



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA

LUANA CRISTINA DA SILVA

**ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO EM INTESTINO DELGADO DE
CAMUNDONGOS SADIOS E PORTADORES DO SARCOMA-180 TRATADOS
COM ÁCIDO SALAZÍNICO**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA

NÚCLEO DE ENFERMAGEM

CURSO DE ENFERMAGEM

LUANA CRISTINA DA SILVA

**ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO EM INTESTINO DELGADO DE
CAMUNDONGOS SADIOS E PORTADORES DO SARCOMA-180 TRATADOS
COM ÁCIDO SALAZÍNICO**

TCC apresentado ao Curso de Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico da Vitória, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Enfermagem.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida da Conceição de Lira.

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2021

Catálogo na Fonte
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecário Jaciane Freire Santana, CRB-4/2018

S586e Silva, Luana Cristina da.

Estudo histomorfológico em intestino delgado de camundongos sadios e portadores do sarcoma-180 tratados com ácido salazínico /Luana Cristina da Silva. - Vitória de Santo Antão, 2021.

49 f.; il.: color.

Orientador: Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior.

Coorientadora: Maria Aparecida da Conceição de Lira.

TCC (Bacharelado em Enfermagem) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Bacharelado em Enfermagem, 2021.

Inclui referências e anexo.

1. Neoplasias. 2. Lliquens. 3. Histologia. I. Aguiar Júnior, Francisco Carlos Amanajás de (Orientador). II. Lira, Maria Aparecida da Conceição de (Coorientadora). III. Título.

616.9906 CDD (23. ed.)

BIBCAV/UFPE - 200/2021

LUANA CRISTINA DA SILVA

**ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO EM INTESTINO DELGADO DE
CAMUNDONGOS SADIOS E PORTADORES DO SARCOMA-180 TRATADOS
COM ÁCIDO SALAZÍNICO**

TCC apresentado ao Curso de Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico da Vitória, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Enfermagem.

Aprovado em: 07/12/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria da Conceição Cavalcanti de Lira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Me. Marton Kaique de Andrade Cavalcante
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Marllyn Marques da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais atinge a população mundial, sendo considerado um problema de saúde pública. Existe a necessidade de alternativas de tratamento que sejam eficazes no combate as células tumorais e que possuam o mínimo de efeitos colaterais. As fontes naturais são opções bastante promissoras no combate as neoplasias malignas, e entre elas estão os líquens, organismos naturais que possuem uma vasta gama de metabólitos secundários em suas estruturas químicas, com diversas atividades biológicas já descritas na literatura. Este estudo teve como objetivo analisar os possíveis danos celulares ao intestino delgado de camundongos com tumor Sarcoma-180, assim como a eficácia do ácido salazínico na redução desses danos. Trata-se de um estudo experimental. Foram utilizados 35 camundongos albinos swiss (*Mus musculus*), machos, com idade de 60 dias. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais com 7 animais cada, sendo formados grupos de animais sadios e os que receberam células neoplásicas, destes foram subdivididos os grupos que receberam o controle negativo (solução salina + tween 80 a 5%), controle positivo (5-Fluorouracil), e os que foram tratados com o ácido salazínico (doses de 25 e 50 mg/kg). Células do Sarcoma-180 foram inoculadas via subcutânea na região axilar direita do camundongo, desenvolvendo-se o tumor sólido. O tratamento teve início 24h após inoculação e foi realizado durante 7 dias consecutivos. Um dia após o término do tratamento, os animais passaram por eutanásia para a retirada do intestino delgado. Em seguida os fragmentos foram fixados e passaram por processamento histológico, sendo submetidos a análises histomorfométricas. Os animais expostos às células neoplásicas apresentaram índice de ganho de peso corporal maior em comparação aos animais que não receberam células do tumor. Já o peso relativo das porções intestinais foi menor no grupo controle negativo, também comparado ao grupo sadio. Quanto à área das vilosidades intestinais do duodeno, os grupos controle negativo e controle positivo apresentaram uma diminuição significativa da área, apresentando como resultado os valores $27620,4 \pm 1938,0$; $29630,0 \pm 1372,0 \mu\text{m}^2$ respectivamente, em comparação ao grupo de animais sadios, que teve como resultado o valor $40340,1 \pm 1874,0 \mu\text{m}^2$. Em relação ao jejuno, não houve diferença significativa dos grupos que receberam ou não tratamento, em comparação com os animais do grupo sadio. Conclui-se que o ácido salazínico apresentou uma provável proteção ao duodeno dos animais experimentais expostos ao tumor Sarcoma-180.

Palavras-chave: histopatologia; líquens; neoplasias.

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases that most affects the world population, being considered a public health problem. There is a need for treatment alternatives that are effective in fighting tumor cells and that have minimal side effects. Natural sources are very promising options in combating malignant neoplasms, and among them are lichens, natural organisms that have a wide range of secondary metabolites in their chemical structures, with several biological activities already described in the literature. This study aimed to analyze the possible cellular damage to the small intestine of mice with a Sarcoma-180 tumor, as well as the effectiveness of salazinic acid in reducing this damage. This is an experimental study. Thirty-five male albino swiss (*Mus musculus*) mice aged 60 days were used. The animals were divided into five experimental groups with 7 animals each, being formed groups of healthy animals and those that received neoplastic cells, from these, the groups that received the negative control (saline solution + 80 to 5% tween), positive control were subdivided (5-Fluorouracil), and those treated with salazinic acid (doses of 25 and 50 mg/kg). Sarcoma-180 cells were inoculated subcutaneously in the right axillary region of the mouse, developing a solid tumor. Treatment started 24h after inoculation and was carried out for 7 consecutive days. One day after the end of treatment, the animals were euthanized to remove the small intestine. Then, the fragments were fixed and underwent histological processing, being submitted to histomorphometric analysis. Animals exposed to neoplastic cells had a higher body weight gain index compared to animals that did not receive tumor cells. The relative weight of the intestinal portions was smaller in the negative control group, also compared to the healthy group. As for the area of the intestinal villi of the duodenum, the negative control and positive control groups showed a significant decrease in area, with the result being $27620,4 \pm 1938,0$; $29630,0 \pm 1372,0 \mu\text{m}^2$ respectively, compared to the group of healthy animals, which resulted in the value $40340,1 \pm 1874,0 \mu\text{m}^2$. In relation to the jejunum, there was no significant difference between the groups that received or not the treatment, compared to the animals in the healthy group. It is concluded that salazinic acid presented a probable protection to the duodenum of experimental animals exposed to the Sarcoma-180 tumor.

Keywords: histopathology; lichens; neoplasms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Câncer.....	9
2.1.1 <i>Sarcoma-180</i>	<i>11</i>
2.1.2 <i>Problemas sistêmicos ocasionados pelo câncer</i>	<i>11</i>
2.1.3 <i>Terapias no combate ao câncer</i>	<i>13</i>
2.1.4 <i>Efeitos colaterais de algumas terapias de combate ao câncer</i>	<i>15</i>
2.2 Produtos naturais	17
2.3 Líquens	19
2.3.1 <i>Ácido Salazínico</i>	<i>20</i>
2.3.2 <i>Potencial biológico dos líquens.....</i>	<i>20</i>
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4 ARTIGO	23
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO A – NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS	42

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias, tumores malignos ou câncer são as denominações adotadas para descrever um conjunto de doenças malignas que apresentam como característica comum o crescimento celular desordenado, podendo invadir tecidos e órgãos (OMS, 2021). O câncer corresponde a um considerável problema de saúde pública no mundo, com um crescimento significativo no número de casos nos últimos anos, estando entre as principais causas de óbitos da população mundial (SILVA; NASCIMENTO; PORTO, 2019; TORRE *et al.*, 2016).

As células cancerígenas possuem uma rápida divisão celular, são incontroláveis e agressivas, acarretando na formação de tumores que podem propagar-se para diferentes locais do corpo. Existem inúmeros tipos de câncer, que correspondem aos variados tipos celulares, sendo os carcinomas originados em tecidos epiteliais e os sarcomas em tecidos conjuntivos (INCA, 2020).

Os tratamentos disponibilizados atualmente para o câncer são variados, onde a escolha vai depender do estágio e tipo de câncer diagnosticado. A quimioterapia, radioterapia, remoção cirúrgica do tumor, imunoterapia e terapia hormonal são as principais opções de tratamento existentes, podendo ser utilizadas com finalidade curativa ou paliativa (WANG; LEI; HAN, 2018).

Tais modalidades de tratamento são bastante utilizadas e promovem resultados satisfatórios no combate à patologia, no entanto trazem consigo alguns problemas, como efeitos colaterais tóxicos, tolerância aos fármacos quimioterápicos, dano radioativo induzido pela radioterapia e baixa eficácia da imunoterapia (ZHANG; LI, 2018). Esses problemas comprometem ainda mais a qualidade de vida do paciente oncológico (NICOLUSSI *et al.*, 2014).

Segundo Viana *et al.* (2017), existe a necessidade de se buscar terapias alternativas para o combate do câncer, sendo os produtos naturais uma dessas opções, com relevante potencial terapêutico, em especial no Brasil, devido à imensa variedade de sua flora que ainda não é muito explorada. Como exemplo de importantes produtos naturais, temos os líquens.

Os líquens são definidos como organismos compostos que consistem em uma associação simbiótica entre um parceiro fúngico (micobionte) e um ou mais parceiros fotossintéticos (fotobionte), comumente algas verdes, cianobactérias ou ambas

(CALCOTT *et al.*, 2018; HONDA; VILEGAS, 1998; MOLNÁR e FARKAS, 2010; RANKOVIĆ; KOSANIĆ, 2015).

Há décadas espécies liquênicas vêm sendo estudadas quanto ao seu potencial biológico, sendo importantes fontes de agentes químicos únicos para serem utilizados em diversas finalidades farmacêuticas (MARTINS *et al.*, 2016; PALUSZCZAK *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2015). Várias pesquisas relatam o relevante papel de suas moléculas bioativas em várias atividades biológicas, como, antimicrobiana, antioxidante, antiviral, antineoplásica, antigenotóxica, antiinflamatória, analgésica e antitérmica (RANKOVIĆ; KOSANIĆ, 2015). Seus metabólitos secundários vêm proporcionando novas alternativas na busca de novos fármacos eficazes e seguros (SPIELMANN, 2005).

Neste contexto, sabe-se que substâncias liquênicas apresentam grandes chances de combate as células neoplásicas, visto que, possuem em sua estrutura química biomoléculas ativas capazes de destruir tais células atípicas. Portanto, é imprescindível ressaltar a importância de novas descobertas de compostos de origem natural para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento do câncer e de suas consequências.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O termo genérico câncer é utilizado para um vasto grupo de patologias que afetam qualquer porção do corpo, sendo utilizados também os termos tumores malignos e neoplasias (OMS, 2021). Esta doença vem causando temor na população há séculos, existindo evidências da doença em ancestrais humanos, que datam a mais de um milhão de anos. Sua causa não advém da presença de uma entidade estranha presente no corpo, assim como acontece nas doenças infecciosas e parasitárias, mas sim por mutações genéticas em células do corpo humano (HAUSMAN, 2019).

Essas mutações genéticas proporcionam algumas características especiais às células, tais como capacidade de proliferação ilimitada, ausência de fatores supressores do crescimento, morte celular programada (apoptose), capacidade de invasão de outros tecidos (metástase) e criação de vasos sanguíneos novos (angiogênese) (MARTINEZ *et al.*, 2006).

As neoplasias malignas estão entre as principais causas de morte em países do mundo todo, além disso, é esperado que o número de novos casos e a mortalidade aumente rapidamente com o crescimento e envelhecimento da população, aliado a adoção de estilos de vida que propiciem maiores chances de desenvolvimento da doença (TORRE *et al.*, 2016).

Seu surgimento se dá quando células normais se transformam em células tumorais em um processo composto por diversos estágios, denominado de carcinogênese ou oncogênese, progredindo frequentemente de uma lesão pré-cancerosa para um tumor maligno. Tais alterações resultam da relação entre fatores genéticos e agentes externos, que compreendem os agentes carcinógenos físicos (radiação ultravioleta e ionizante), agentes cancerígenos químicos (amianto, constituintes da fumaça do tabaco, aflatoxina e arsênico) e agentes carcinógenos biológicos (algumas infecções virais, bacterianas ou parasitárias) (OMS, 2021).

Além destes fatores citados anteriormente, o envelhecimento também influencia o desenvolvimento das neoplasias, visto que o mesmo leva a modificações celulares que elevam as possibilidades de se desenvolver um câncer

(BRASIL, 2020). De maneira geral, as células que estão envolvidas no desenvolvimento das neoplasias malignas sofrem modificações, segregando seu DNA, escapando dos mecanismos supressores da proliferação, crescendo e resistindo em diversos ambientes (VIANA *et al.*, 2017).

No cenário brasileiro, o estudo de Panis *et al.* (2018) traz que a incidência e a mortalidade resultantes de alguns tipos de neoplasias malignas estudadas (próstata, mama feminina, brônquios e pulmões, colo de útero e ovário) são mais altas no Brasil, com consideráveis números de registros de casos da patologia e de mortes ocasionadas pela mesma, em comparação às taxas globais.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), os tipos mais incidentes de câncer variam conforme as Regiões brasileiras. Nas Regiões Sul e Sudeste, os tipos de maior prevalência são o de mama feminina, próstata, intestino e pulmão; A incidência na Região Centro-Oeste é semelhante à Região Sul e Sudeste, acrescentando-se as neoplasias de estômago e colo do útero; As Regiões Norte e Nordeste possuem maior incidência de neoplasias de próstata, mama feminina, estômago e colo do útero; Já na Região Norte, as taxas de câncer de mama e colo do útero são equivalentes, característica exclusiva dessa Região (INCA, 2019).

O câncer pode acometer qualquer região do corpo. Porém, existe órgãos que são mais afetados, podendo cada órgão ser acometido por diferentes tipos de tumor, com agressividade variável (INCA, 2021). A sintomatologia causada pelas neoplasias malignas pode ser diferenciada, com sintomas leves ou não, alguns ocorrendo em conformidade com o tipo e o estágio em que se encontra a patologia. Alguns tipos de câncer só apresentam sintomatologia quando estão em um estágio de desenvolvimento mais avançado (HEYDARNEJAD; HASSANPOUR; SOLATI, 2011).

O diagnóstico desta patologia se fundamenta em diversos critérios, possuindo sua confirmação diagnóstica através de exames de citologia, histologia e de marcadores tumorais (SILVA, M., 2006). O tratamento oncológico possui como objetivo a cura, e quando esta não é possível, visa aumentar o tempo de vida do paciente, oferecendo-lhe cuidados paliativos que proporcionem uma melhoria no seu bem-estar e na sua qualidade de vida (SAEVARSDOTTIR; FRIDRIKSDOTTIR; GUNNARSDOTTI, 2010).

2.1.1 *Sarcoma-180*

O tumor Sarcoma-180 (S-180) é um modelo animal experimental amplamente empregado na determinação do potencial tóxico e antitumoral de diversas moléculas e extratos, sendo de grande relevância para a fase pré-clínica e validação desses estudos (SILVA; NASCIMENTO; PORTO, 2019).

O Sarcoma-180 é um tumor de natureza sólida, também denominado de tumor de Crocker. De início foi classificado como carcinoma mamário, devido ao fato de ter surgido de forma espontânea em região axilar de camundongos. A forma sarcomatosa do Sarcoma-180 só foi obtida anos depois, após vários transplantes subcutâneos, permanecendo sem alterações até hoje (CIOLI; SILVESTRI, 1971).

Posteriormente a inoculação intraperitoneal do fluido leitoso do Sarcoma-180, em sua forma sólida, em camundongos swiss, a forma ascítica do Sarcoma-180 foi desenvolvida por Charlotte Friend em 1951, onde se observou que vários tumores a partir da terceira semana de implante promovem necrose, com os animais morrendo por toxemia, septicemia e desnutrição (SILVA, T., 2014).

O S-180 é na atualidade o tumor experimental mais empregado em estudos que visam identificar a atividade antitumoral de moléculas e extratos, visto que pode ser utilizado tanto na forma ascítica quanto na sólida, pode ser aplicado em diversos locais, possuindo rápida proliferação e alto grau de metástase (SILVA; NASCIMENTO; PORTO, 2019).

2.1.2 *Problemas sistêmicos ocasionados pelo câncer*

Considera-se o câncer como sendo uma patologia sistêmica, visto que há uma complexa interação entre as células cancerosas e as células próximas ao ambiente tumoral, o que propicia o desenvolvimento de metástases, afetando assim demais sistemas corporais (KIM *et al.*, 2017).

O câncer ocasiona implicações em locais remotos tanto do tumor primário quanto de suas metástases, problema denominado de síndrome paraneoplásica, apresentando várias manifestações e não estando associadas à invasão ou compressão tumoral direta, sendo secundárias à secreção tumoral de peptídeos/hormônios funcionais ou correlacionadas à reatividade imunológica

cruzada com o organismo normal do hospedeiro (AGARWALA, 1996; BERGMAN, 2012; MA; CHOW; TAYLOR, 2019).

Frequentemente pacientes diagnosticados com câncer em estágio avançado são acometidos por desnutrição e caquexia, condições essas que se desenvolvem principalmente diante de alguns fatores presentes no curso da doença, como ingestão alimentar inadequada, redução da prática de atividade física, e distúrbios do metabolismo, acompanhados de inflamação sistêmica e intenso catabolismo (ARENDS, 2018).

A elevada prevalência da desnutrição nos pacientes com câncer apresenta relação com a menor ingesta de alimentos e alterações no metabolismo provocado pelo tumor, demonstrando a negativa influência do câncer no estado nutricional (STEEMBURGO *et al.*, 2018). Além de que, essa desnutrição também é um importante fator de risco para a redução da imunidade, complicações pós-operatórias infecciosas, menor tolerabilidade as intervenções terapêuticas como quimioterapia, radioterapia, cirurgia e aumento da mortalidade (BARBOSA; LACERDA-FILHO; BARBOSA, 2014; TOSCANO *et al.*, 2008).

Aliada a desnutrição, a perda de peso também é um problema constante em pacientes portadores de neoplasias malignas. Tais condições acabam influenciando o prognóstico, estendendo o tempo de hospitalizações, implicando em mais custos financeiros e trazendo prejuízos à qualidade de vida e a sobrevida desses pacientes (PAÑELLA *et al.*, 2014).

Os tumores malignos, principalmente aqueles que apresentam crescimento lento, são diagnosticados mais tardiamente, propiciando intensas alterações catabólicas no hospedeiro, podendo resultar na caquexia (FORTES; NOVAES, 2006). A caquexia em pacientes com câncer é uma complexa síndrome multifatorial, determinada pela redução de tecido muscular esquelético, e até mesmo tecido adiposo. Tal condição está relacionada a prejuízos na função física do paciente, diminuição da resposta ao tratamento proposto para o câncer diagnosticado, como também a maiores taxas de mortalidade (FONSECA *et al.*, 2020).

Além dos problemas nutricionais citados, o câncer afeta diretamente órgãos vitais, como o coração. As células cancerígenas liberam fatores pró-caquéticos no sangue, visando atingirem órgãos distantes, como o coração. Estes mediadores inflamatórios liberados pelo tumor acabam culminando em prejuízos ao músculo cardíaco, resultando em doença cardíaca, com atrofia das células cardíacas, fibrose

tecidual, aliado ao comprometimento funcional do órgão que pode resultar em insuficiência cardíaca (AUSONI *et al.*, 2020).

2.1.3 Terapias no combate ao câncer

O tratamento para o câncer possui como finalidade a erradicação por completo dos tecidos cancerígenos, sem danificar os tecidos corporais próximos, no entanto, esse objetivo é dificultado pelas propriedades das células cancerígenas de se propagar para outros tecidos, sejam eles próximos ou distantes, provocando as metástases. Quando a cura não é possível, o tratamento deve possibilitar a manutenção da qualidade de vida do paciente, mantendo a doença em um estado subclínico (WANG; LEI; HAN, 2018).

Nos casos em que o câncer está na fase pré-metastática em estágio inicial, sendo diagnosticado precocemente, com a adoção de protocolos cirúrgicos bem sucedidos, sua erradicação total é possível. Infelizmente, não se tem o mesmo desfecho nos casos de doença metastática avançada, visto que as células cancerígenas desenvolvem resistência ao tratamento proposto (WHELAN; CUNNINGHAM, 2020).

Os métodos de tratamento disponíveis atualmente para o tratamento do câncer são diversos, variando conforme o estágio e o tipo da neoplasia maligna diagnosticada. A quimioterapia, cirurgia, radioterapia, terapia hormonal e terapia direcionada, incluindo a imunoterapia, são as principais modalidades de tratamento, podendo ser utilizadas em combinação, conforme indicação médica, objetivando melhor eficácia do tratamento proposto (WANG; LEI; HAN, 2018).

Os diversos avanços na ciência e na tecnologia modificaram as terapias de combate ao câncer, visto que houve uma melhor compreensão dos processos biológicos subjacentes. Tal avanço é contínuo, onde cada dia mais se observa a modificação e o surgimento de novos procedimentos e planos terapêuticos, sempre com o intuito de aumentar a precisão e eficácia do tratamento, possibilitando maiores taxas de sobrevivência, além de minimizar os prejuízos à qualidade de vida do paciente (WANG; LEI; HAN, 2018).

Entre os tratamentos convencionais para o câncer, estão a quimioterapia, sendo a opção terapêutica que regularmente é adotada no tratamento de tumores

malignos, a radioterapia e a cirurgia, que são mais indicadas para o tratamento de lesões localizadas (SINGH *et al.*, 2018), além das opções empregadas na atualidade como a imunoterapia, anticorpos monoclonais, anticorpos bioespecíficos e vacinação (VIANA *et al.*, 2017).

A quimioterapia se constitui como uma das mais relevantes e promissoras opções de combate ao câncer, sendo utilizada com finalidade curativa ou paliativa. Diversos fatores devem ser analisados antes de se indicar o tratamento quimioterápico, tais como a idade do paciente, seu estado nutricional, função de órgãos com pulmão, rim e fígado, existência de infecções, tipo tumoral, metástase e condição de vida do portador da neoplasia maligna (SILVA; ALBUQUERQUE; LEITE, 2010).

Considera-se a radioterapia como sendo a principal opção de tratamento para a maioria dos pacientes diagnosticados com neoplasias malignas. Essa modalidade de tratamento possui como benefícios o controle do tumor local, sem a ocorrência de muitos efeitos colaterais sistêmicos, diferentemente do que ocorre na quimioterapia. Porém, assim como outras opções de tratamento, sua eficácia pode ser limitada, visto que o tumor pode adquirir resistência ao tratamento, que pode resultar em chances de recidiva da doença, como também no desenvolvimento de metástase (OZPISKIN; ZHANG; LI, 2019).

Atualmente, estamos progredindo constantemente no conhecimento das funcionalidades do nosso sistema imunológico e de como ele se comporta frente à presença de uma neoplasia. Tal avanço vem possibilitando o desenvolvimento de novas opções de tratamento, como terapias com inibidores de checkpoint imunológico, transferência de células adotivas, anticorpos monoclonais e vacinas preventivas (JORGE, 2019).

A imunoterapia como modalidade de tratamento para o câncer, já é uma opção de tratamento instituída no arsenal terapêutico contra esta patologia. Sua utilização no tratamento de vários tipos de tumores revela resultados satisfatórios, incluindo aqueles tumores malignos resistentes a outras modalidades de tratamento habituais. As pesquisas envolvendo a imunoterapia no tratamento do câncer continuam, com o intuito de torná-la uma opção de tratamento que possa beneficiar cada vez mais pacientes, melhorando assim as chances de cura da doença (JORGE, 2019).

As vacinas preventivas também são opções utilizadas na atualidade contra o surgimento de alguns tipos de câncer. Sua utilização visa prevenir infecções que podem resultar no desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias malignas. Como exemplo principal tem a vacina contra o HPV, que é um vírus diretamente ligado ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como o câncer de colo de útero, câncer anal, e câncer de cabeça e pescoço (JORGE, 2019).

2.1.4 Efeitos colaterais de algumas terapias de combate ao câncer

Além da doença, o tratamento prejudica os pacientes, resultando em déficits no desempenho das funções, aliado a presença de mais sintomas, o que culmina em prejuízos a qualidade de vida relacionada à saúde (NICOLUSSI *et al.*, 2014). A quimioterapia e a radioterapia, opções de tratamento convencionais bastante utilizadas no tratamento do câncer, causam danos aos tecidos e células saudáveis do organismo, o que resulta em uma série de efeitos colaterais para o paciente portador da neoplasia (WANG; LEI; HAN, 2018).

Comumente, os medicamentos utilizados no tratamento do câncer dispõem como alvo as células que crescem e se multiplicam constantemente, característica comum das células cancerígenas e de alguns tipos celulares normais, tais como células intestinais, sanguíneas, da boca e do cabelo, acarretando na geração dos efeitos colaterais (YIP *et al.*, 2016).

Logo, se o fármaco utilizado contra o câncer possuir como alvo proteínas envolvidas com a regulação de diversos tipos e tecidos celulares, as possibilidades do paciente apresentar efeitos colaterais advindos do tratamento são mais elevadas. Tal problema pode ser minimizado se a proteína alvo de tal medicamento for responsável por prejuízos à regulação fisiológica das vias que são específicas das células tumorais, evidenciando-se a necessidade de compostos que atuem apenas sobre as células cancerígenas (YIP *et al.*, 2016).

A própria natureza da quimioterapia faz com que ela seja citotóxica, pelo fato de ter sido projetada para danificar tanto células normais quanto tumorais. Os quimioterápicos atuam sobre a funcionalidade das células, atingindo inclusive a replicação celular. Tais drogas levam a lesões letais ao DNA, resultando em morte das células malignas por apoptose (SINGH *et al.*, 2018).

Devido à citotoxicidade apresentada por essas drogas empregadas na quimioterapia, vários efeitos indesejáveis acompanham o seu uso. A maioria desses efeitos colaterais debilita bastante o indivíduo, e entre os mais relatados estão depressão da medula óssea, macrocitose, náuseas, vômitos que podem culminar em desidratação, distúrbios eletrolíticos, alcalose metabólica, fraqueza, perda de peso, caquexia, comprometimento nutricional e fraturas do esôfago. Além de diarreia, constipação, mucosite, esofagite oral, danos cardíacos e hepáticos, toxicidade renal e pulmonar e problemas de fertilidade (SINGH *et al.*, 2018).

A imunoterapia é considerada como uma opção de tratamento um pouco menos ofensiva ao paciente, sendo mais específica, de acordo com o tipo de câncer diagnosticado e o perfil do paciente (SOUSA *et al.*, 2019). Contudo, assim como os demais tratamentos empregados, o paciente submetido à imunoterapia pode não responder adequadamente ao tratamento e até mesmo apresentar recaídas posteriores em seu estado de saúde (KLEINOVINK, 2016).

Alguns estudos também trazem a cardiotoxicidade como problema de algumas terapias empregadas no combate ao câncer. Tais danos cardíacos se manifestam através de uma série de sinais e sintomas, como arritmia cardíaca, hipertensão arterial sistêmica, tromboembolismo, angina do peito, infarto agudo do miocárdio e até mesmo insuficiência cardíaca (SCHLITT *et al.*, 2014).

A literatura também aponta distúrbios endócrinos tardios como consequência de alguns tratamentos para o câncer. Esses distúrbios se manifestam através de sequelas, como alterações no funcionamento da regulação hipotálamo-hipofisária, tireoide, paratireoide, adrenal e gonadal, além de problemas ósseos e metabólicos, que são fortemente influenciados por tratamentos como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Aliado a tal fato, após a radioterapia alguns órgãos pertencentes ao sistema endócrino, como a tireoide, ficam mais vulneráveis ao desenvolvimento de outras neoplasias malignas (GEBAUER *et al.*, 2019).

Problemas no desempenho sexual também são frequentemente identificados em pacientes que passaram por tratamento antineoplásico, sendo na maioria das vezes advindos de prejuízos fisiológicos ocasionados pelo tratamento empregado (SCHOVER, 2018).

Mesmo diante de tantos avanços em pesquisas científicas que envolvem o câncer e seus métodos de tratamento, os efeitos colaterais dos tratamentos utilizados ainda são bastante prejudiciais ao paciente, apresentando alto índice de

complicações (SOUSA *et al.*, 2019). Diante disso, uma das principais metas das pesquisas atualmente é o descobrimento de novas drogas antineoplásicas que sejam de simples administração e que apresentem reduzidos efeitos colaterais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

2.2 Produtos naturais

Mesmo com os grandes esforços para se combater o câncer, os resultados alcançados ainda não são satisfatórios, visto que as taxas de mortalidade de pessoas diagnosticadas com neoplasias malignas permanecem elevadas. Tratamentos convencionais, como a quimioterapia, possuem eficácia, contudo resultam em efeitos colaterais difíceis para o paciente (SHRESTHA *et al.*, 2014).

Além disso, o câncer muitas vezes pode resistir ao tratamento convencional e/ou este não ser seletivo à neoplasia, revelando a necessidade de formas de tratamento alternativas, que objetivem principalmente a eficácia terapêutica, segurança e mecanismos de ação mais específicos (VIANA *et al.*, 2017). Desde a antiguidade os seres humanos utilizam os produtos naturais com o intuito de se alcançar o alívio e a cura de suas enfermidades (LEITE; OLIVEIRA FILHO, 2014; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A ingestão de folhas e ervas possivelmente tenha sido a primeira maneira da utilização dos produtos naturais. As pessoas sempre foram encantadas pela natureza, pois além de oferecer meios para a alimentação e manutenção, também atua como principal fonte de aprendizagem e inspiração. Atributos como a complexidade, diversidade química e propriedades biológicas dos produtos naturais sempre fascinaram a todos (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os povos primitivos e os indígenas detêm de um enorme conhecimento sobre o arsenal químico que a natureza apresenta, podendo ser considerado como fator primordial na descoberta de medicamentos e substâncias tóxicas ao longo dos anos (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Ressalta-se que as plantas medicinais, além do potencial de cura, podem também apresentar alto grau de toxicidade (VIANA *et al.*, 2017).

A tradicional medicina chinesa é um dos principais exemplos da eficiência dos produtos naturais contra as doenças, evidenciando a relevância da investigação

científica sobre os produtos naturais, visando à descoberta de novos produtos químicos ativos (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Os produtos naturais estão disponíveis em abundância, permitindo possibilidades de se localizar substâncias que possuam efeito terapêutico (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

O Brasil, por possuir uma imensa diversidade existente em sua flora, atua como fonte de compostos bioativos de considerável potencial terapêutico, inclusive como terapias para o câncer (VIANA *et al.*, 2017). De acordo com Mondal *et al.* (2012), produtos naturais que são derivados de plantas, micróbios, fungos e organismos marinhos comprovaram ser promissores fontes de drogas contra o câncer.

Nos últimos tempos, os produtos naturais e seus derivados desempenham importante papel no tratamento das doenças, inclusive no tratamento das neoplasias malignas, obtendo-se resultados positivos (ORANGI *et al.*, 2016), como maior acessibilidade financeira e presença de compostos ativos citotóxicos e indutores de morte celular programada (apoptose) em diversos testes com linhagens de células tumorais (VIANA *et al.*, 2017).

Historicamente, os produtos naturais e os medicamentos utilizados no tratamento do câncer estão relacionados, visto que mais de 60% desses fármacos possui em alguma instância origem ligada a fontes naturais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Viana *et al.* (2017) em levantamento bibliográfico realizado em seu estudo, presumiu que os produtos naturais podem ser empregados como agentes terapêuticos na prevenção de algumas neoplasias malignas e como adjuvantes para o seu tratamento.

Considerando-se a grandiosa perspectiva relacionada à descoberta de produtos naturais que atuem no combate as neoplasias malignas, o conhecimento sobre tal área é de grande interesse, buscando-se a elucidação da sua terapêutica, eficiência e segurança (LEITE; OLIVEIRA FILHO, 2014). Muitas fontes naturais, como os líquens, ainda não foram estudadas com relação ao seu potencial biológico, sendo merecedoras de uma investigação mais aprofundada (SHERESTHA *et al.*, 2014).

2.3 Líquens

Os líquens, também denominados de fungos liquenizados, são definidos como organismos simbióticos, formados por uma associação entre um fungo (micobionte) e um parceiro fotossintético (fotobionte), podendo ser alga ou cianobactéria. Esses organismos produzem metabólitos secundários que são específicos e até únicos desses organismos (BRISDELLI *et al.*, 2012; HUNECK, 1999).

Estima-se que os líquens ocupam cerca de 8% da superfície terrestre da terra (ASPLUND e WARDLE, 2016). Perante as condições naturais, a maioria dos líquens tem uma vida caracterizada por rápidas alterações no conteúdo de água e uma atividade fisiológica que ligeiramente se modifica, tais como fotossíntese e respiração. Os líquens apresentam tolerância à dessecação, sendo caracterizados como extremófilos, podendo habitar locais em que plantas superiores são ausentes. Também pode ser a forma de vida dominante em ecossistemas como o ártico, desertos, regiões alpina e antártica, caracterizados por severos estresses ambientais (KRANNER *et al.*, 2008).

Os líquens estão presentes na maior parte dos ecossistemas terrestres, participando na maioria das vezes como contribuintes menores, no entanto, existem casos onde eles estão presentes em determinadas florestas, terras áridas e tundras compondo uma grande porção da biomassa da camada do solo (ASPLUND; WARDLE, 2016).

São fontes significativas de produtos naturais, onde o maior número de compostos produzidos e identificados são criados pela parte fúngica da associação simbiótica (CALCOTT *et al.*, 2018). Esses organismos simbióticos produzem diversas classes de compostos fenólicos, tais como antraquinonas, xantonas, dibenzofuranos, depsídeos e depsídonas (SOLÁROVÁ *et al.*, 2020). Além disso, também são responsáveis pela produção de produtos intracelulares comuns, como proteínas, aminoácidos, polióis, carotenóides, polissacarídeos e vitaminas (HONDA; VILEGAS, 1998).

Como mencionado anteriormente, os líquens produzem metabólitos secundários fenólicos, cujo acúmulo ocorre ou no córtex ou nas paredes celulares das hifas medulares, e são provenientes da via acetil-polimalonil (HONDA; VILEGAS, 1998).

A família Parmeliaceae representa a maior família de líquens, possuindo aproximadamente 2700 espécies que estão distribuídas em cerca de 80 gêneros. Esta família dispõe de uma enorme diversidade de metabólitos secundários, como os depsídeos, depsidonas, ácidos alifáticos, triterpenos, antraquinonas, ácidos secalônicos, derivados do ácido pulvínico e xantonas (GÓMEZ-SERRANILLOS *et al.*, 2014).

2.3.1 Ácido Salazínico

A produção do ácido salazínico ocorre na região medular líquênica (BENATTI, 2013), sendo derivado do grupo relacionado aos depsidonas. Além da ligação éster presente nos depsídeos, as depsidonas também exibem um heterociclo adicional decorrente de uma ligação éter, normalmente entre as posições 2 e 5', com exceção do ácido variolárico, que possui sua ligação éter entre as posições 2 e 3' (HONDA; VILEGAS, 1998).

O grupo das depsidonas tem seus compostos originados do β -orcinol, tendo uma estrutura mais complexa do que aqueles que são derivados do grupo orcinol, como exemplo temos o ácido salazínico, que tem seu anel heterocíclico com oxigênio entre os substituintes das posições 1' e 6', caso sejam grupamentos carboxila e aldeído respectivamente (HONDA; VILEGAS, 1998).

2.3.2 Potencial biológico dos líquens

A potencialidade biológica dos metabólitos secundários produzidos pelos líquens vem sendo estudada há tempos, atuando como uma fonte de agentes químicos únicos, possibilitando a sua utilização para finalidades farmacêuticas (MARTINS *et al.*, 2016; PALUSZCZAK *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2015).

Na atualidade, os líquens vêm sendo objetos de várias pesquisas referentes às suas aplicações farmacêuticas e fitoquímicas. Esses organismos simbióticos se destacam pela grande variedade de funcionalidades farmacêuticas desempenhadas por eles e por seus metabólitos secundários. Entre essas atividades biológicas, as principais são atividades antimicrobiana, antioxidante, antiviral, anticâncer,

antigenotóxica, antiinflamatória, analgésica e antipirética (RANKOVIĆ; KOSANIĆ, 2015).

Micheletti *et al.* (2009) promoveram modificações na estrutura do ácido salazínico, comprovando o forte potencial citotóxico do composto precursor e de seus derivados, frente as células tumorais MDA/MB-435 (mama humano), HCT-8 (cólon humano) e SF-295 (glioblastoma humano).

Brisdelli *et al.* (2012) investigaram a ação de seis metabólitos liquênicos (ácido diffractáico, ácido lobárico, ácido úsnico, vicanicina, ácido variolárico, ácido protolicesterínico) em relação a proliferação, viabilidade e espécies reativas de oxigênio (ERO) contra três linhagens celulares de câncer humano, MCF-7 (adenocarcinoma da mama), HeLa (adenocarcinoma do colo do útero) e HCT-116 (carcinoma do cólon), verificando que os metabólitos utilizados, com exceção do ácido variolárico, demonstraram atividade citotóxica conforme a concentração utilizada.

Yang *et al.* (2015) identificaram que o metabólito secundário fisciosporina, isolado da *Pseudocyphellaria coriacea*, exerce ação inibitória sobre a motilidade de células do câncer pulmonar. Martins *et al.* (2016) confirmaram que o ácido barbático e o extrato etéreo do líquen *Cladia aggregata* provocam inibição significativa em células cancerígenas e em tumores, possuindo reduzida toxicidade.

Devido ao fato dos líquens produzirem muitos compostos químicos únicos, dos quais a maioria possui atividade biológica promissora, esses compostos secundários podem ser vistos como fontes promissoras de futuros fármacos contra o câncer, porém, estudos mais detalhados tanto *in vitro* quanto *in vivo* são essenciais para se estabelecer as propriedades antitumorais dos metabólitos liquênicos (SHRESTHA *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar os possíveis danos celulares ao intestino delgado de camundongos portadores do tumor Sarcoma-180, e a eficácia do ácido salazínico, obtido do líquen *Parmotrema concurrens*, na redução desses danos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o índice de peso corporal dos animais experimentais;
- Avaliar o peso relativo das porções intestinais dos animais experimentais;
- Analisar os possíveis danos ao duodeno e jejuno de camundongos portadores do Sarcoma-180;
- Avaliar a histomorfometria do duodeno e jejuno de camundongos portadores de Sarcoma-180, sadios e tratados com ácido salazínico;
- Analisar a eficácia do ácido salazínico na redução de possíveis danos ao intestino delgado de camundongos portadores de Sarcoma-180.

4 ARTIGO

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA **REVISTA BRASILEIRA DE PESQUISA EM SAÚDE/BRAZILIAN JOURNAL OF HEALTH RESEARCH**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM EM ANEXO (ANEXO A).

Estudo histomorfológico em intestino delgado (duodeno e jejuno) de camundongos sadios e portadores do Sarcoma-180 tratados com ácido salazínico

Histomorphological study in the small intestine (duodenum and jejunum) of healthy mice and bearers of Sarcoma-180 treated with salazinic acid

RESUMO| Introdução: O câncer é uma das patologias mais incidentes na população mundial. As terapias existentes atualmente geram resultados satisfatórios, contudo existe a necessidade de alternativas de tratamento que sejam eficazes no combate as células tumorais e que possuam poucos efeitos colaterais. Os produtos naturais são importantes fontes de agentes terapêuticos, e entre eles estão os líquens, organismos com diversas atividades biológicas já descritas. **Objetivo:** Analisar os possíveis danos celulares ao intestino delgado de camundongos com tumor Sarcoma-180, e a eficácia do ácido salazínico na redução desses danos. **Métodos:** Utilizou-se 35 camundongos albinos swiss (*Mus musculus*), divididos em cinco grupos experimentais. Sendo os grupos de animais sadios, controles negativo e positivo, e dois grupos receberam o ácido salazínico nas doses de 25 e 50 mg/kg. **Resultados:** Observou-se que os animais expostos ao tumor Sarcoma-180 apresentaram índice de ganho de peso corporal maior em comparação aos animais sadios. Em contrapartida, o peso relativo das porções intestinais foi menor no grupo controle negativo, também comparado ao grupo sadio. Em relação à área das vilosidades intestinais da porção duodenal, os grupos controle negativo e positivo apresentaram uma redução significativa da área, com valores de $27620,4 \pm 1938,0$; $29630,0 \pm 1372,0 \mu\text{m}^2$, respectivamente, em comparação ao grupo sadio, cujo valor foi de $40340,1 \pm 1874,0 \mu\text{m}^2$. A morfometria da porção jejunal dos grupos que receberam ou não tratamento, não evidenciou diferença significativa em comparação com os animais sadios. **Conclusão:** O ácido salazínico reduziu os danos ocasionados pelo tumor Sarcoma-180 ao duodeno.

Palavras-chave: Histopatologia; Líquens; Neoplasias.

ABSTRACT| Introduction: Cancer is one of the most common pathologies in the world population. Existing therapies currently generate satisfactory results, however

there is a need for treatment alternatives that are effective in combating tumor cells and that have few side effects. Natural products are important sources of therapeutic agents, and among them are lichens, organisms with several biological activities already described. **Objective:** To analyze the possible cellular damage to the small intestine of mice with a Sarcoma-180 tumor, and the effectiveness of salazinic acid in reducing this damage. **Methods:** Thirty-five albino swiss mice (*Mus musculus*) were used, divided into five experimental groups. Being the groups of healthy animals, negative and positive controls, and two groups received salazinic acid at doses of 25 and 50 mg/kg. **Results:** It was observed that animals exposed to the Sarcoma-180 tumor had a higher body weight gain index compared to healthy animals. On the other hand, the relative weight of the intestinal portions was smaller in the negative control group, also compared to the healthy group. Regarding the area of the intestinal villi of the duodenal portion, the negative and positive control groups showed a significant reduction in area, with values of $27620,4 \pm 1938,0$; $29630,0 \pm 1372,0 \mu\text{m}^2$, respectively, compared to the healthy group, whose value was $40340,1 \pm 1874,0 \mu\text{m}^2$. The morphometry of the jejunal portion of the groups that received or not treatment did not show a significant difference compared to healthy animals. **Conclusion:** Salazinic acid reduced the damage caused by the Sarcoma-180 tumor to the duodenum.

Keywords: Histopathology; Lichens; Neoplasms.

INTRODUÇÃO

Câncer é o termo utilizado para numerosos tipos de doenças malignas que apresentam crescimento celular desordenado, podendo acometer tecidos adjacentes ou órgãos distantes. As células cancerígenas se dividem rapidamente, são extremamente competitivas por espaço e recursos, geralmente são agressivas e causam sérios problemas na qualidade de vida do paciente¹.

As neoplasias malignas estão entre as quatro principais causas de óbitos prematuros (antes dos 70 anos de idade) em todo o mundo, o que se justifica pelo aumento populacional, envelhecimento e por demais fatores de risco para o câncer, sobretudo aqueles relacionados ao desenvolvimento socioeconômico. A estimativa para o Brasil é de que para cada ano que compreende o triênio 2020-2022, ocorram 625 mil novos casos da doença. Esses fatores fazem com o que o câncer seja um dos principais problemas de saúde pública no mundo².

As principais terapias existentes atualmente são a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e remoção cirúrgica do tumor quando há indicação. Tais métodos de tratamento geram resultados satisfatórios, contudo, promovem efeitos adversos, como, intolerância aos fármacos quimioterápicos, dano radioativo induzido pela

radioterapia e baixa eficácia da imunoterapia, implicando nos efeitos terapêuticos para o tratamento satisfatório da doença³.

Diante de todas as consequências dessa doença tão prevalente e grave, é notável a necessidade de novas alternativas de tratamento que sejam eficazes e que acarretem poucos e/ou nenhuns efeitos colaterais^{3,4}. Neste cenário, têm-se os produtos naturais que são importantes fontes de agentes terapêuticos⁵. Entre diversas classes de organismos naturais promissores a serem agentes antineoplásicos destacam-se os líquens, por produzirem uma grande diversidade de metabólitos secundários, quais desses, já descritos na literatura com resultados promissores para este fim⁶⁻⁹.

Os líquens são organismos compostos que consistem em uma associação simbiótica entre uma espécie fúngica (micobionte) e outra fotossintética (fotobionte), geralmente algas verdes, cianobactérias ou ambas^{5,6,10,11}. Esses organismos possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários únicos, com diversas atividades biológicas já descritas, dentre as quais temos atividade antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antibacteriana, anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antitumoral, antifúngica, entre outras^{5,9,11}.

Dada sua importância, a utilização dos líquens na área farmacêutica é de grande relevância, visto que seus produtos metabólicos mostram ser bastante eficazes em ensaios *in vitro* e *in vivo* para o tratamento terapêutico^{5,7,11}. Diante disto, torna-se imprescindível ressaltar a importância de novas descobertas de compostos de origem natural para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento do câncer e de suas consequências.

Portanto, este trabalho teve como objetivo analisar os possíveis danos celulares ao intestino delgado de camundongos com tumor Sarcoma-180, e a eficácia do ácido salazínico, obtido de *P. concurrens*, na redução desses danos.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental não randomizado, com abordagem quantitativa.

O ácido salazínico foi obtido do extrato acetônico do líquen *Parmotrema concurrens*, através do método de recristalização, descrito por Micheletti et al.¹² com algumas modificações. Utilizou-se o método de precipitação pelo solvente acetona. Foi utilizado funil de fundo poroso G4 para filtrações a vácuo do extrato com o

solvente de extração. O sólido resultante foi posto em centrífuga com 20 mL de acetona, a 1.500 rpm por 10 min. Foi aspirado o sobrenadante e o composto foi colocado em dessecador, para evaporação total do solvente.

Foram utilizados 35 camundongos albinos swiss (*Mus musculus*) machos (35-45g), com idade de 60 dias, divididos em 5 grupos experimentais com 7 animais cada. Os animais foram submetidos a jejum de 8 horas antes dos experimentos. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE (Nº 23076.012019/2018.58), com as normas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e, pelas normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

As células do Sarcoma-180 foram mantidas nos camundongos na cavidade intraperitoneal, na forma ascítica, com frequência de manutenção de 7 dias. Para a realização dos experimentos tumorais, a suspensão de células foi aplicada por via subcutânea na região axilar direita do camundongo, de modo a desenvolver o tumor sólido. Foram injetadas $5,0 \times 10^6$ células mL^{-1} em cada animal.

O tratamento iniciou-se 24 h após inoculação das células neoplásicas, sendo realizado durante 7 dias consecutivos. Injeções de soluções do ácido salazínico foram administradas intraperitonealmente nas doses de 25 ou 50 mg/kg, correspondendo a 1,25 e 2,5%, da dose máxima da toxicidade aguda, respectivamente (dados não apresentados). Os animais do grupo controle negativo foram tratados com solução salina + tween 80 a 5% (veículo diluição), enquanto os animais do grupo controle positivo foram tratados com 5-Fluorouracil (20 mg/kg), um grupo não recebeu as células tumorais (grupo sadio).

Os camundongos foram pesados durante todos os dias de experimento. Os pesos corporais médios de cada grupo foram calculados na razão do ganho de peso corporal: $(\text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}) / \text{peso médio inicial} \times 100\%$ ¹³.

Um dia após término do tratamento, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (1,25 g/kg) e xilazina (0,62 g/kg) via intraperitoneal, para coleta do intestino delgado e, consecutivamente, foram eutanasiados por overdose da solução anestésica utilizada¹⁴.

Após remoção do intestino delgado, o mesmo foi lavado com solução salina (NaCl) à 0,9%. Com uma régua graduada foi mensurado o comprimento total do intestino delgado, sendo coletados os 10 cm iniciais, designado de duodeno e os 10

cm posteriores, designado de jejuno¹⁵. As porções intestinais foram pesadas após a eutanásia dos camundongos. O peso relativo foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $(\text{peso médio do intestino} / \text{peso médio corporal}) \times 100$ ¹³.

Os intestinos foram acondicionados em solução de formol a 10% neutro tamponado (NBF), permanecendo nesta solução por um período de 48h, e em seguida as amostras foram adicionadas em álcool a 70%. As amostras teciduais foram desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizadas por xilol, impregnadas e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo com ajuste para 5 µm de espessura. Assim, os cortes histológicos obtidos foram colocados em lâminas histológicas untadas previamente com albumina e logo após foram levados para secagem em estufa regulada à temperatura de 60°C, durante o período de 24 horas.

Os cortes teciduais foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E). As imagens histológicas foram capturadas por câmera digital (Moticam 2300) acoplada ao microscópio óptico (BioBlue), sob foco fixo e clareza de campo, com um aumento final de 100x. Sendo a área das vilosidades intestinais dos fragmentos de duodeno e jejuno dos animais de todos os grupos experimentais, determinadas através da utilização do software ImageJ versão 1.8 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

Os resultados da avaliação histomorfométrica foram expressos como as médias das repetições $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística dos dados utilizou-se o software GraphPad Prism 5.0. Para análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste de Tukey para comparações múltiplas. Um valor de $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância.

RESULTADOS

Os índices de ganho de peso corporal dos animais expostos ao tumor Sarcoma-180 apresentaram níveis maiores do que os animais sadios. Os grupos tratados com o ácido salazínico tiveram um ganho de peso menor comparado aos grupos controle negativo e controle positivo (Tabela 1).

Em relação ao peso relativo das porções intestinais (duodeno e jejuno), o grupo controle negativo apresentou uma diminuição significativa em relação ao grupo sadio. Porém os grupos tratados com ácido salazínico e com 5-Fluorouracil não influenciaram o peso do órgão quando comparado com grupo sadio (Tabela 1).

Tabela 1 – Índice de ganho de peso corporal e peso relativo do intestino dos grupos experimentais

Grupos	Índice de peso corporal (%)	Peso relativo das porções intestinais
SD	4,56	2,10 ± 0,07
CN	31,92	1,27 ± 0,17*
CP	20,36	1,80 ± 0,09
SAL 25	11,96	1,62 ± 0,12
SAL 50	14,10	1,77 ± 0,07

Valores expressos em média ± DP; (N= 7); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, *p <0,05 v.s SD. SD= grupo sadio; CN= controle negativo; CP= controle positivo (5-Fluorouracil); SAL 25/50= ácido salazínico nas doses de 25 e 50 mg/kg.

Fonte: Autora.

Não foram vistos danos ao intestino delgado na avaliação macroscópica feita aos animais experimentais. Os órgãos apresentaram coloração rosácea, íntegros e com ausência de focos inflamatórios (Figura 1).

Figura 1 – Intestino delgado de camundongo portador do tumor Sarcoma-180



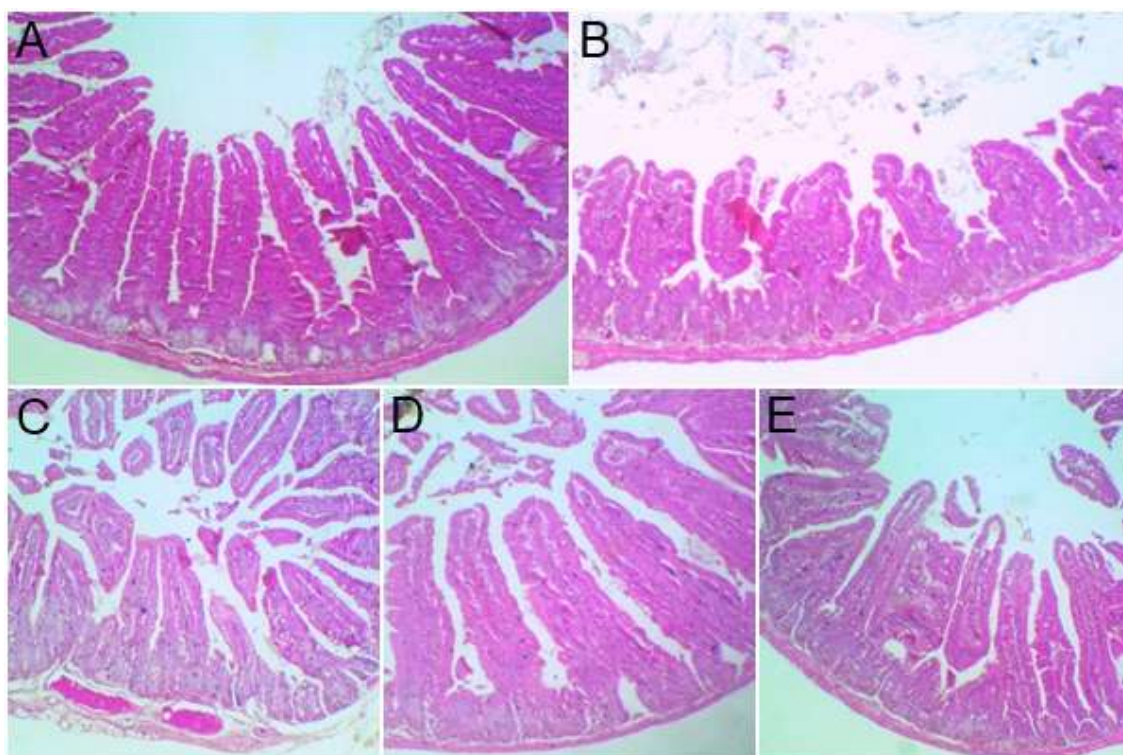
Fotografia do estômago e das porções do intestino delgado (duodeno e jejuno) de camundongo portador do tumor Sarcoma-180.

Fonte: Autora.

Na análise histológica foi observado que os grupos controle positivo e negativo apresentaram vilosidades intestinais menores e pouco íntegras, em

comparação aos demais grupos. Também foi possível verificar que os grupos tratados com ácido salazínico, nas duas doses estudadas, apresentaram as vilosidades com maior semelhança morfológica com as do grupo de animais sadios (Figura 2).

Figura 2 – Fotomicrografias da porção duodenal de camundongos dos grupos experimentais

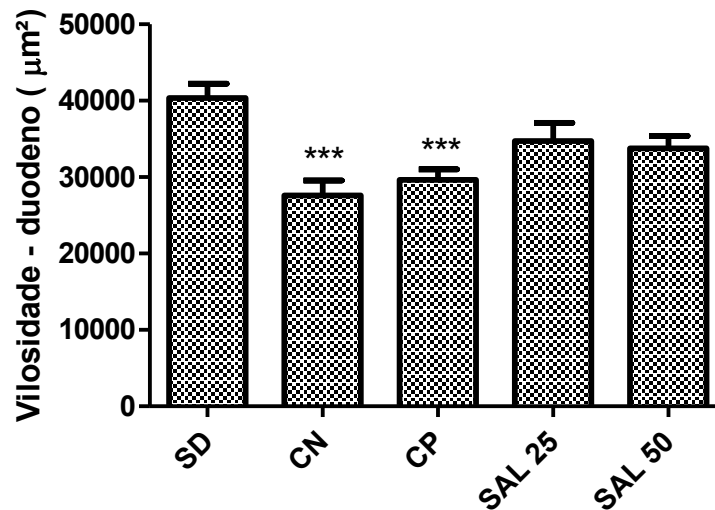


(A) Grupo sadio; (B) Grupo controle negativo (solução salina + tween 80 a 5%); (C) Grupo controle positivo (5-Fluorouracil); (D) SAL 25= ácido salazínico na dose de 25 mg/kg; (E) SAL 50= ácido salazínico na dose de 50 mg/kg. Coloração H.E. Objetiva de 10x (aumento final de 100x).

Fonte: Autora.

Na avaliação da área das vilosidades da porção duodenal foi observado que, os grupos controle negativo e positivo apresentaram uma diminuição significativa comparada ao grupo sadio, com valores de $27620,4 \pm 1938,0$; $29630,0 \pm 1372,0 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Já o grupo sadio apresentou valor de $40340,1 \pm 1874,0 \mu\text{m}^2$. No entanto, o grupo que recebeu o tratamento com ácido salazínico promoveu uma proteção no lúmen duodenal, visto que não foram encontrados danos nas vilosidades analisadas (Figura 3).

Figura 3 – Área das vilosidades da porção duodenal (μm^2)

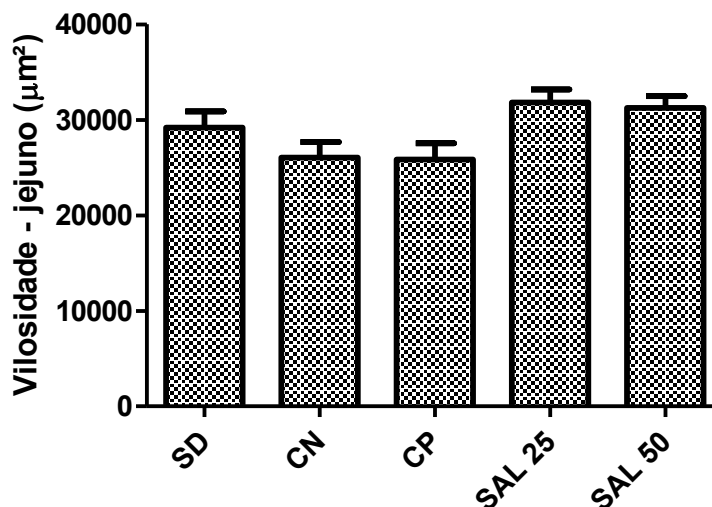


Valores expressos em média $\pm$ DP; (N= 7); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, ***p <0.001 v.s SD. SD= grupo sadio; CN= controle negativo; CP= controle positivo (5-Fluorouracil); SAL 25/50= ácido salazínico nas doses de 25 e 50 mg/kg.

Fonte: Autora.

Na análise feita da área das vilosidades da porção jejunal não foram vistos diferença significativa nos grupos portadores do Sarcoma-180 que receberam tratamento ou não, em relação ao grupo sadio (Figura 4). Também não foram vistos danos aos tecidos estudados.

Figura 4 – Área das vilosidades da porção jejunal (μm^2)



Valores expressos em média $\pm$ DP; (N= 7); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, ***p <0.001 v.s SD. SD= grupo sadio; CN= controle negativo; CP= controle positivo (5-Fluorouracil); SAL 25/50= ácido salazínico nas doses de 25 e 50 mg/kg.

Fonte: Autora.

DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstrou-se que os animais com o tumor Sarcoma-180 tiveram índice de ganho de peso corporal maior em comparação aos animais que não receberam células do tumor (grupo sadio). Tais dados podem estar relacionados ao crescimento do tumor, favorecendo assim, um ganho de peso corporal¹⁶.

Karagoz et al.¹⁷ avaliaram a mudança de peso corporal dos camundongos albinos swiss portadores do Carcinoma de Ehrlich, tratados com ácido difractáico e observaram que os grupos que receberam as células neoplásicas ganharam peso, diferentemente dos animais sadios, estes apresentaram perda de peso corporal. Tais resultados corroboram com este estudo.

No entanto, sabe-se que pacientes oncológicos frequentemente apresentam perda de peso e de tecidos corporais, condições essas que estão relacionadas à localização, tipo tumoral, presença e duração de sintomatologia gastrointestinal, tais como anorexia, diarreia e vômitos¹⁸.

Samuels et al.¹⁹ estudaram pela primeira vez a possível perda de massa do intestino delgado em camundongos com tumor e, verificaram com seus resultados,

uma diminuição na taxa de síntese proteica, nas porções duodenais, independente das reduções na ingestão de alimentos. Descreveram ainda, que a quimioterapia não favoreceu a indução de perda de massa de proteína do intestino delgado ou alteração dos parâmetros histológicos em camundongos com tumor. Sendo assim, a possível relação de perda de peso corporal está relacionada às desordens metabólicas associadas ao crescimento desordenado das células tumorais, o que pode justificar o fato da redução do peso das porções intestinais dos animais pertencentes ao grupo controle negativo. Além do mais, fazer essa comparação estatística de pesos de órgãos entre os animais tratados e não tratados é de extrema importância, pois visa de modo a se prever um possível potencial tóxico da substância testada²⁰.

A análise morfométrica é de grande relevância para uma eficiente avaliação de parâmetros quantitativos e não apenas qualitativos²¹. A partir disso, a morfometria das vilosidades intestinais é importante, visto que a alteração do tamanho e consequentemente de área das vilosidades intestinais afetam a absorção, pois a preservação da mucosa intestinal está diretamente relacionada à integridade dessas estruturas²².

As neoplasias malignas atuam como um estresse ao organismo, já que se trata de uma situação que ameaça a sua homeostase. Lima et al.²³ avaliaram a influência de um modelo de estresse (restrição alimentar) sobre a morfologia da túnica intestinal de ratos submetidos a um modelo de estresse alimentar crônico, revelando que o modelo de estresse utilizado afetou a morfologia do grupo estressado, visto que as vilosidades intestinais aparentavam ser mais largas e com valores de área menor neste grupo, o que corrobora com nossos resultados, visto que a área das vilosidades intestinais da porção duodenal dos grupos controle negativo e controle positivo foram menor em comparação ao grupo sadio.

Karagoz et al.¹⁷ em seus estudos com camundongos albinos swiss portadores do Carcinoma de Ehrlich e tratados com ácido difractáico, evidenciaram a mesma ação protetora do ácido liquênico ao intestino delgado, visto que, seu controle negativo apresentou danos, como inflamação da mucosa e necrose tecidual, diferentemente dos animais que receberam tratamento, nestes não foram observados danos ao tecido intestinal.

Provavelmente, o ácido salazínico foi capaz de atuar como um agente protetor ao intestino delgado, diferentemente do controle positivo usado nesse

estudo, a 5-Fluorouracil, muito utilizada como quimioterápico para diversos tipos de neoplasias.

A 5-Fluorouracil pertence ao grupo dos agentes antimetabólitos, sua ação se dá ao bloqueio da síntese do DNA, fazendo com que ocorra uma inibição ao metabolismo de coenzimas do ácido fólico¹³. Possui uma taxa de resposta de agente único de 10 a 30%. Porém, o uso contínuo pode causar danos colaterais graves, como a mielossupressão e imunossupressão, pelo fato de possuir baixa seletividade para células neoplásicas, agindo também nas células sadias^{13,24,25}.

Os metabólitos liquênicos são considerados compostos promissores na busca de drogas terapêuticas para o combate as células neoplásicas. Visto que, os líquens são organismos únicos, capazes de produzir uma enorme diversidade de substâncias efetivas as mais diversas terapias contra o câncer, como descrito por Solárová et al.⁹ em seu trabalho de revisão, os quais destacam a grande importância dos líquens para este fim.

Além disso, pouco se sabe sobre a ação protetora das substâncias liquênicas aos tecidos dos organismos portando células neoplásicas. Na literatura há uma escassez de tais estudos.

CONCLUSÃO

O ácido salazínico atuou como um possível agente protetor da mucosa duodenal, aos prováveis danos ocasionados pelo tumor Sarcoma-180 ao metabolismo do organismo animal. Portanto, metabólitos oriundos dos líquens são opções promissoras ao desenvolvimento de novos fármacos, destinados ao tratamento de neoplasias e de suas consequências. Contudo, ainda são necessários outros estudos para melhor elucidar os resultados aqui apresentados.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional De Câncer (Brasil). Ministério da Saúde [Internet]. Câncer. O que é câncer? [Última modificação em 30 nov 2020; acesso em 19 jul 2021]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Ministério da Saúde. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2019.

3. Zhang Q, Li L. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. JBUON. 2018; 23(3):561-567.
4. Silva MM, Nascimento TP, Porto ALF. The importance of sarcoma-180 as valid model to determine the toxicity and antitumor activity of molecules and extracts. International Journal of Recent Academic Research. 2019. [acesso em 19 jul 2021]; 1(8):433-437. Disponível em: <http://www.journalijrar.com>.
5. Ranković B, Kosanić M. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. Springer International Publishing Switzerland. 2015; 1-26.
6. Calcott MJ, Ackerley DF, Knight A, Keyzers RA, Owen JG. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. Chem. Soc. Rev. 2018; 47:1730-1760.
7. Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two Parmeliaceae lichens: identification of active compounds. Phytomedicine. 2015; 22(9):847-855.
8. Shrestha G, El-Naggar AM, Clair LLS, O'Neill KL. Anticancer activities of selected species of north american lich extracts. Phytother. Res. 2014. [acesso em 19 jul 2021]. Disponível em: wileyonlinelibrary.com.
9. Solárová Z, Liskova A, Samec M, Kubatka P, Büsselberg D, Solár P. Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. Biomolecules. 2020; 10(87):1-31.
10. Honda NK, Vilegas W. A química dos liquens. Química Nova. 1998; 21(6):110-125.
11. Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Z. Naturforsch. 2010; 65:157-173.
12. Micheletti AC, Beatriz A, Lima DP, Honda NK, Pessoa CÓ, Moraes MO, et al. Constituintes químicos de Parmotrema lichexanthonicum Eliasaro & Adler – isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. Quim. Nova. 2009; 32(1):12-20.
13. Zhang W, Zhong Y, Cui H, Wang L, Yang R, Su Z, et al. Combination of calcineurin B subunit (CnB) e 5-fluorouracil reverses 5-fluorouracil-induced immunosuppressive effect e enhances the antitumor activity in hepatocellular carcinoma. Oncology Letters. 2017; 14:6135-6142.
14. Martins MCB, Rocha TA, Silva TDS, Cavalcanti-Neto MP, Santos NPS, Silva TG, et al. In vitro and in vivo antineoplastic activity of barbatic acid. International Archives of Medicine. 2016. [acesso em 19 jul 2021]; 9(63):1-9. Disponível em: <http://www.medbrary.com>.

15. Bahrami J, Yusta B, Drucker DJ. ErbB activity links the glucagon-like peptide-2 receptor to refeeding-induced adaptation in the murine small bowel. *Gastroenterology*. 2010; 138(7):2447-2456.
16. Jaiswal JV, Wadegaonkar PA, Hajare SW. The bioflavonoid galangin suppresses the growth of ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice: a molecular insight. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012; 167:1325-1339.
17. Karagoz ID, Ozaslan M, Guler I, Uyar C, Yalim T, Kazanci U, et al. In vivo antitumoral effect of diffractaic acid from lichen metabolites on swiss albino mice with ehrlich ascites carcinoma: an experimental study. *Int. J. Pharmacol*. 2014; 10(6):307-314.
18. Toscano BAF, Coelho MS, Abreu HB, Logrado MHG, Fortes RC. Câncer: implicações nutricionais. *Com. Ciências Saúde*. 2008; 19(2):171-180.
19. Samuels SE, Knowles AL, Tilignac T, Debiton E, Madelmont JC, Attaix D. Protein metabolism in the small Intestine during cancer cachexia and chemotherapy in mice. *Cancer Research*. 2000; 60:4968–4974.
20. Wolfsegger MJ, Jaki T, Dietrich B, Kunzler JA, Barker K. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 240:117-122.
21. Tramonte R, Carvalho ROM, Farias DC, Serafim JDM, Ortellado DK, Acampora AJ. Alterações da mucosa intestinal em ratos: estudo morfométrico em três diferentes tratamentos após indução experimental de sepse abdominal aguda. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004; 19(2):120-125.
22. Louzada M, Meneses FS, Fernandes LC, Kim SB, Mora AO, Egami MI, et al. Avaliação histopatológica e morfométrica intestinal dos efeitos da administração prolongada de corticosteróide em cães. *Acta Cir. Bras*. 1999; 14(1).
23. Lima MNG, Xavier JE, Miguel RDS, Santos AJCA, Santos JR, Santos LGT, et al. Histomorfometric analysis of duodenum of rats submitted to food stress. *Braz. J. Hea. Rev*. 2020; 3(4):9747-9761.
24. Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova*. 2005; 28(1):118-129.
25. Longley DB, Allen WL, McDermott U, Wilson TR, Latif T, Boyer J, et al. The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating fasMediated apoptosis in response to antimetabolites. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10:3562–3571.

5 CONCLUSÃO

Diante dos aspectos analisados, conclui-se que o ácido salazínico, obtido de *Parmotrema concurrens*, possui uma provável ação protetora, amenizando possíveis danos ocasionados pelo tumor Sarcoma-180 ao intestino delgado de camundongos. Deste modo, os líquens são opções promissoras a novas biomoléculas com potenciais destinados ao tratamento de neoplasias e de suas consequências.

REFERÊNCIAS

- AGARWALA, S. S. Paraneoplastic syndromes. **Medical Clinics Of North America**, v. 80, n.1, 1996.
- ARENDS, J. Struggling with nutrition in patients with advanced cancer: nutrition and nourishment—focusing on metabolism and supportive care. **Annals of Oncology**, v. 29, n. 2, p. 27-34, 2018.
- ASPLUND, J.; WARDLE, D. A. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. **Biol. Rev.**, p. 1-19, 2016.
- AUSONI, S.; CALAMELLI, S.; SACCÀ, S.; AZZARELLO, G. How progressive cancer endangers the heart: an intriguing and underestimated problem. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 39, p. 535-553, 2020.
- BARBOSA, L. R. LS.; LACERDA-FILHO, A.; BARBOSA, L. C. LS. Immediate preoperative nutritional status of patients with colorectal cancer: a warning. **Arq. Gastroenterol.**, v. 51, n. 4, p. 331-336, 2014.
- BENATTI, M. N. Espécies de *Parmotrema* (Parmeliaceae, Ascomycota) no parque estadual da Cantareira, estado de São Paulo, Brasil. I. As espécies com máculas efiguradas ou reticulares. **Hoehnea**, v. 40, n. 4, p. 649-659, 2013.
- BERGMAN, P. J. Paraneoplastic hypercalcemia. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 27, p. 156-158, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Câncer: tipos, sintomas, tratamentos, causas e prevenção**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer>. Acesso em: 08 nov. 2021.
- BRISDELLI, F. *et al.* Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. **Phytother. Res.** Chichester, v. 27, n. 3, p. 431-437, 2012.
- CALCOTT, M. J.; ACKERLEY, D. F.; KNIGHT, A.; KEYZERS, R. A.; OWEN, J. G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. **Chem. Soc. Rev.**, v. 47, p. 1730-1760, 2018.
- CIOLI, V.; SILVESTRINI, B. Comparative effects of heating and fasting in mice, with particular reference to development of Sarcoma 180. **British Journal of Cancer**, v. 25, n. 1, p. 149–157, 1971.
- COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da universidade federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- FONSECA, G. W. P.; FARKAS, J.; DORA, E.; HAEHLING, S. V.; LAINSCAK, M. Cancer cachexia and related metabolic dysfunction. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, p. 1-19, 2020.

FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 363-371, 2006.

GEBAUER, J.; HIGHAM, C.; LANGER, T.; DENZER, C.; BRABANT, G. Long-term endocrine and metabolic consequences of cancer treatment: a systematic review. **Endocrine Reviews**, v. 40, n. 3, p. 711-767, 2019.

GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P.; FERNÁNDEZ-MORIANO, C.; GONZÁLEZ-BURGOS, E.; DIVAKAR, P. K.; CRESPO, A. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. **RSC Advances**, v. 4, p. 59017-59047, 2014.

HAUSMAN, D. M. What is cancer?. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 62, n. 4, p. 778-784, 2019.

HEYDARNEJAD, M. S.; HASSANPOUR DEHKORDI, A.; SOLATI DEHKORDI K. Factors affecting quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy. **African Health Sciences**, v. 11, n. 2, p. 266-270, 2011.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 110-125, 1998.

HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. **Naturwissenschaften**, v. 86, p. 559-570, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Ministério da Saúde. **Câncer. O que é câncer?** Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 19 jul. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Ministério da Saúde. **Câncer. Tipos de Câncer**. INCA, ago. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>. Acesso em: 08 nov. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JORGE, J. J. Imunoterapia no tratamento do câncer. **Arq Asma Alerg Imunol.**, v. 3, n. 2, p. 133-138, 2019.

KIM, K. W.; LEE, S. J.; KIM, W. Y.; SEO, J. H.; LEE, H. Y. How can we treat cancer disease not cancer cells?. **Cancer Res Treat.**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2017.

KLEINOVINK, J. W. *et al.* Combination of photodynamic therapy and specific immunotherapy efficiently eradicates established tumors. **Clin Cancer Res.**, v. 22, n. 6, p. 1459-1468, 2016.

KRANNER, I.; BECKETT, R.; HOCHMAN, A.; NASH III, T. H. Desiccation-tolerance in lichens: a review. **The Bryologist**, v. 111, n. 4, p. 576-593, 2008.

LEITE, W. L. O.; OLIVEIRA FILHO, A. A. Avaliação farmacológica de produtos naturais no combate ao câncer. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, v. 1, n. 2, p. 192-211, 2014.

MA, G. MY.; CHOW, J. S.; TAYLOR, G. A. Review of paraneoplastic syndromes in children. **Pediatric Radiology**, v. 49, p. 534-550, 2019.

MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L. S.; RUIZ, I. R. G.; FESTA NETO, C. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **An Bras de Dermatol.**, v. 81, n. 5, p. 405-419, 2006.

MARTINS, M. C. B. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antineoplastic activity of barbatic acid. **International archives of Medicine**, v. 9, n. 63. p. 1–9, 2016.

MICHELETTI, A. C. *et al.* Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler: isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 12-20, 2009.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Z. Naturforsch**, v. 65, p. 157-173, 2010.

MONDAL, S.; BANDYOPADHYAY, S.; GHOSH, M. K.; MUKHOPADHYAY, S.; ROY, S.; MANDAL, C. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 49-75, 2012.

NICOLUSSI, A. C.; SAWADA, N. O.; CARDOZO, F. M. C.; ANDRADAE, V.; PAULA, J. M. Qualidade de vida relacionada à saúde de pacientes com câncer em quimioterapia. **Rev Rene.**, Fortaleza, v. 15, n. 1, p. 132-140, 2014.

ORANGI, M. *et al.* Cytotoxic and apoptotic activities of methanolic subfractions of *Scrophularia oxysepala* against human breast cancer cell line. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Câncer**. Genebra: OMS, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 17 nov. 2021.

OZPISKIN, O. M.; ZHANG, L.; LI, J. J. Immune targets in the tumor microenvironment treated by radiotherapy. **Theranostics**, v. 9, n. 5, p. 1215-1231, 2019.

PALUSZCZAK, J.; KLESZCZ, R.; STUDZINSKA-SROKA, E.; KRAJKA-KUZNIAK, V. Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit wnt signaling in colorectal cancer cells. **Mol Cell Biochem**, v. 441, p. 109-124, 2018.

PAÑELLA, L. *et al.* Relación entre estado nutricional y evolución postoperatoria, en cirugía oncológica digestiva. **Rev Med Chile**, v. 142, p. 1398-1406, 2014.

PANIS, C. *et al.* Revisão crítica da mortalidade por câncer usando registros hospitalares e anos potenciais de vida perdidos. **Einstein**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2018.

RANKOVIĆ, B.; KOSANIĆ, M. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. **Springer International Publishing Switzerland**, p. 1-26, 2015.

SAEVARSDOTTIR, T.; FRIDRIKSDOTTIR, N.; GUNNARSDOTTIR, S. Quality of life and symptoms of anxiety and depression of patients receiving cancer chemotherapy. **Cancer Nursing**, v. 33, n. 1, p. 1-10, 2010.

SCHLITT, A.; JORDAN, K.; VORDERMARK, D.; SCHWAMBORN, J.; LANGER, T.; THOMSEN, C. Cardiotoxicity and oncological treatments. **Dtsch Arztebl Int.**, v. 111, n. 10, p. 161-168, 2014.

SCHOVER, L. R. Sexual quality of life in men and women after cancer. **Climacteric**, p. 1-5, 2018.

SHRESTHA, G.; EL-NAGGAR, A. M.; CLAIR, L. L. S.; O'NEILL, K. L. Anticancer activities of selected species of north american lich extracts. **Phytother. Res.**, Chichester, v. 29, n. 1, 2015.

SILVA, C. B.; ALBUQUERQUE, V.; LEITE, J. Qualidade de vida em pacientes portadoras de neoplasia mamária submetidas a tratamentos quimioterápicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 2, p. 227-236, 2010.

SILVA, M. M.; NASCIMENTO, T. P.; PORTO, A. L. F. The importance of sarcoma-180 as valid model to determine the toxicity and antitumor activity of molecules and extracts. **International Journal of Recent Academic Research**, v. 01, n. 08, p. 433-437, 2019.

SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 59-77, 2006.

SILVA, T. D. S. **Atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (Líquen)**. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2014.

SINGH, K.; BHORI, M.; KASU, Y. A.; BHAT, G.; MARAR, T. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – exploring the armoury of obscurity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 177-190, 2018.

SOLÁROVÁ, Z.; LISKOVA, A.; SAMEC, M.; KUBATKA, P.; BÜSSELBERG, D.; SOLÁR, P. Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. **Biomolecules**, v. 10, n. 87, p. 1-31, 2020.

SOUSA, L. T. S. F. *et al.* Imunoterapia oncológica: uma revisão integrativa. **Braz. J. Surg. Clin. Res.**, v. 27, n. 2, p. 181-184, 2019.

SPIELMANN, A. F. **A família *Parmeliaceae* (fungos liquenizados) nos barrancos e peraus da encosta da Serra Geral, Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil**. 2005. 234 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2005.

- STEEMBURGO, T.; AVERBUCH, N. C.; BELIN, C. H. S.; BEHLING, E. B. Hand grip strength and nutritional status in hospitalized oncological patients. **Rev. Nutr.**, v. 31, n. 5, p. 489-499, 2018.
- TORRE, L. A.; SIEGEL, R. L.; WARD, E. M.; JEMAL, A. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.
- TOSCANO, B. A. F.; COELHO, M. S.; ABREU, H. B.; LOGRADO, M. H. G; FORTES, R. C. Câncer: implicações nutricionais. **Com. Ciências Saúde**, v. 19, n. 2, p. 171-180, 2008.
- VIANA, A. R.; MARZARI, J.; WERGUTZ, J.; KRAUSE, L. M. F. Produtos bioativos na prevenção e no tratamento do câncer, em especial o melanoma. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde**, v. 18, n. 3, p. 511-528, 2017.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 3855-3864, 2018.
- WHELAN, C. J.; CUNNINGHAM, J. J. Resistance is not the end: lessons from pest management. **Cancer Control**, v. 27, p. 1-5, 2020.
- YANG, Y. *et al.* Lichen secondary metabolite, physciosporin, inhibits lung cancer cell motility. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. 1-16, 2015.
- YIP, K. T. *et al.* Small molecules antagonise the α 5 β 1-fibronectin interaction in malignant melanoma. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.
- ZHANG, Q.; LI, L. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. **JBUON**, v. 23, n. 3, p. 561-567, 2018.

ANEXO A – NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research

DIRETRIZES PARA AUTORES

1. CONTEÚDO DAS SEÇÕES

Os manuscritos enviados à RBPS devem ser redigidos no idioma português ou inglês e devem se enquadrar em uma das seções da revista, descritas a seguir:

1 - **Editorial:** comentário crítico e aprofundado, preparado pelos editores da Revista e/ou por pessoa convidada com notória vivência sobre o assunto abordado. Deve conter a estrutura de um texto dissertativo, com Introdução, Desenvolvimento, Conclusão e Referências.

2 - **Artigos originais** (perfazem mais de 80% da edição): apresentam resultados inéditos de pesquisa científica, clínica ou experimental, entre outros. Devem conter em sua estrutura: Introdução, Objetivo, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências.

3 - **Relatos de casos:** apresentação da experiência profissional, baseada em estudos de casos peculiares e/ou em novas técnicas, com comentários sucintos de interesse para a atuação de outros profissionais da área. Devem conter em sua estrutura: Introdução, Relato(s) do(s) Caso(s), Discussão e Referências. Para relatos de técnicas: Introdução, Apresentação da Técnica, Conclusão e Referências.

4 - **Artigos de revisão:** avaliação crítica sistematizada sobre determinado assunto, devendo ter conclusões. Devem ser descritos os procedimentos adotados – metodologia de busca, critérios de inclusão e exclusão, resultados e discussão – esclarecendo a delimitação do tema. Devem conter em sua estrutura: Introdução, Objetivo, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências.

5 - **Relatos de Experiência:** Redação técnico-científica com objetivo de descrever experiência vivenciada e contribuir com a construção do conhecimento na área de forma sistematizada e estruturada com finalidade de trazer reflexões sobre

determinada realidade e/ou experiência. Deve conter: Introdução (contextualização, relato da experiência, marco teórico), resultados, discussão e conclusões.

2. MANUSCRITOS EM LINGUA ESTRANGEIRA

A Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde aceita submissão de manuscritos na íntegra em língua estrangeira desde que os autores apresentem junto ao trabalho submetido o certificado de revisão de inglês ou espanhol.

Os pesquisadores deverão assumir os custos da revisão em língua estrangeira. Caso um dos coautores seja estrangeiro nativo da língua inglesa e/ou espanhola, este deverá revisar o inglês e o espanhol do trabalho. O autor principal (correspondente) deverá enviar atesto para revista confirmando que essa revisão foi feita por um dos autores nativos da língua inglesa ou espanhola.

Para manuscritos em língua portuguesa, é obrigatório seção de *abstract*, porém não é necessário submeter atesto de revisão da língua (essa etapa é realizada no fluxo de editoração da RBPS sem custos aos autores).

3. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

Os manuscritos deverão ser digitados em *Word for Windows* e enviados exclusivamente pelo Sistema *On-line* de Submissão de Manuscritos (<http://periodicos.ufes.br/rbps>), acompanhados dos documentos digitalizados: a) Declaração de Conflito de Interesse; b) Parecer consubstanciado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa; c) Declaração de Responsabilidade e Transferência de Direitos Autorais.

As páginas do manuscrito devem estar numeradas e configuradas para papel A4, com margens superior, inferior, esquerda e direita de 3 cm, fonte Arial tamanho 12 e espaço 1,5, com alinhamento do texto justificado e parágrafos com tabulação com recuo de primeira linha em 1,25. O número de páginas está limitado a 25 e deve obedecer à configuração acima, incluindo Página de Rosto, Resumo, *Abstract*, Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências, além de ilustrações (figuras, tabelas, quadros, gráficos, fotos etc.).

A) Página de rosto

Deverá ser enviada uma página de rosto contendo somente os seguintes itens: título do manuscrito em português e inglês e nome completo dos autores, informação sobre a afiliação dos autores (principal instituição de origem, cidade, estado e país), nome e endereço completo para correspondência, local em que o estudo foi realizado. Indicação do responsável pela troca de correspondência, fornecendo endereço completo (CEP, telefone com DDD e endereço eletrônico - e-mail) para contato.

Devem ser incluídas na folha de rosto as fontes de financiamento para realização da pesquisa, tais como: bolsas de estudos e auxílios financeiros.

IMPORTANTE: A Página de Rosto deve ser incluída como documento suplementar. Os dados contidos na página de rosto não devem ser incluídos no corpo do manuscrito para garantia do sistema de fluxo editorial *blind review*.

B) Resumo e *Abstract*

Os resumos devem possibilitar ao leitor avaliar o interesse do manuscrito e compor uma série coerente de frases, e não a simples enumeração de títulos, fornecendo, portanto, uma visão clara e concisa do conteúdo do manuscrito, suas conclusões significativas e a contribuição para a saúde coletiva. Deve conter, no máximo, 250 palavras e ser apresentado em português e inglês, incluindo palavras de estrutura (Introdução, Objetivos, Métodos, Resultados, Conclusão) e palavras-chave.

C) Palavras-chave e *Keywords*

São palavras ou expressões que identificam o conteúdo do manuscrito, fornecidas pelo próprio autor. Deverão ser seguidos os cabeçalhos de assuntos dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), em português e inglês, indicados pela Biblioteca Virtual em Saúde (<http://decs.bvs.br>).

D) Estrutura do texto

A estrutura do texto deverá estar de acordo com a natureza do manuscrito: Editorial, Artigos Originais, Artigos de Revisão, Relato de Casos e de Experiência.

E) Ilustrações

As ilustrações e tabelas do manuscrito submetido à apreciação estão limitadas ao número máximo de cinco. No entanto, no caso de aceite do manuscrito, serão solicitados aos autores os arquivos originais em que as ilustrações e tabelas foram construídas a fim de permitir a formatação gráfica.

De acordo com a ABNT, NBR 14724, de 17 de março de 2011, “Qualquer que seja o tipo de ilustração [ou tabela], sua identificação aparece na parte superior, precedida da palavra designativa (desenho, esquema, fluxograma, fotografia, gráfico, mapa, organograma, planta, quadro, retrato, figura, imagem, entre outros), seguida de seu número de ordem de ocorrência no texto, em algarismos arábicos, travessão e do respectivo título”.

Os desenhos enviados poderão ser melhorados ou redesenhados pela produção da Revista, a critério do Corpo Editorial. Imagens digitais poderão ser aceitas desde que sua captação primária tenha ocorrido, pelo menos, em tamanho (10cm x 15cm) e com resolução adequada (300 dpi). Desenhos e esquemas deverão ser limitados ao mínimo, feitos, preferencialmente, em *Corel Draw*, devendo ser fornecidos em formato digital junto com o arquivo do manuscrito e apresentados em folhas separadas. Se houver figuras extraídas de outros trabalhos previamente publicados, os autores devem providenciar permissão, por escrito, para a reprodução. Essa autorização deve acompanhar o manuscrito submetido à apreciação para publicação. Todas as ilustrações e tabelas, sem exceção, devem ser citadas no corpo do texto e ser apresentadas em páginas separadas.

F) Agradecimentos

É opcional aos autores. Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas a pessoas ou instituições que contribuíram substancialmente para a elaboração do manuscrito. Deverão estar dispostos no manuscrito antes das referências. Não devem ser feitos agradecimentos de cunho pessoal ou familiar.

G) Referências

As referências estão limitadas a um número máximo de 30 (exceto para revisões sistemáticas) e devem ser apresentadas na ordem em que aparecem no texto, numeradas e normatizadas de acordo com o Estilo *Vancouver*. Os exemplos devem estar conforme os Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

H) Citação das referências no texto

Seguir o sistema numérico de citação, no qual somente os números índices das referências, na forma sobrescrita, são indicados no texto. Não devem ser citados os nomes dos autores e o ano de publicação. Somente é permitida a citação de nome de autores (seguido de número índice e ano de publicação do manuscrito) se estritamente necessário. Exemplos de citação de referências no texto:

- Números aleatórios

“O processamento é negligenciado pela maioria dos profissionais, chegando alguns autores a afirmar que cerca de 90% das falhas em radiografias acontecem na câmara escura”^{2,8,10}.

- Números sequenciais

“Desde que observações clínicas comprovaram que lesões de mancha branca são reversíveis, a remineralização passou a ser um importante mecanismo na prevenção e redução clínica das cáries em esmalte”¹⁻⁴.

- Citação de nome de autor

“Cassatly et al.² reportam um caso de osteomielite em uma paciente submetida à apicectomia com laser de Nd: YAG, que levou à necrose de parte da maxila, pela difusão do calor gerado ao tecido ósseo adjacente ao ápice radicular.”

I) Abreviaturas

Não são recomendáveis, exceto as reconhecidas pelo Sistema Internacional de Pesos e Medidas ou as consagradas nas publicações médicas, que deverão seguir as normas internacionais tradicionalmente em uso (aprovadas pelo documento de Montreal publicado no British Medical Journal 1979;1:532-5). Quando o número de abreviaturas for significativo, providenciar um glossário à parte.

J) Nomes de drogas

A utilização de nomes comerciais (marca registrada) não é recomendável; quando necessário, o nome do produto deverá vir após o nome genérico, entre parênteses, em caixa-alta-e-baixa, seguido pelo símbolo que caracteriza a marca registrada, em sobrescrito.

K) Considerações finais

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a sua conformidade em relação a todos os itens aqui listados. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

Para contato, envie e-mail para rbps.ccs@ufes.br

Correspondências devem ser enviadas à Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde aos cuidados da Editoria-chefe da Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde (RBPS), endereço: Avenida Marechal Campos, número 1468, Maruípe, Vitória, Espírito Santo, Brasil, Cep: 29040-090. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Artigos Originais

O resumo deve possibilitar ao leitor avaliar o interesse do manuscrito e compor uma série coerente de frases, e não a simples enumeração de títulos, fornecendo,

portanto, uma visão clara e concisa do conteúdo do manuscrito, suas conclusões significativas e a contribuição para a saúde coletiva. Deve conter no máximo 250 palavras, em parágrafo único, espaçamento simples, e as seções “**Introdução, Objetivos, Métodos, Resultados e Conclusão**”. O nome da seção deve estar em negrito. O texto deve ser em fonte Arial, 12, sem negrito. Ao final do resumo, devem ser listadas de 3 a 5 palavras-chave.

Relato de Caso

Apresentação da experiência profissional, baseada em estudos de casos peculiares e/ou em novas técnicas, com comentários sucintos de interesse para a atuação de outros profissionais da área. Devem conter em sua estrutura: Introdução, Relato(s) do(s) Caso(s), Discussão e Referências. Para relatos de técnicas: Introdução, Apresentação da Técnica, Conclusão e Referências.

Relatos de Experiência

Redação técnico-científica com objetivo de descrever experiência vivenciada e contribuir com a construção do conhecimento na área de forma sistematizada e estruturada com finalidade de trazer reflexões sobre determinada realidade e/ou experiência. Deve conter: Introdução (contextualização, relato da experiência, marco teórico), resultados, discussão e conclusões.

Artigos de Revisão

Avaliação crítica sistematizada sobre determinado assunto, devendo ter conclusões. Devem ser descritos os procedimentos adotados – metodologia de busca, critérios de inclusão e exclusão, resultados e discussão – esclarecendo a delimitação do tema. Devem conter em sua estrutura: Introdução, Objetivo, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências.

Declaração de Direito Autoral

Direitos Autorais

Solicita-se aos autores dos manuscritos submetidos à apreciação enviar à RBPS uma Declaração de Responsabilidade e Transferência de Direitos Autorais,

contendo a assinatura de cada um dos autores, de acordo com o modelo apresentado a seguir:

Declaração de Responsabilidade e Transferência de Direitos Autorais

Nós, abaixo assinados, transferimos todos os direitos autorais do manuscrito intitulado “_____” à Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde. Declaramos, ainda, que o manuscrito é original e não está sendo considerado para publicação em outra revista, no formato impresso ou eletrônico.

(Discriminar as funções de cada autor)

Exemplos:

(Nome do autor) realizou a aplicação do questionário, experimento clínico, correção e edição final.

(Nome do autor) realizou a busca bibliográfica, coletou dados e atuou na redação, correção e edição final.

Local, __/__/__. Assinatura(s): _____

IMPORTANTE: A Declaração de Responsabilidade e Transferência de Direitos Autorais deve ser incluída como documento suplementar.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Respeitosamente,

Equipe Editorial da RBPS