e 16, pode-se afirmar que existiu uma diferença significativa entre os grupos apenas com relação aos valores dos leucócitos ($p=0,002$) e ao número de células de carcinoma de Ehrlich ($p=0,004$). Houve um menor número de células de carcinoma de Ehrlich no grupo tratado e um menor número de leucócitos nesse grupo.

Tabela 15 - Líquido ascítico - Aspectos citométricos

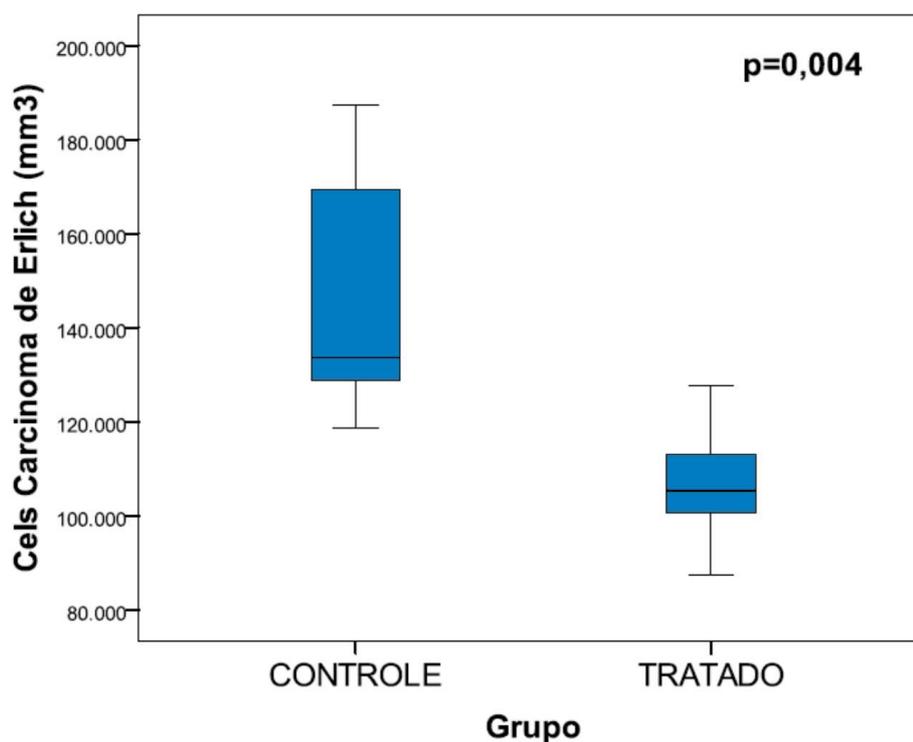
Leucócitos (contagem global) / mm³ Leucócitos (contagem diferencial) / % Cels. Carcinoma de Erlich/mm³

Sub-grupos	Grupos									
	Experimento G1					Controle G2				
	Mono	Poli	Cels	Carc de Ehrlich		Mono	Poli	Cels	Carc de Ehrlich	
A	20	26.200	/	80	104.800	10	62.310	/	90	138.690
B	18	25.270	/	82	127.773	12	50.600	/	88	169.400
C	17	19.840	/	83	87.360	11	80.100	/	89	187.400
D	18	30.800	/	82	113.200	22	46.200	/	78	118.800
E	19	25.200	/	81	100.800	20	34.230	/	80	128.770
F	19	29.200	/	81	106.080	15	42.950	/	85	128.850
Média	18.5	26.085		81.5	106.668	15	52.731		85	145.318

Tabela 16 - Estatísticas descritivas dos aspectos citométricos segundo grupo

Variáveis	Grupo	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor
Leucocitos	G1	26085,00	3805,13	25735,00	19840	30800	0,002*
	G2	52731,67	16284,77	48400,00	34230	80100	
Mononucleares	G1	18,50	1,05	18,50	17	20	0,332
	G2	15,00	4,98	13,50	10	22	
Polimorfunucleares	G1	81,50	1,05	81,50	80	83	0,295
	G2	85,00	4,98	86,50	78	90	
Cels Carcinoma de Erlich (mm ³)	G1	106668,83	13410,11	105440,00	87360	127773	0,004*
	G2	145318,33	26992,60	133770,00	118800	187400	

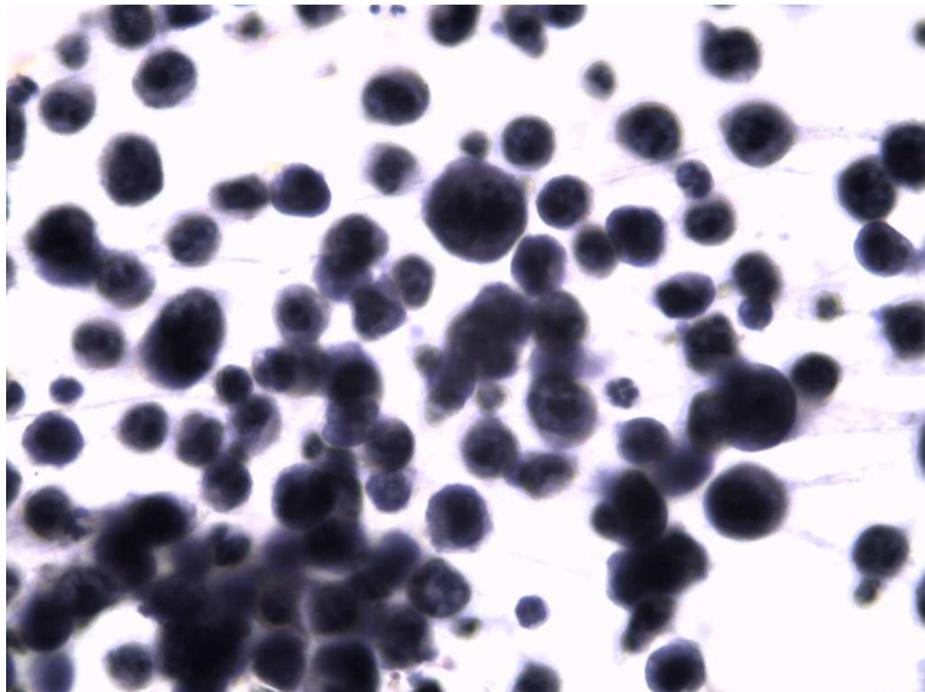
*estatisticamente significativa ($p < 0,05$)


Gráfico 3 – Box-plot comparativo contagem das Células de Carcinoma entre os grupos.

Analisando-se os resultados da tabela 17, pode-se afirmar que não existe qualquer diferença citomorfológica entre os grupos G1 e G2.

Tabela 17 - Líquido ascítico - Aspectos citomorfológicos

G1	G1A	G1B	G1C	G1D	G1E	G1F
1)Aumento vol. Nuclear	+	+	+	+	+	+
2)Hiperchromasia	+	+	+	+	+	+
3)Alt. rel. núcleo-citoplasma	+	+	+	+	+	+
4)Irreg. cont. nuclear	+	+	+	+	+	+
5)Cromatina c/ dist. Irregular	+	+	+	+	+	+
6)Nucléolo anorm. ou múltiplo	+	+	+	+	+	+
7)Mitoses atípicas	+	+	+	+	+	+
G2						
1)Aumento vol. Nuclear	+	+	+	+	+	+
2)Hiperchromasia	+	+	+	+	+	+
3)Alt. rel. núcleo-citoplasma	+	+	+	+	+	+
4)Irreg. cont. nuclear	+	+	+	+	+	+
5)Cromatina c/ dist. Irregular	+	+	+	+	+	+
6)Nucléolo anorm. ou múltiplo	+	+	+	+	+	+
7)Mitoses atípicas	+	+	+	+	+	+



**Figura 4 - Citologia cels Carcinoma de Ehrlich G1
G1-F-(Tratado)**

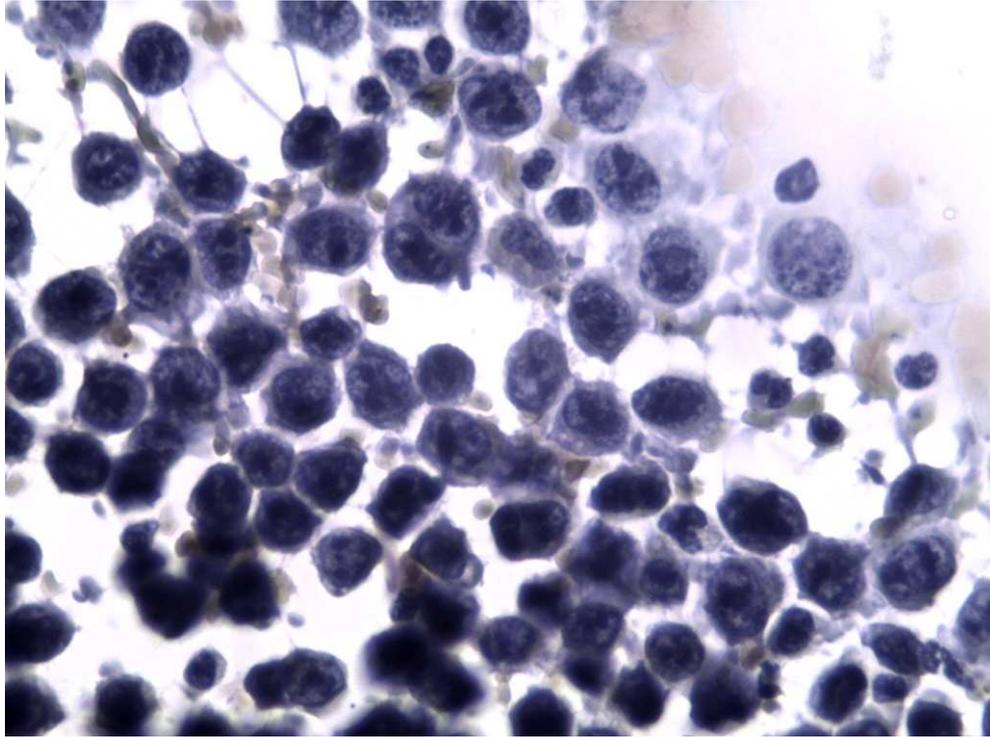


Figura 5 - Citologia cels Carcinoma de Ehrlich G2
G2-F (Controle)



5 DISCUSSÃO

A carcinomatose peritoneal constitui um desafio na Oncologia atual. Dado o seu amplo impacto epidemiológico , pois essa entidade representa , anualmente , aproximadamente 46.000 casos novos nos EUA e 17.700 no Brasil , e os estigmas relacionados com a mortalidade a ela referida , quase inexorável e ligada a intensa morbidade , foram propostas mudanças dos paradigmas de abordagem dessa doença ²⁷. Dessa forma, terapias mais agressivas, incluindo ressecções tumorais extensas e multiviscerais, com inclusão de áreas alargadas do peritônio, associadas ao uso de substâncias intraperitoneais, como agentes quimioterápicos e biológicos , além de medidas físicas , como hipertermia , passaram a ter lugar no arsenal terapêutico dessa afecção ¹⁰⁷.

Dada a complexidade e multifatorialidade das diferentes formas de apresentação clínica da carcinomatose peritoneal são necessários métodos de classificação dessa entidade para que se possa estabelecer uma rotina de abordagem diagnóstica e terapêutica dessa doença. Assim, foram estabelecidos critérios de classificação e estratificação dos pacientes portadores dessa enfermidade, não só para que se pudesse estabelecer comparação sistematizada em estudos prospectivos mult institucionais e internacionais, mas também para que se agrupassem pacientes que se beneficiassem de uma ou outra modalidade terapêutica em um dado momento, com a resposta objetiva máxima¹³. Além disso, é essencial a compreensão biológica e fisiopatológica da apresentação da carcinomatose para que se possa imprimir racionalidade e sistematização ao seu tratamento. Foi demonstrada a existência de áreas específicas do peritônio que se prestam à absorção de pequenas partículas para o subperitônio através de conglomerados de tecido linfóide, chamados “milk spots”. Esses elementos se situam principalmente no grande omento e no peritônio parietal da pelve, e seriam “portões” que permitem a entrada das células tumorais na camada subperitoneal , onde se estabelecem condições de nutrição e irrigação que possibilitam sua multiplicação . Essa localização corresponde

aos achados clínicos da carcinomatose peritoneal, que acomete inicialmente os sítios referidos.

A existência do chamado “fenótipo tumoral” permitiria a proliferação de um grupo minoritário de células, que tivessem o referido fenótipo, dessa maneira se estabelecendo a proliferação descontrolada que caracteriza as neoplasias. Um grupo amplamente majoritário de células desprendidas no peritônio não teria esse fenótipo e, conseqüentemente, não obteria condições nutricionais e vasculares de proliferação. A esse fenômeno se designou “ineficiência metastatizante”³⁸.

Durante evento da Sociedade Internacional para Estudo das Neoplasias do Peritônio, foi destacada a necessidade de, antes que se implementassem protocolos multi-institucionais e internacionais de tratamento da carcinomatose, os centros de tratamento especializados nesse tópico se voltassem para o laboratório e, a partir do estudos farmacológicos *in vitro* e *in vivo*, pudessem estabelecer a base para medidas cientificamente definidas. Dessa forma, naquele evento, o Dr Paul Sugabaker, pioneiro no tratamento e na experimentação sobre carcinomatose, lançou enfático apelo para que todos se voltassem para esse foco⁷. Desde então se impôs a necessidade de aprofundados estudos experimentais, com avaliação da dinâmica farmacológica dessas substâncias e drogas, para que se identificasse um efeito máximo no ambiente peritoneal.

A existência de centro de tratamento da carcinomatose no Nordeste do Brasil, provocou a concepção de um projeto no qual fosse aliada a experiência médica, clínica e cirúrgica, a experimentos que trouxesse racionalidade e base científica aos procedimentos indicados e realizados^{51,108}.

Este objetivo foi direcionado quando foi iniciado o projeto atual, constante do programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFPE, em associação com a Disciplina de Cancerologia Experimental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco e o Departamento de Antibióticos (DA) da mesma Universidade, este último tendo acumulado aproximadamente cinquenta anos de experiência com tumores experimentais.

No início da década de 1950, foram importadas do Instituto de Tumores de Milão, na Itália, e trazidas para o D.A. da UFPE linhagens de tumores experimentais,

entre elas as da forma sólida e ascítica do carcinoma de Ehrlich. Nesse período, foi gerada significativa e reconhecida produção nesse campo, compreendendo trabalhos científicos e substancial produção acadêmica nas esferas de graduação e pós-graduação^{8,11,21,105,109,110}. Nesses estudos, foi avaliada a ação antineoplásica de vários derivados de plantas, e, mais recentemente, do extrato alcóolico das folhas de *P.amboinicus*. Foram testadas respostas em relação ao sarcoma 180 e ao Carcinoma de Ehrlich na sua forma sólida e houve inibição do crescimento tumoral superior a 66% na média dos grupos estudados. A análise macroscópica dos animais tratados com a citada substância mostrou hepatomegalia, esplênomegalia e, curiosamente produção de ascíte, o que pode sugerir efeito sistêmico da forma sólida desse tumor²³.

Nessa fase foi comparada a ação do extrato alcóolico do *Pa* com o tratamento padrão considerado com o quimioterápico metotrexato na dose de 10mg/kg. Observou-se também que não havia uma correlação linear entre o efeito do derivado da planta e a dose empregada, situando-se a margem entre 150 e 250mg/kg como a de maior eficiência¹⁰⁰.

Os flavonoides, compostos fenólicos encontrados em diversos vegetais, tem reconhecida atividade biológica, inclusive anti-tumoral^{67,110}. Estudos em diversas esferas epidemiológicas, laboratoriais e clínicas indicam esses compostos não só com ação antineoplásica, como preventiva de tumores¹¹.

A análise fitoquímica das folhas *P. amboinicus* demonstrou a existência de flavonoides como a luteolina, quecitina e rutina. Os dois últimos, comprovadamente, atuam contra uma variedade de modelos experimentais de tumores induzidos pelo dimetilbenzenoantraceno e localizados na mama e na pele de ratos. Também os tumores colo-retais induzidos pelo azoximetano tem resposta a essas substâncias e os tumores de pele induzidos pelo acetato de tetradexanoilforbol (TPA)¹⁰⁵.

É comprovado que a ação desses compostos fenólicos se exerce através de efeito antioxidante, inibição da proliferação celular, estímulo da apoptose e inativação de carcinógenos¹⁰⁹.

Outras substâncias como os denominados terpenóides e derivados cinâmicos, também constantes no *P.amboinicus*, tem comprovado efeito antineoplásico¹¹.

Por outro lado, o carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA) é um dos tumores experimentais mais comuns. Relatado inicialmente como um carcinoma mamário de ocorrência espontânea em ratas¹⁰⁰, é um tumor indiferenciado com alta capacidade de transplante, ausência de regressão espontânea, rápida proliferação e curto tempo de vida. Também a ausência de um antígeno específico de transplante tumoral (AETT) é uma característica importante sua¹⁰³. Frequentemente a virulência do tumor aumenta com transplantes repetidos. Nessa fase a diferenciação desaparece e as células ganham mecanismos de crescimento autônomos e, nessa etapa, assumem a forma ascítica. A ascite do CEA tem a cor cinza claro e pode se tornar viscosa e rutilante. Em média contém 10 milhões de células por cada 0.1 ml. São produzidos de 4 a 12 ml de ascite após o 6º dia do transplante⁷³.

Ocorrem duas fases na reprodução das células do CEA. A primeira, designada de proliferativa, se estende até o 9º dia após o transplante, e é seguida por uma fase de plateau. Então surgem alterações morfológicas e metabólicas, como deteriorização estrutural, diminuição do número de mitocôndrias e decréscimo na síntese de DNA e RNA. Ocorre também perda de purinas e pirimidinas intranucleares, bem como declínio da concentração de ATP e da síntese protéica.

Para acumulação do líquido ascítico contribui um fator de permeabilidade vascular (FPV), também denominado de fator de motilidade autócrina (FMA) que estimula um aumento do número e sensibilidade dos receptores de permeabilidade, associado a um incremento dos níveis do próprio FPV. A ligação do FPV ao seu receptor induz angiogênese e aumenta a permeabilidade vascular por alterar a morfologia das células endoteliais. É interessante destacar que esse efeito não se expressa em vasos fora do peritônio¹⁰⁴.

Está referida também uma inibição provocada pelo CEA, na proliferação medular de células sanguíneas com correspondente declínio dos elementos figurados no sangue periférico¹⁰⁰.

Foi relatado também um fator estimulador da atividade mitótica (FEAM) e foi documentado aumento da síntese de DNA provocado por esse fator em alguns tecidos, como, por exemplo, o fígado, epitélio da língua e glândulas salivares¹⁰³.

Evidências experimentais demonstraram a factibilidade da realização de experimentos utilizando o CEA, que se presta, portanto, como modelo adequado e disponível em nosso meio, a partir do qual poderão ser produzidos conhecimentos que supram as necessidades experimentais que suportem os ensaios clínicos posteriores.

Evidentemente, dada a importância epidemiológica das neoplasias, com as conseqüentes e progressivas demandas geradas desse fato, o papel de um centro universitário com extensa experiência experimental nessa área deve se somar ao contexto científico e médico assistencial da nossa região .

Dessa forma, esse primeiro trabalho que vincula o Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE à Faculdade de Farmácia, à Disciplina de Cancerologia Experimental e ao Departamento de Antibióticos dessa Universidade, estabelece um balizamento para futuros projetos em continuidade ao atual e prenuncia a consolidação do estudo da Cancerologia Experimental na UFPE.

Há considerável experiência brasileira com o uso de derivados de plantas por via intraperitoneal para tratamento de tumores ascíticos experimentais^{11,8,109}.

Também na literatura internacional é descrita experiência de centros de pesquisa com esse tópico^{10,99}.

Várias drogas antineoplásicas de uso corrente na prática oncológica, como a vincristina, a vinblastina, o irinotecano, o topotecano e os taxanos, são derivadas de plantas. Essas substâncias, comprovadamente, além do efeito citotóxico direto, estimulam o sistema imune através de diferentes vias, com incremento na imunidade humoral e celular⁸¹.

Com a participação do autor do estudo atual em atividades ligadas ao tratamento cirúrgico da carcinomatose^{51,108} e a experiência acumulada no Departamento de Antibióticos da UFPE com tumores experimentais^{8,21,23,109} foi planejado projeto para utilização de um derivado da planta *Plectranthus amboinicus*, por via intraperitoneal, para tratamento da carcinomatose peritoneal, a partir de estudos prévios acima citados, os quais avaliaram o efeito do *Pa* em tumores sólidos^{11,100}.

No que se refere aos resultados do presente estudo podemos enumerar :

Em relação à variação do peso nos dois grupos, a primeira, mais óbvia e predominante interpretação do aumento do peso no grupo controle é de que houve maior aumento da ascite. Em princípio, portanto, esse dado indica uma resposta em relação à ascite no grupo em que foi utilizado o *EAPa*.

Outras interpretações podem alegar diminuição da ingesta no grupo tratado, o que não foi objeto de avaliação específica nesse estudo, ou perdas aumentadas de fezes e urina ainda nesse grupo, o que não foi especificamente observado ao longo do experimento.

Por outro lado, em tese, a injeção de 0.5 ml de solução salina no peritônio do grupo controle, com animais de peso médio de 42 g , poderia carrear líquidos para o peritônio devido ao teor de sódio dessa solução . No entanto, habitualmente, os modelos experimentais descritos na literatura utilizaram a solução salina, no volume em tela adotado, até com volumes maiores, como 02 ml ⁹⁹, sem qualquer citação a interferência nesse tópico ^{9,11,27}. A utilização de PBS em injeções peritoneais no grupo controle pode ser uma alternativa viável ⁶⁹.

No que se refere à dose de *EAPa* utilizada (200 mg/kg) observe-se que a mesma foi aproximada entre as maiores respostas observadas em estudo prévio com a forma sólida do carcinoma de Ehrlich, que consistiram em uso de um derivado hidroalcoólico do *EHPa*, utilizado por via *ip* na dose de 100 e 150 mg/kg , com redução do volume tumoral, respectivamente, de 74% e 61% e que não houve ganho de resposta com dose acima de 200 mg/ kg¹¹ . Por outro lado, estudos de toxicidade aguda permitiram observar que injeções intraperitoneais de *EHPa* em doses de 500 a 3.800 mg/kg não levam a mortalidade e implicam em baixa e fugaz toxicidade no SNC e SNA, o que permite seu uso com certa liberalidade em relação aos efeitos tóxicos¹⁰⁰.

No que reporta à piloereção, que ocorreu exclusivamente em G1 (grupo tratado) a partir do D4, atribue-se esse fenômeno à presença de óleos essenciais no *EAPa* que provocam esse tipo de reação, tendo sido relatadas alterações cutâneas com o uso de derivados dessa planta¹⁰⁶. Também situações de stress e de dor podem provocar esse tipo de reação cutânea, o que se deve considerar nessa circunstância ¹⁰⁰.

Em relação à mobilidade, não foi observada diferença entre os grupos no período de observação diária dos animais, apesar de não haver avaliação especificamente sistematizada desse parâmetro. A observação desse tópico, ao longo do experimento, pode ser feita se padronizando um período de tempo pré-determinado em que se possam avaliar vários itens, inclusive comparativos, em relação a esse fator. Em princípio, alterações da mobilidade se devem a fatores ligados à toxicidade, e, em fases mais tardias, a progressão tumoral.

As medições abdominais com paquímetro tem como objetivo avaliar o aumento do volume abdominal, o qual pode refletir um aumento da ascite um incremento da ascite. No entanto existem fatores, como imprecisão dos limites anatômicos e mobilização dos animais durante a medição, que tornam essas avaliações sujeitas a erros.

Apesar disso houve diferença significativa ($p=0.003$) na medição abdominal transversa no 9º dia do experimento, havendo maior valor nos animais do grupo controle - G2, que, por inferência, apresentava maior volume de ascite do que o grupo tratado - G1.

Ressalte-se que a medição transversa nos parece mais fidedigna que a longitudinal devido à maior precisão nas referências antômicas no primeiro caso.

Um resultado crucial para avaliação do presente estudo é o volume da ascite medido em ambos os grupos no D9. Há marcante diferença nos volumes entre G1 e G2, sendo a média do grupo tratado - G1 de 2,58 ml e a do grupo controle - G2 12,97 ml ($p=0,002$), sabendo-se que o volume médio da ascite no CEA na sua fase proliferativa (até o 10º dia) gira em torno de 10 ml, o que sugere fortemente efeito do EAPa no controle da ascite e, portanto, do tumor.

Também foram observadas diferenças no aspecto visual e nas características físicas da ascite nos dois grupos. Notado no grupo G2 a ascite com o aspecto classicamente descrito no carcinoma de Ehrlich, ou seja, como visto na maioria dos casos nesse grupo, hemático e fluido.

Já no grupo tratado (G1) o líquido ascítico, embora hemático, tinha aspecto turvo e mais denso, com depósitos de fibrina em um dos animais. Pode-se atribuir

esse fato a aspecto irritativo local peritoneal ou eventual contaminação por microorganismos, cuja determinação não foi objeto específico do presente estudo.

Um fato que deve ser considerado é o de que houve perdas inevitáveis de líquido ascítico durante a laparotomia, e as mesmas foram minimizadas, na medida do possível, durante o experimento.

Em relação a implantes tumorais na parede abdominal nenhum caso apresentou esse achado no grupo tratado - G1, enquanto quatro animais o demonstraram no grupo controle - G2, o que corresponde a 66.7% dos casos. A primeira interpretação seria a de que o EAPa promoveu proteção quanto ao implante na parede abdominal. Esse é o mecanismo mais provável. No entanto, não se pode desconsiderar a possibilidade de injeções do líquido indutor do CEA na espessura da parede abdominal, inadvertidamente, no D1. Essa causa seria facilmente excluída sendo padronizados os locais de punção e sendo tatuados os mesmos, por exemplo, no sentido de diferenciar as duas situações. Do ponto de vista estatístico, considerado o tamanho das amostras, descreveu-se uma tendência para significação estatística entre os dois grupos em relação a esse tópico ($p=0,051$ - teste Exato de Fisher).

Quanto aos aspectos citométricos, foi observado diferença estatisticamente significativa no número de leucócitos sendo que o grupo tratado -G1 teve uma menor contagem global que o grupo controle - G2 (média 26.085,00 *versus* m 52.731,67 respectivamente). Essa diferença não foi estatisticamente relevante quando analisados, em separado, os mononucleares e polimorfonucleares.

Esse dado discrepa da literatura, pois é descrita uma relação entre o fluxo de leucócitos no peritônio e a inibição do crescimento tumoral, bem como a presença de infiltrado inflamatório (macrófagos e polimorfonucleares) no estroma e na periferia de tecidos neoplásicos, como fator prognóstico, reforçando a dependência inversa entre a inflamação e o crescimento tumoral^{8,91}. No entanto essa observação não é consensual, pois há relatos de experimentos com derivados de plantas em uso ip em tumores de Ehrlich ascítico nos quais observou-se reduções importantes no número de leucócitos peritoneais como expressão colateral do efeito antineoplásico²⁷.

Foi demonstrado que a resposta neutrofílica é essencial no controle do tumor. Mas também que o alto influxo dessas células pode provocar crescimento tumoral.

Esse efeito é, provavelmente, relacionado com a angiogênese e os fatores de crescimento tumoral induzidos pela inflamação que faz parte do processo de expansão da neoplasia. O CEA, por si só, induz reação inflamatória local, com incremento da permeabilidade vascular, que resulta em edema, migração celular e produção progressiva de ascite⁸.

É relatada a possibilidade de medição do influxo de leucócitos por amostragem do líquido ascítico durante um experimento, inclusive com a contagem de macrófagos e avaliação da resposta inflamatória relacionada com o efeito anti-tumoral. Assim, poderiam ser correlacionados os dois fatores e ser inferida a importância de cada um, isoladamente⁹.

No entanto, o fato de maior relevância e de expressão crucial em relação aos resultados da citometria é a contagem total de células do carcinoma de Ehrlich nas amostras de líquido ascítico. Foi verificada contagem média de 106.668,83 cel/mm³ no grupo tratado-G1 versus 145.318,33 cel/mm³ no grupo controle (p=0,004). Dessa maneira, obteve-se um resultado objetivo de resposta ao EAPa.

No que se refere aos aspectos citológicos, dos sete itens morfológicos analisados de forma padronizada por citologista de larga experiência, que não tinha informação prévia sobre o grupo das lâminas analisadas não foi observada qualquer diferença entre o grupo tratado-G1 e o controle -G2.

A interpretação desse achado é complexa, principalmente quando cotejada com evidências objetivas de resposta no grupo tratado com o EAPa, como o menor medição abdominal transversa, menor volume de ascite e percentual de implantes na parede, e, principalmente, a contagem das células do carcinoma de Ehrlich .

Uma modalidade de refinamento na marcação dessas células seria o mapeamento das mesmas com métodos imunocitológicos, utilizando anticorpos anti-bromodeoxyuridina¹⁰⁰.

Também a coloração por imunocitologia, com a utilização de carbono ativado associado a anticorpos, pode definir critérios mais aprimorados de avaliação das células tumorais, muito além do mero aspecto morfológico³³.

O líquido ascítico coletado no CEA também pode ser fixado com álcool metílico e corado pela prata, para avaliação das regiões organizadoras de nucléolos

(AgNORs). Assim, pode-se calcular a porcentagem e relação de células escuras e claras e o número médio de AgNORs por lâmina. Essas formações podem ser consideradas como unidades ativas de regiões organizadoras de nucléolos, e, conseqüentemente, do potencial proliferativo das células⁷³.

A utilização das AgNORs para avaliar a capacidade proliferativa das células tumorais considera, além do seu número, a distribuição, formato e eventual coalescência. A freqüência delas é significativamente maior nas células neoplásicas do que nas células simplesmente reacionais. Esse recurso é um método de prognóstico complementar, e foi demonstrado que a sua disposição, número e forma estão associados aos níveis de transcrição do DNA e, portanto, à multiplicação celular¹⁰.

Por outro lado, no presente estudo, pode-se supor que o efeito citomorfológico do EAPa só ocorreria em prazos maiores, e também que métodos mais finos de análise, como a Imunocitoquímica e outros meios, podem contribuir no aprofundamento das informações citológicas, em estudos futuros.



6 CONCLUSÕES

- A- A utilização intraperitoneal do extrato aquoso do *Plectranthus amboinicus* é factível e implica em baixa toxicidade;
- B- A forma ascítica do Carcinoma de Ehrlich se presta a estudos experimentais utilizando o Extrato Aquoso do *Plectranthus amboinicus*;
- C- Houve resposta tumoral no grupo tratado no que se refere a parâmetros biométricos: peso e medição abdominal transversa;
- D- Constatou-se diminuição da ascite no grupo tratado;
- E- Houve implantes tumorais na parede abdominal no grupo controle, o que não ocorreu no grupo tratado;
- F- Foi verificada contagem de células do carcinoma de Ehrlich em menor número no líquido ascítico do grupo tratado;
- G - Não houve diferenças citomorfológicas no líquido ascítico entre os dois grupos.



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo procurou contribuir para o esforço da comunidade científica e dos oncologistas no sentido de entender melhor e tratar com mais eficiência e sistematização a carcinomatose peritoneal, uma entidade complexa, multifatorial e, até poucos anos atrás, tida como inexoravelmente fatal.

Procuramos atender à convocação dos centros de pesquisa no sentido de buscar nos laboratórios de oncologia experimental, especificamente nesse tópico, respostas que possam ser aplicadas à nossa atividade médica diária.

A expressiva experiência do Departamento de Antibióticos da UFPE na Cancerologia Experimental, que permeou várias gerações de pesquisadores, foi fundamental para a viabilização desse experimento. A sensibilidade dos que compõe o Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, receptivos à importância da primeira dissertação na área de Oncologia foi essencial para a sua concretização.

Estamos absolutamente convencidos de que outros pesquisadores nessa área contribuirão para a implantação de uma linha de pesquisa regular nesse campo na UFPE.

O carcinoma de Ehrlich na forma ascítica constitui modelo experimental de características definidas e comportamento biológico previsível. Essa neoplasia se presta à utilização de substâncias biológicas e drogas no sentido de testar toxicidade e efeito antineoplásico.

Estudos prévios demonstraram o efeito de derivados da planta *Plectranthus amboinicus* injetados no peritônio de camundongos para avaliação de seu efeito sobre formas sólidas subcutâneas do carcinoma de Ehrlich. Não havia estudos em nosso meio que testassem esse efeito na forma ascítica dessa neoplasia experimental.

O presente estudo mostrou evidências biométricas, clínicas e citométricas de efeito antitumoral no grupo tratado em relação ao grupo controle.

Projetam-se, para um futuro breve, estudos que identifiquem componentes químicos isolados do *Plectranthus amboinicus*, especialmente os flavonóides, quando serão avaliados seus efeitos na indução da apoptose e outros mecanismos antineoplásicos.



REFERÊNCIAS

- 1 Vilhena , LS. Os Padres e a teologia da ilustração: Pernambuco 1817. In: Siqueira AJ . Recife: Editora Universitária UFPE; 2009. p. 163.
- 2 Gurgel C. Doenças e curas: o Brasil nos primeiros séculos. São Paulo: Contexto; 2010. p. 60
- 3 Nascimento FR, Cruz GV, Pereira PV, Maciel MC, Silva LA, Azevedo AP et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by chenopodium ambrosioides L. Treatment Life Sci. 2006;78:2650-3.
- 4 Sugarbaker PH, Mora JT, Carmignani P. Cytoreduction and hypertermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. Ann Surg Oncol. 2008;15:2426-32.
- 5 Hamilton CA, Maxwell GL, Chernofsky MR, Bernstein SA, Farley JH, Rose GS. Intraperitoneal bevacizumab for the palliation of malignant ascites in refractory ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2008;111:530-2.
- 6 Elias D, Lefevre JH, Chevalier J, Brouquet A, Marchal F, Classe JM et al .Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. J Clin Oncol. 2009;27:681-5.
- 7 6th International Workshop on Peritoneal Surface Malignancy; 2008 nov 17-19;. Lyon , France.
- 8 Vieira JRC, Souza IA, Nascimento SC, Leite SP. Indigofera suffruticosa: An alternative anticancer therapy. Cam advance Access Published. 2006.
- 9 Pagno T, Blind LZ, Biavatti MW, Kreuger MR. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from Vernonia scorpioides (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. Braz J Med Biol Res. 2006;39:1483-91.
- 10 Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by Glycyrrhiza glabra. Int Immunopharmacol. 2006;6:494-8.
- 11 Gurgel APDG, Silva JG, Grangeiro ARS, Oliveira DC, Lima CMP, Silva ACP, et al. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from Plectrathus amboinicus (Lour) spreng (Lamiaceae). J Ethnopharmacol. 2009;125:361-3.

- 12 De Vita VT, Hellman S, Rosenberg AS. Cancer: principles and practice of oncology. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- 13 Sugarbaker PH, Mora JT, Carmignani P. Update on chemotherapeutic agents perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Oncologist*. 2005;10:112-22.
- 14 Esquivel J, Sticca R, Sugarbaker P, Levine E, Yan TD, Alexander R et al . Cytoreductive surgery and hipertermic intraperitoneal chemotherapy in the management of peritoneal surface malignancies of colonic origin: a consensus statement. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:128-133.
- 15 Los G, Van Vugt MJH. Effects of temperature on the interaction of cisplatin and carboplatin with celular DNA. *Biochem Pharmacol*. 1993;46:1229-37.
- 16 Menon C, Kutney SN, Lehr SC, Hendren SK, Busch TM, Hahn SM. Vascularity and uptake of photosensitizer in small human tumor nodules: implications for intraperitoneal photodynamic therapy. *Clin Can Res*. 2001;7:3904-11.
- 17 Elias D, Bonnay M, Puizillou JM. Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics and tissue distribution. *Ann Oncol*. 2002;13:267-72.
- 18 Lechanteur C, Princen F, Lo Bue S, Detroz B, Fillet G, Gielen et al . HSV-1 thymidine kinase gene therapy for peritoneal carcinomatosis. *Adv Exp Med Biol*. 1998;451:115-9.
- 19 Benoit L, Duvillard C, Rat P, Chauffert B. The effect of intra-abdominal temperature on the tissue and tumor diffusion of intraperitoneal cisplatin in a model of peritoneal carcinomatosis in rats. *Chirurgie*. 1999;124:375-9.
- 20 Elias D, Sideris L, Pocard M, Edè C, Ben Hassouna D, Ducreux M, et al. Efficacy of intraperitoneal chemohypertermia with oxalaplating in colorectal peritoneal carcinomatosis: preliminary results in 24 patients. *Ann Oncol*. 2004;15:781-5.
- 21 Asfora, JJ. Contribuição ao tratamento da leucemia aguda pela Retamicina. Recife. [Tese]. Recife: UFPE; 1976.
- 22 Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K, Taniguchi H, Shimotsuma M, Okano S et al . Milky spots at the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res*. 1993;53:687-92.
- 23 Pereira, LFLC. Avaliação de citotoxicidade e atividade antitumoral em preparações contendo lecitinas autóctones [Tese]. Recife: UFPE; 1995.
- 24 Levy HM, Montanez G, Feaver ER, Murphy EA, Dunn MS. Effect of arginine on tumor growth in rats. *Cancer Res*. 1954;14:198.

- 25 Collins JM, Dedrick, RL, Flessner MF. Concentration dependent disappearance of fluorouracil from peritoneal fluid in the rat: experimental observations and distributed modelling. *J Pharm Sci.* 1982;71:735-8.
- 26 Gupta M, Mazumder UK, Rath N, Mukhopadhyay DK. Antitumor activity of methanol extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich ascites carcinoma. *J Ethnopharmacol.* 2000;72:151-6.
- 27 Gupta M, Mazunder UK, Kumar RS, Kumar TS. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25:1070-6.
- 28 Zhang Z, Knobloch TJ, Seamon LG, Stoner GD, Cohn DE, Paskett ED, Fowler JM, Weghorst CM. A black raspberry extract inhibits proliferation and regulates apoptosis in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2011;123:401-6.
- 29 Stewart J. Intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal surface malignancy: current status and future directions. *Ann Surgl Oncol.* 2005;12:765-77.
- 30 Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Cancer. Estimativa de casos de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2012. www.inca.gov.br (06/2012)
- 31 Watters WB, Buck RC. Scanning electron microscopy of mesothelial regeneration in the rat. *Lab Invest.* 1972;26:604-9.
- 32 Gilly FN, Carry PI, Sayag AC. Regional chemotherapy with mitomycin C and intraoperative hyperthermia for digestive cancers with peritoneal carcinomatosis. *Hepatogastroenterology.* 1994;41:124-9.
- 33 Kennedy AW, Markman M, Webster KD. Experience with platinum-paclitaxel chemotherapy in the initial management of papillary serous carcinoma of the peritoneum. *Gynecol Oncol.* 1998;71:288-90.
- 34 Glehen O, Osinsky D, Peritoneal carcinomatosis: a phase II study. *J Clin Oncol.* 2003;21:799-806.
- 35 Bereder J, Sautot-Vial N, Karimdjee B, Mounier N, Habre J, Beniziri E. et al. Secondary surgery with intraoperative chemo-hyperthermia in recurrent ovarian adenocarcinoma: prognostic factor analysis on 108 patients [abstract]. *J Clin Oncol.* 2008; Suppl 20:5548. Abstract.
- 36 Portilla AG, Sugarbaker PH, Chang D. Second-look surgery after cytoreduction and intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: analysis of prognostic features. *World J Surg.* 1999;23:23-9.

- 37 Kusamura S, Younan R, Baratti. Cytoreductive surgery followed by intraperitoneal hyperthermic perfusion: Analysis of morbidity and mortality in 209 peritoneal surface malignancies treated with closed abdomen technique. *Cancer*. 2006;106:1144-53.
- 38 Hagiwara A, Takahashi T, Ueda T, Lee R, Takeda M, Itoh T. Intraoperative chemotherapy with carbon particles adsorbing mitomycin C for gastric cancer with peritoneal dissemination in rabbits. *Surgery*. 1988 ;104: 874-81.
- 39 Los G, Ruevekamp M, Bosnie N. Intraperitoneal Tumor Growth and Chemotherapy in a Rat Model. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol*. 1989;26:1857-66.
- 40 Los G, Verdegall EME, Mutsaers PHA, Mcvie JG. Penetration of carboplatin and cisplatin into rat peritoneal tumor nodules after intraperitoneal chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1991;28:159-65.
- 41 Perez RP, Perez KM, Handel LM, Hamilton TC. In vitro interaction between platinum analogues in human ovarium carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992;29: 430-4.
- 42 Raspagliesi F, Kusamura S, Campos Torres JC, de Souza GA, Ditto A, Zanaboni S et al. Cytoreduction combined with intraperitoneal hyperthermic perfusion chemotherapy in advanced/recurrent ovarian cancer patients: The experience of National Cancer Institute of Milan. *Eur J Surg Oncol*. 2006;32:671-5.
- 43 Kajitani T. Japanese Research Society for Gastric Cancer. *Jpn J Surg*. 1981;11: 127-39.
- 44 Zoetmulder FAN, Verwaal V. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (hipec) with mitomycin C significantly improves survival in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *ASCO Prog Proc*. 2002;21:147.
- 45 5th International Workshop on Peritoneal Surface Malignancy. 2006 dec 4-6. Milan (Italy). Milan: Fondazione de IRCCS. Istituto Nazionale dei Tumori; 2006.
- 46 Bristow RE, Montz FJ, Lagasse LD, Leuchter RS, Karlan BY. Survival impact of surgical cytoreduction in stage IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999;72:278-87.
- 47 Alberts DS, Liu PY, Hannigan EV, O'Toole R, Williams SD, Young JA, et al. Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. *N Engl J Med*. 1996;335:1950-5.

- 48 Alexander HR, Bartlett DL, Libutti SK. National Cancer Institute experience with regional therapy for unresectable primary and metastatic cancer of the liver or peritoneal cavity. In: Markman M, editor. Regional chemotherapy; clinical research and practice.. Totowa, NJ: Humana Press; 2000. (Current Clinical Oncology series)
- 49 Sugarbaker PH, Gianola FJ, Speyer JC, Wesley R, Barofsky I, Meyers CE. Prospective, randomized trial of intravenous versus intraperitoneal 5-fluorouracil in patients with advanced primary colon or rectal cancer. *Surgery*. 1985;98:414-22.
- 50 Los G, Sminia P, Wondergen J. Optimisation of intraperitoneal cisplatin therapy with regional hyperthermia in rats. *Eur J Cancer*. 1991;4:472-477.
- 51 Miranda E, Miranda PHD, Santos RL, Patu, A C S, Martins, M R; Rocha, RR. Experiência inicial com cirurgia citoreduzora e quimioterapia hipertérmica intraperitoneal (HIPEC). X Congresso da Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica; 13-14 out 2011; Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica; 2011.
- 52 Verwaal VJ, Bruin S, Boot H, van Slooten G, van Tinteren H . 8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:2426-32.
- 53 Fujiyama J, Nakase Y, Osaki K, Cisplatin incorporated microspheres: development and fundamental studies for its clinical application. *J Control Release*. 2003;89:397.
- 54 Chung M, Kozuch P. Treatment of malignant ascites. *Curr Tre Opti Oncol*. 2008;9:215-33.
- 55 Costa PM, Defleur V, Lejeune FJ. Transplantable carcinoma of the large intestine in BD IX rats: a new model for study of metastatic dissemination and experimental therapeutics. *A Zool Pathol Antwerp*. 1979;72:65-76.
- 56 House AK, Maley MA. Clinical and in vivo response following surgery or surgery plus adjuvant chemotherapy or immunotherapy for colorectal carcinoma in a rat model. *J R Soc Med*. 1983;76:833-40.
- 57 Takada M, Tani Y, Miyamoto M. Intraperitoneal transplantation derived from spontaneous colonic cancer of WF rat strain. *Gan Kagaku Ryoho*. 1984;11:487-91.
- 58 Saji S, Umemoto T, Kida H, Sakata K. Antitumor effect in peritoneal carcinomatosis of intraperitoneal administration of a streptococcal preparation, OK-432: I. Experimental study in the rat. *J Surg Oncol*. 1985;30:46-51.
- 59 Minárovits J, Karczag E, Földes I. Effect of poly I: C-activated peritoneal cells on the take of transplantable murine tumours. *Acta Microbiol Hung*. 1987;34-4:197-205.

- 60 Zakris EL, Dewhirst MW, Riviere JE, Hoopes PJ, Page RL, Oleson JR. Pharmacokinetics and toxicity of intraperitoneal cisplatin combined with regional hyperthermia. *J Clin Oncol.* 1987;5:1613-20.
- 61 Jeannin JF, Lagadec P, Pelletier H, Reisser D, Olsson NO, Chihara G, Martin F. Regression induced by lentinan, of peritoneal carcinomatoses in a model of colon cancer in rat. *Int J Immunopharmacol.* 1988;10:855-61.
- 62 Archer SG, Gray BN. A new reproducible model of hepatic and peritoneal metastases from colonic carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988;24:1623-32.
- 63 Fjeld JG, Vergote I, De Vos L, Nustad K. Radio-immunotargeting in experimental animal models of intraperitoneal cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1992;155:105-11.
- 64 Malik ST, East N, Boraschi D, Balkwill FR. Effects of intraperitoneal recombinant interleukin-beta in intraperitoneal human ovarian cancer xenograft models: comparison with the effects of tumour necrosis factor. *Br J Cancer.* 1992; 65:661-6.
- 65 Li WJ, Qian HN, Li WJ, Qian HN. Human ovarian epithelial adenocarcinoma with peritoneal metastasis and ascites established in murine models. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1993;28:38-40.
- 66 Fu X, Hoffman RM. Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patient specimens. *Anticancer Res.* 1993;13:283-6.
- 67 Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res.* 1994;54:4726-8.
- 68 Pratesi G, Tortoreto M, Corti C, Giardini R, Zunino F. Successful local regional therapy with topotecan of intraperitoneally growing human ovarian carcinoma xenografts. *Br J Cancer.* 1995;71:525-8.
- 69 Los G, Mutsaers PHA, Ruevekamp M, McVie JG. The use of oxaloplatin versus cisplatin in intraperitoneal chemotherapy in cancers restricted to the peritoneal cavity in the rat. *Cancer Letters.* 1990;51:109-17.
- 70 Los G, Tuyt L, Van Vugt. Combination treatment of cis and carboplatin in cancers restricted to the peritoneal cavity in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1993;32:425-33.
- 71 Los G, Van Vugt MJH, Pinedo HM. Response of peritoneal solid tumors after intraperitoneal chemohyperthermia treatment with cisplatin or carboplatin. *Br J Cancer.* 1994;69:235-41.

- 72 Ozols R f, Locker GY, Doroshow JH. Pharmacokinetics of Adriamycin and tissue penetration in murine ovarian cancer. *Cancer Res.* 1979;39:3209-14.
- 73 Nagel JD, Los G, Begg AC, Mc Vie JG. A new intraperitoneal model in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1990;27:121-4.
- 74 Carrazoni EP. *Plantas medicinais de uso popular.* Recife: Fasa; 2000.
- 75 Freitas TA. *Etnobotânica das plantas medicinais de Madre de Deus.* Bahia: Sitientibus; 2006. p.113-37. (Série Ciências Biológicas; 6).
- 76 Calixto JB. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 2000;33:179-89.
- 77 Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifânio RA. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Quim Nova.* 2002;25:45-61.
- 78 Montanari CA, Bolzani VS. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quim Nova.* 2001;24:105-11.
- 79 Cragg GM, Newmann D. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation.* 1999;17:153-63.
- 80 Guerra PM, Nodari OR. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões MO, editor. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 3a ed. Porto Alegre: UFRGS; 2001.
- 81 Prance GT. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? *Ann Missouri Bot Gard,* 1977;64:559-684.
- 82 Liu X, Piao YS, Arnold JT. Transforming growth factor $\beta 1$ increase of hydroxysteroid dehydrogenase proteins is partly suppressed by red clover isoflavones in human primary prostate cancer-derived stromal cells. *Carcinogenesis.* 2011;32:1648-54.
- 83 Koshiura R, Miyamoto K, Ikeya Y, Taguchi H. Antitumor activity of methanol extract from roots of *Agrimonia pilosa* Ledeb). *Jpn J Pharmacol.* 1985;38:9-16.
- 84 Yoon TJ, Yoo YC, Choi OB, Do MS, Kang TB, Lee SW, et al. Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice. *JB Cancer Lett.* 1995;97:83-91.
- 85 Thoppil RJ, Bishayee A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World J Hepatol.* 2011;3:228-49.

- 86 Asensi M; Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela J M. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011;48:197-216.
- 87 Rasul A, Yu B, Khan M, Zhang K, Iqbal F, Ma T, Yang H. Magnolol, a natural compound, induces apoptosis of SGC-7901 human gastric adenocarcinoma cells via the mitochondrial and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol*. 2012; 40: 1153-61.
- 88 Ellis LZ, Liu W, Luo Y, Okamoto M, Qu D, Dunn JH, Fujita M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses melanoma growth by inhibiting inflammasome and IL-1 β secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;414: 551-6.
- 89 Choy YM, Kwok KP, Fung, Lee CY. Effect of garlic, chinese medicinal drugs and aminoacids on growth of Ehrlich ascites tumor cells in mice. *Am J Chin Med*. 1983;119:69-73.
- 90 Hirazumi A, Furusawa E, Chou SC, Hokama Y. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. *Proc West Pharmacol Soc*. 1994;37:145-6.
- 91 Babu TD, Kuttan G, Padikkala J. Cytotoxic and anti-tumor properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to centella asiática (L.) Urban. *J Ethnopharmacol*. 1995;48:53-7.
- 92 Jose JK, Kuttan G, Kuttan R. Antitumour activity of *Embllica officinalis*. *J Ethnopharmacol* 2001;75:65-69.
- 93 Rajeshkumar NV, Joy KL. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. *J Ethnopharmacol*. 2002;81:17-22.
- 94 Izevibigie EB. Discovery of water-soluble anticancer agents from a vegetable found in Benin city, Nigeria. *Exp Biol Med*. 2003;228:293-8.
- 95 Izevibigie EB, Bryant JL, Walker A. A novel natural inhibitor of extracellular signal-regulated kinases and human breast cancer cell growth. *Exp Biol Med*. 2004;229;163-9.
- 96 Lambertini E, Piva R, Kahn MT, Lamprotin I. Effects of extract from Bangladeshi medicinal plants on in vitro proliferation of human breast cancer cell lines and expression of estrogen receptor alpha gene. *Int J Oncol*. 2004;24: 419-23.
- 97 Howard CB, Stevens J, Izevibigie EB. Time and dose dependence modulation of phase 1 and phase 2 gene expression in response to treatment of MCF-7 cells with a natural anti-cancer agent. *Cell Mol Biol*. 2003;49:1057-66.

- 98 Leite SN, Palhano G. Wound healing activity and sistemic effects of *vernonia scorpioides* extract in guinea pig. *Fitoterapia*. 2002;73:496-500.
- 99 Oršolić N, Bevanda M, Kujundžić N, Plazonic A, Stajcar D, Kujundžić M. Prevention of Peritoneal Carcinomatosis in Mice by Combining Hyperthermal Intraperitoneal Chemotherapy with the Water Extract from Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L. *Planta Med*. 2010 May;76(8):773-9. Epub 2009 dec 23.
- 100 Gurgel APD. A importância de *Plectrathus amboinicus* como alternativa terapêutica-métodos experimentais. [Tese]. Universidade Federal de Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; 2007.
- 101 Ehrlich P, Apolant H. Beobachtungen über maligne mausentumoren. Berlin. *Klin. Wischr*. 1905;42:871-4.
- 102 Loewenthal H, Jahn G. Übertragung-suersuche mit carcinomatöser mause-asciteslussigkeit und_hr verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen. *Krebsforsch*. 1932;37:439-47.
- 103 Lettre R, Paweletz N, Werner D, Granzow C. Sublines of the Ehrlich-Lettre mouse ascites tumor: a new tool for experimental cell research. *Naturwissenschaften*, 1972;59:59-63.
- 104 Senger DR, Gali SJ, Dvorak MA, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-5.
- 105 Anjos JV, Mendonça FJB, Costa-Silva JH, Souza IA, Melo SJ. Estudo preliminar da toxicidade e das atividades anti-edematogênicas e anti-nociceptivas da 3,4-diidro-2-fenil-6-para-flúor-fenil-4-0x0-pirimidina-5-carbo-nitrila. *Lat Am J Pharm*. 2008;2:343-8.
- 106 Costa ALMR, Fuebtes V, Rodrguez C. Instructivo técnico del *Plectranthus amboinicus*(Lour.) Spreng. *Rev Plantas Medicinales*; 1998;3:51-3.
- 107 Yan TD, Black D, Savady R, Sugarbaker PH. Systematic review on the efficacy of cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal carcinoma *J. Clin. Oncol*. 2006;21:4011-9.
- 108 Miranda E, Pinto MM, Martins MR, Santos RL, Sobral L. Aspectos técnicos da cirurgia citoreduzora e quimioterapia hipertérmica intraperitoneal (HIPEC). *Rev Bras de Cancerol*. 2010;56:133-3.

109 Leite ACL, Santos LMF, Barbosa FF, Cardoso MVO, Moreira DRM, Souza IA. Synthesis of aminoacyl thiaolidones as potential antitumor agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2006;60:121-26.

110 Cancino JCC, Peters VM, Souza IA, Brandão AF, Borges LV, Guerra MO. Lapachol administered to rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769): teratogenic or embryotoxic? *Rev Bras de Zoociências*. 2008;10:65-71.



APÊNDICE

Artigo Original da tese

Estudo experimental do efeito antineoplásico do extrato aquoso do *Plectranthus amboinicus* na forma ascítica do carcinoma de Ehrlich¹

Experimental study of the antineoplastic effect of aqueous extract of *Plectranthus amboinicus* in Ehrlich ascites carcinoma

Miranda Brandão , E .(a) ; Souza , I.A. (b); Melo , C.M.L. (c)

a) Doutorando em Cirurgia .Centro de Ciências da Saúde . UFPE

b) Profa.Adjunta. Departamento de Antibióticos .UFPE

c) Prof. Adjunto .Programa de Pós-Graduação em Cirurgia .UFPE

Palavras-chave: Carcinomatose peritoneal ; *Plectranthus amboinicus*(Pa) ; Carcinoma de Ehrlich ascítico(CEA) ; Extrato aquoso de *Plectranthus amboinicus*(EAPa)

Resumo

A carcinomatose peritoneal corresponde a 46.000 casos novos /ano nos EUA e 17.700 no Brasil. Novos meios no seu tratamento , incluindo derivados de plantas , estão sendo testados.

Relevância Etnofarmacológica: Plectranthus amboinicus é uma planta medicinal utilizada extensamente no Brasil, especialmente na região Nordeste para o tratamento de diversas doenças , inclusive neoplasias.

Objetivo do estudo: Avaliar a atividade antitumoral do Extrato Aquoso de folhas do Plectranthus amboinicus (EAPa) utilizado por via intraperitoneal(ip)no tratamento da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich

Materiais e Métodos: Utilizados camundongos fêmeas de aproximadamente 30 g submetidas a indução do carcinoma de Ehrlich ascítico através da injeção de 0.3 ml de líquido ascítico transplantado. Realizada injeção ip de 200mg/kg de EAPa no grupo tratado e 0.5 ml de solução fisiológica no grupo controle por sete dias consecutivos. Avaliados parâmetros clínicos, biométricos, citométricos e citomorfológicos de resposta tumoral nos dois grupos

Resultados: Houve resposta clínica no grupo tratado com EAPa , estatisticamente significante($P < 0.05$) , em relação ao peso , medição abdominal transversa, volume da ascite e presença de implantes na parede abdominal . A contagem das células tumorais no líquido ascítico também foi menor no grupo tratado e não houve diferenças citomofológicas entre os grupos

Conclusão: O estudo demonstra resposta antitumoral no grupo tratado com EAPa, expressa por parâmetros biométricos , clínicos e citométricos .

1. INTRODUÇÃO

A carcinomatose peritoneal é um tema de destaque na Oncologia atual, tendo em vista a sua incidência, que corresponde a aproximadamente 46.000 casos novos anuais nos EUA e 17.700 no Brasil. A sua alta letalidade e mortalidade tem demandado estudo de novas formas de tratamento, aí incluída a terapia com derivados de plantas por via sistêmica e intraperitoneal (Vieira et al, 2006; Pagno et al, 2006; Hamilton et al, 2008; Elias et al, 2009).

O gênero *Plectranthus* compreende cerca de 300 espécies distribuídas na Ásia, África e Austrália e a espécie *amboinicus* é nativa da Ásia e distribuída nas Américas (Acosta, Fiebtes, Rodriguez, 1998). É conhecida popularmente no Brasil como "hortelã da folha grossa". Estudos farmacológicos demonstraram propriedades antioxidantes e citotóxicas nessa planta (Salman, Gimenez, Castilho, 1996; Hirose et al, 1995; Carrazoni, 2000).

As suas folhas contêm óleos essenciais, flavonóides terpenos e derivados cinamínicos, os quais tem propriedades antineoplásicas.

O uso empírico do *Plectranthus amboinicus* no Brasil, ocorre em diversas áreas, especialmente na região Nordeste, sob a forma de infusão com extrato bruto, para tratamento de diversas afecções como inflamações e tumores.

No sentido de dar suporte científico a essas observações foi realizado estudo experimental in vivo com extrato hidroalcoólico de folhas do *Plectranthus amboinicus* (EHPa) utilizado por via intraperitoneal, no tratamento da forma sólida do carcinoma de Ehrlich implantado no tecido celular subcutâneo de camundongos (Gurgel et al., 2009). Foi observada redução de 74% e 61% do volume tumoral quando empregadas as doses de EHPa de 100 mg/kg e 150 Mg / kg, respectivamente.

O presente estudo avalia o uso intraperitoneal do Extrato Aquoso do *Plectranthus amboinicus* (EAPa) na dose de 200 mg/kg, por via intraperitoneal (ip), para tratamento da forma ascítica do Carcinoma de Ehrlich. Foram avaliados comparativamente dois

grupos de camundongos e registrados dados clínicos e biométricos e também citométricos e citomorfológicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de *Plectranthus amboinicus* (Pa) foram coletadas no Herbário do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba e foram identificadas, sendo uma amostra depositada no Herbário da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA . Foi feita maceração das folhas de Pa in natura utilizando diluição com soro fisiológico para produção do extrato aquoso bruto (EAPa) .Obtida uma solução do EAPa conservada em refrigeração a 4 graus centígrados.

Os animais utilizados foram camundongos da espécie Albino Suíço (*Mus Musculus*), fêmeas, com peso médio de 30 g e aproximadamente 60 dias de vida. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, acondicionados em gaiolas tipo caixa plástica com grades de tamanho 20 cm (largura) por 30 cm (comprimento) por 12 cm (altura), em estante em posição horizontal e com piso revestido por maravalha de pinus.

Utilizado padrão sanitário convencional com limpeza das gaiolas a cada três dias e troca da maravalha.

As gaiolas foram mantidas em ambiente refrigerado com temperatura média de 22 +/- 2 oC e umidade ambiente.Utilizado regime de luminosidade de 12 h claro e 12 h escuro. Empregada ração industrializada para roedores do tipo Labina® e água potável ad libitum. Constituídos dois grupos de animais, cada um com seis elementos. Foi designado de grupo experimento G1 (G1A a G1F) e grupo controle G2 (G2A a G2F), totalizando seis animais em cada grupo.

No primeiro dia do experimento (D1)Realizada injeção de 0.3 ml de líquido ascítico de carcinoma de Ehrlich transplantado em dois grupos de 6 camundongos: G1- tratado e G2- controle.A partir do D1 realizada avaliação clínica , constando de medida do peso, avaliação da mobilidade e piloereção.Também feitas medições abdominais

diariamente. A partir do D3 foi feita injeção ip de EAPa na dose de 200 mg/kg no G1 e solução fisiológica 0.9 % 0.5 ml ip no G2.

No nono dia do experimento (D9) os animais foram eutanasiados. Avaliados volume da ascite e presença de implantes na parede abdominal. Realizada análise citométrica, com contagem de leucócitos totais e células do Carcinoma de Ehrlich e citologia, utilizando a técnica de Papanicolau modificada, comparando os dois grupos.

O experimento obedeceu aos princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e do Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Ministério da Saúde. O estudo foi registrado no Comitê de Experimentação Animal da UFPE sob o número 23076.043890/2011-27 .

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos grupos com relação as variáveis qualitativas foi aplicado o teste Exato de Fisher, devido ao número pequeno de observações. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação dos grupos em relação as variáveis quantitativas. Para verificar se houve alteração do peso dentro de cada grupo foi feito teste de Wilcoxon. Optou-se por utilizar apenas metodologias não paramétricas devido ao número pequeno da amostra.

O nível de significância assumido foi de 5%. Os cálculos estatísticos foram realizados no software SPSS for Windows versão 18.0 - Statistical Package for the Social Science.

4 RESULTADOS

Em relação ao peso dos animais observou-se que ao longo dos 9 dias houve uma estabilidade do peso dos animais no G1 e um aumento do peso no G2 , o qual foi estatisticamente significativo ($p=0,027$) , o que pode indicar um maior aumento da ascite no grupo não tratado.

Em ambos os grupos não foi observada alteração importante da mobilidade e apenas no G1 foi notada piloereção em todos os animais a partir do D4, o que pode ser interpretado como toxicidade de componentes do EAPa.

Em relação às medições abdominais notou-se um maior aumento na medição transversa no G2

os resultados da tabela 1, quando comparamos os grupos com relação ao volume da ascite existe diferença estatisticamente significativa, sendo a média do grupo tratado-G1 de 2,58 ml e a do grupo controle – G2 12,97 ml ($p=0,002$)

Tabela 1 : Estatísticas descritivas do Volume da Ascite (ml) segundo os grupos

Grupo	Volume Ascite				
	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Tratado(G1)	2,58	0,35	2,45	2,30	3,20
Controle(G2)	12,97	5,28	11,65	7,70	20,20
Total	7,77	6,49	5,45	2,30	20,20

$p=0,002$

Em relação aos implantes na parede abdominal observou-se que 66,7 % dos animais no G 2 apresentaram essa ocorrência, e nenhum no G 1, o que caracteriza tendência a influência do EAPa nesse evento.

Tabela 2- Incidência de implantes na parede abdominal

			Grupo		
			Controle	Tratado	Total
Implante tumoral na parede abdominal	Ausente	N	2	6	8
		%	33,3%	100,0%	66,7%
	Presente	N	4	0	4
		%	66,7%	,0%	33,3%
Total	N	6	6	12	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

$p=0,051$ (teste Exato de Fisher)

Em referência ao número de células do carcinoma de Ehrlich contadas em ambos os grupos notou-se uma diferença estatisticamente significativa, para menos, no grupo tratado (G1) o que indica um aspecto objetivo de resposta tumoral ao EAPa ($p=0,004$).

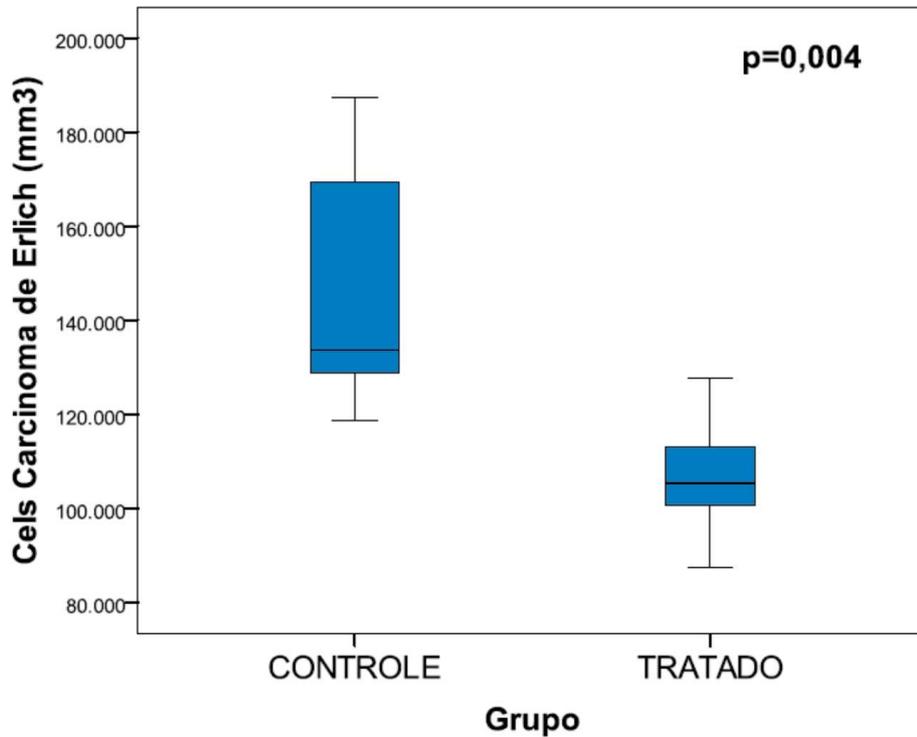


Gráfico 1: Box-Plot comparativo contagem das Células de Carcinoma entre os grupos

No que se refere aos aspectos citomorfológicos, que compreenderam: Aumento do volume nuclear, hipercromasia, alteração da relação núcleo-citoplasma, irregularidade do contorno nuclear, cromatina com distribuição irregular, nucléolo anormal ou múltiplo e mitoses atípicas não foram identificadas diferenças entre os grupos.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo projetou um experimento para utilização de um derivado da planta *Plectranthus amboinicus*, por via intraperitoneal, para tratamento da carcinomatose peritoneal causada pelo carcinoma de Ehrlich ascítico, a partir de estudos prévios com tratamento da forma sólida dessa neoplasia (Gurgel 2007; Gurgel *et al*, 2009).

No que se refere à dose de EAPa utilizada (200 mg/kg) observe-se que essa dose foi aproximada entre as maiores respostas observadas em estudo prévio com a forma sólida do carcinoma de Ehrlich, que consistiram em uso de um derivado hidroalcoólico do Pa, utilizado por via ip na dose de 100 e 150 mg/kg, com redução do volume tumoral, respectivamente, de 74% e 61 % e que não houve ganho de resposta com dose acima de 200 mg/ kg (Gurgel, 2007).

No presente estudo a contagem total de células do carcinoma de Ehrlich nas amostras de líquido ascítico demonstrou média de 106.668,83 cel/mm³ no grupo tratado-G1 versus 145.318,33 cel/mm³ no grupo controle-G2 (p=0,004). Dessa maneira, obteve-se um resultado objetivo de resposta ao EAPa .

No que se refere aos aspectos citológicos, dos sete itens morfológicos analisados de forma padronizada por citologista de larga experiência, que não tinha informação prévia sobre o grupo das lâminas analisadas não foi observada qualquer diferença entre o grupo tratado-G1 e o controle -G2.

A interpretação desse achado é paradoxal, principalmente quando cotejada com evidências objetivas de resposta no grupo tratado com o EAPa, como o menor medição abdominal transversa, menor volume de ascite e percentual de implantes na parede, e, principalmente, a contagem das células do carcinoma de Ehrlich.

Pode-se supor que o efeito citomorfológico do EAPa só se fez em prazos maiores ao do presente estudo, e também que métodos mais finos de análise, como a Imunocitoquímica , além da coloração pela prata , para avaliação das regiões

organizadoras de nucléolos(AgNORs) , podem aprimorar os resultados. Esse último método permite calcular a porcentagem e relação de células escuras e claras , inferindo o potencial proliferativo das mesmas , podendo contribuir para estudos posteriores.

Por outro lado esse estudo corrobora o efeito antineoplásico do Pa e aponta para análises futuras com o fracionamento de componentes dessa planta que tenham destacado efeito antitumoral.

REFERÊNCIAS

Vieira , J R C , Souza I A , Nascimento S C and Leite S P . *Indigofera suffruticosa*: An alternative anticancer therapy. *Cam advance Access* Published 2006 ; December 12

Pagno T, Blind LZ, Biavatti MW, Kreuger MR. *Braz J Med Biol Res*. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. *Braz J Med Biol Res* 2006 ; Nov;39(11):1483- 91.

Hamilton CA, Maxwell GL, Chernofsky MR, Bernstein SA, Farley JH, Rose GS. Intraperitoneal bevacizumab for the palliation of malignant ascites in refractory ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;111:530-2.

Elias D, Lefevre JH, Chevalier J, Brouquet A, Marchal F, Classe JM et al .Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *J Clin Oncol*. 2009;27:681-5.

ACosta, L.M.R. , Fuebtes, V.; Rodriguez, C. Instructivo técnico del *Plectranthus amboinicus*(Lour.) Spreng.*Rev. Plantas Medicinales*.3:51-53.(1998).

Salman, J.G.D. ; Jimenez , T.E.G. ; Castilho , R . M . ; Efecto antioxidante dde los extractos fluidos e dos flavonóides Del *Plectranthus amboinicus*(Lour.)Spreng . *Oregano Francês*)*Revista Cubana de Plantas Mediciniais* 1996.2:27-30

Hirose, M. et al. Effects of ellagic acid ,vanilin and quercitin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model .*Cancer Letters* , 1995 .94:113-121).

Carrazoni EP. Plantas medicinais de uso popular. Recife: Fasa; 2000.

Gurgel, A P A D . A importância do *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng como alternativa terapêutica- métodos experimentais. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas .UFPE .2007.

Gurgel, APAD. et al .In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (Lamiaceae). Journal of Ethnopharmacology 2009 . 125 : 361-363.



ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rua Prof. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária
50.670-420 Recife – PE
Telefone: (081) 2126 8351
Fax: (081) 21268350



PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

1. Projeto Definitivo (x) Piloto ()

Título _____ Estudo experimental do efeito antineoplásico do extrato aquoso do
Plectranthus amboinicus na forma ascítica do carcinoma de Ehrlich

1.1 Período previsto para utilização dos animais:

Início 01____/____11____/____2011__ Término __01____/____03____/____2012__

2. Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa

3. Responsável:

Nome: _____ Profa. Ivone Antonia de

Souza _____

Email: _____IdeSouza5@gmail.com_____(Co-orientadora)

Eduardo Miranda Brandão . Doutorando dp Programa de Pós –Graduação em Cirurgia da
UFPE _____emiranda.onco@gmail.com_____

Departamento: _____Antibióticos_____ Ramal: _____
8347 _____

4. Colaboradores

5. Qualificação da Equipe: (Especificar a experiência prévia e o treinamento dos
membros da equipe com os animais)

_____Experiência com experimentos no biotério do Departamento de Antibióticos
da UFPE

5.1. Existe acompanhamento de técnico especializado? () SIM (x) NÃO

Nome _____

Qualificação _____

6. Informações sobre a origem do animal: Biotério (x)

Especificar

Animal silvestre* (x) Exótico ()

Anexar solicitação de autorização ao IBAMA. Outros.

Especificar

7. Descrição dos animais:

(x) Camundongo () Rato () Cobaia () Hamster () Coelho () Cão () Gato

() Gerbil () Primata não humano . **Se for trabalhar com mais de um tipo de animal colocar em anexo o que se refere à idade e sexo.**

Outro(especificar): _____

Linhagem: _____

Se houver mais de um tipo de animal descrever em anexo.

Sexo: () M (x) F

Idade: _____ 6

semanas _____ Peso _____ 30g _____

Padrão sanitário (especificar os controles sanitários de manutenção dos animais no biotério) _____ Troca de maravalha de pinus a cada 3 dias e padrão sanitário do biotério do Departamento de Antibióticos da

UFPE _____

7.1.2. Climatização, fotoperíodo, exaustão de ar, posição da gaiola na estante.

_____ As gaiolas foram mantidas em ambiente refrigerado com temperatura média de 22 +/- 2 oC e umidade ambiente. Utilizado regime de luminosidade de 12 h claro e 12 h escuro _____

7.1.3. Tipo de alimentação: (x) ração industrial () suplementação () dieta específica

Especificar: _____ Labina ®

7.1.4. Qualidade da água: () filtrada () autoclavada () clorada (x) Compesa

() Mineral () Poço

7.1.5. Tipo da cama: () esterilizada () não esterilizada papel (x) maravalha () outros ()

Especificar: _____

8. Existe planejamento estatístico para a definição do número de animais? (x) SIM

() NÃO

Nº de grupo experimental _____ 2 _____ Nº de animais por grupo experimental _____ 6 _____ Nº de animais previsto no projeto _____ 12 _____

Nº de animais por gaiola _____ 6 _____ tipo e tamanho de gaiola _____ gaiolas tipo caixa plástica com grades de tamanho 20 cm (largura) por 30 cm (comprimento) por 12 cm (altura)

9. Informações sobre os procedimentos experimentais do projeto de pesquisa ou da aula:

9.1. Será usado algum tipo de contenção no animal. () SIM (x) NÃO

Qual ? Justifique.

9.2. Usará drogas analgésicas e/ou anestésicas? () SIM (x) NÃO

9.2. Usará drogas analgésicas e/ou anestésicas? () SIM (x) NÃO

9.2.1. Droga(s) _____

9.2.2. Dosagem _____

9.2.3. Via de

administração_____

9.2.4 Volume_____

9.3. Envolverá dor nos animais? (x) SIM () NÃO

Em qualquer condição, justifique a resposta, e faça uma breve descrição de como será avaliada a presença de dor durante o período de experimentação.

9.4. Os experimentos propostos são específicos para:

Dor () SIM (x) NÃO

Estresse () SIM (x) NÃO

Anorexia () SIM (x) NÃO

Outros

Especifica_____avaliação de resposta antitumoral de injeção intraperitoneal de Extrato aquoso de Plectranthus

amboinicus_____

O procedimento levará a alguma restrição hídrica ou alimentar? () SIM (x) NÃO

Se sim,

justifique:_____

9.6. Realizará cirurgia? () Sim (x) Não () Única () Múltiplas

Está previsto algum tipo de suporte (analgésicos, antiinflamatórios etc.) durante a recuperação._____

9.7. Haverá exposição/inoculação/administração de algum agente químico ou biológico?

(x) SIM () NÃO. Se for sim especificar. Extrato aquoso de Plectranthus amboinicus

Dosagem:_____200 mg /kg_____Via de

administração:_____intraperitoneal_____

Freqüência_____diária durante sete dias

9.8. Haverá extração de fluidos? () SIM (x) NÃO

Se sim,
especificar _____

Quantidade da
amostra _____ Freqüência: _____

Método de
coleta: _____

9.9 Haverá reposição de fluidos? () SIM (x) NÃO

Se sim,
especificar _____

Via de
administração _____ Volume _____

9.10. EUTANÁSIA: (x) Deslocamento cervical () Decapitação () CO2

() Perfusão sob anestesia. () Dose excessiva de anestésico.

() Dessangramento com anestesia.

Outro: _____

9.10. Como será realizado o descarte dos animais? __serão encaminhados à prefeitura da UFPE para descarte _____

9.11. Os animais poderão ser usados para outro experimento de pesquisa ou ensino?

() SIM (x) NÃO

9.12. Os animais serão usados para retirada de órgãos?

() SIM (x) NÃO

Resumo do procedimento experimental

O experimento compreenderá um grupo tratado de 6 animais (G1) e outro controle (G2) de igual número num período de 9 dias . No dia 1 (D1) será feita a injeção ip, em G1 e G2, de 0,3 ml de líquido ascítico com CEA. A partir desta data será feita avaliação de parâmetros clínicos nos animais, como peso , piloereção , mobilidade e medições abdominais longitudinal e transversa. De D3 até D9 se fará injeção diária ip de 200 mg de Extrato Aquoso de Pa (EAPa) no G1 . Em G2 será realizada, no mesmo período, injeção ip de 0,5 ml de solução fisiológica a 0.9 %. No D9 os animais serão sacrificados e analisados: volume da ascite, presença de implante tumoral na parede abdominal, aspecto da ascite. Serão encaminhadas amostras, de G1 e G2, para estudo citométrico e citomorfológico. Serão avaliados na citometria o número de leucócitos totais, mononucleares e polimorfonucleares, além da contagem das células de CEA. Na citologia serão avaliados: aumento do volume nuclear, hipercromasia, alterações da relação núcleo-citoplasma, irregularidades do contorno nuclear, cromatina com distribuição irregular, nucléolos anormais ou múltiplos e mitoses atípicas.

1311. LEIA ANTES DE ASSINAR

Termo de Responsabilidade

Eu certifico que:

Li os princípios éticos da Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e concordo plenamente com suas exigências durante a duração deste experimento/aula.

Esse estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e não pode ser realizado por metodologias alternativas.

A equipe que participa do projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos nesse protocolo.

Me comprometo a solicitar nova aprovação deste protocolo sempre que ocorra alteração significativa dos experimentos aqui descritos.

Tudo o que foi declarado neste protocolo é absoluta expressão da verdade. Estou ciente que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de minha total responsabilidade (pesquisador principal) e que estarei sujeito às condições previstas na lei em vigor.

Lei de Crimes Ambientais No. 9605 – de 12/02/1998 – Art. 32 Praticar ato de abuso, maus tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos;

Pena – detenção de três meses a um ano e multa. Incorre nas mesmas penas quem realiza experiência dolosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos. A pena é aumentada de um sexto a um terço se ocorre morte do animal.

Regulamentação da lei de Crimes Ambientais – Decreto 3.179 de 21/09/1999 – Art. 17 Praticar ato de abuso, maus tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos; Multa de R\$ 500,00 a R\$ 2.000,00, com acréscimo por exemplar excedente;

I - R\$ 200,00 por unidade; II - R\$ 10.000,00 por unidade de espécie constante na Lista Oficial de Fauna Brasileira ameaçada de extinção e do Anexo I da CITES; e III - R\$ 5.000,00 por unidade de espécie constante na Lista Oficial de Fauna Brasileira ameaçada de extinção e do Anexo II da CITES. (Convention on International Trade in Endangered Species)

NOME: Eduardo Miranda Brandão

DATA 13 / 10 / 2011

ASSINATURA: _____

VISTO DO CHEFE DO DEPARTAMENTO