

SILVIA GRANJA

**EFEITOS DO EXTRATO LIOFILIZADO DA
EUPHORBIA TIRUCALLI SOBRE A RESPOSTA
HEMATOPOÉTICA EM CAMUNDONGOS
PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO
DE EHRLICH**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica - Silvia Granja.

Campinas, 15 de maio de 2003.

Mary Luci de Souza Queiroz
Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
- Orientadora -



CAMPINAS

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

200505138

SILVIA GRANJA

**EFEITOS DO EXTRATO LIOFILIZADO DA
EUPHORBIA TIRUCALLI SOBRE A RESPOSTA
HEMATOPOÉTICA EM CAMUNDONGOS
PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO
DE EHRlich**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre
em Farmacologia.*

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



CAMPINAS

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp G76e
V	EX
TOMBO BC/	62279
PROC.	16-06-09
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	28/02/05
Nº CPD	

Bibid: 347783

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

G767e

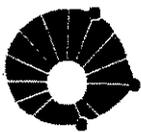
Granja, Silvia

Efeitos do extrato liofilizado da euphorbia tirucalli sobre a resposta hematopoética em camundongos portadores do tumor ascístico de ehrlich / Silvia Granja. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Planta medicinais. 2. Hematopoeese. 3. Prostaglandinas. I.
Mary Luci de Souza Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/05/2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dedico este trabalho aos meus pais, Francisco e Maria Cândida e às minhas filhas, Livia e Thaís, pelas presenças amorosas e amigas, incentivando-me constantemente a prosseguir, mesmo diante das adversidades que muitas vezes a vida nos apresenta.

À Profª Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, pelo estímulo e apoio ao meu desenvolvimento científico.

Aos meus pais, Francisco e Maria Cândida, pelo amor que têm me dedicado durante minha existência e por todo apoio e colaboração que recebo deles constantemente.

Às minhas filhas, Lívia e Thaís, por compreenderem minhas ausências em alguns momentos de suas vidas e pelo amor e carinho que me dedicam sempre, bem como ao Milton, por não ter impedido o meu progresso.

Aos meus irmãos, Lúcia e Ivan e aos meus cunhados.

À amiga, Dra. e Profª. Marize Campos Valadares, pelo incentivo e ajuda constante, durante a elaboração desta tese.

Aos amigos do laboratório de Cultura de células, presentes e ausentes, pela amizade e cooperação no decorrer das minhas atividades de mestrado, assim como, pelo ambiente de trabalho alegre, tranqüilo e estimulante que me proporcionaram.

Aos funcionários do laboratório de Cultura de células, Raphael e Sueli pela colaboração e amizade.

Ao Departamento de Farmacologia/FCM, que possibilitou a realização deste trabalho e ao Departamento de Comunicação Social, Hemocamp.

Ao Dr. Valter Acorsi e aos profissionais da farmácia Acorsi e do Centro de Química do ITAL, bem como às várias pessoas que me auxiliaram na realização desta tese, direta ou indiretamente e não estão aqui mencionadas.

À Deus, nosso Pai, que nos ama e sempre aponta-nos o melhor caminho.

	PAG.
RESUMO	X
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	52
7. SUMMARY	54
8. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
9. APÊNDICES	67

	PÁG.
Tabela 1. Avaliação da sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados com o TAE e tratados com EET por 5 dias consecutivos.....	68
Tabela 2. Efeitos da EET sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea em camundongos BALB/c inoculados com TAE (6×10^6 cel./animal-i.p.) e tratados por 5 dias consecutivos.....	69
Tabela 3. Efeitos da EET sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço em camundongos BALB/c inoculados com TAE (6×10^6 cel./animal - i.p.) e tratados por 5 dias consecutivos.....	70
Tabela 4. Variação do peso do baço de camundongos BALB/c inoculados com o TAE e tratados com EET por 5 dias consecutivos.....	71
Tabela 5. Contagem diferencial de células da medula óssea (Mieloblastos) de camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos com diferentes doses de EET, administradas oralmente.....	72
Tabela 6. Contagem diferencial de células da medula óssea (Promielócitos/ Mielócitos) de camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos com diferentes doses de EET, administradas oralmente.....	73
Tabela 7. Contagem diferencial de células da medula óssea (Neutrófilo PMN/ Metamielócito) de camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos com diferentes doses de EET, administradas oralmente.....	74
Tabela 8. Contagem diferencial de células da medula óssea (Linfócito) de	

camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos com diferentes doses de EET, administradas oralmente..... 75

Tabela 9. - (Síntese das tabelas 5, 6, 7 e 8) Efeitos do EET sobre a contagem diferencial de células da medula óssea de camundongos BALB/c inoculados com TAE (6×10^6 cel./animal - i.p.) e tratados por 5 dias consecutivos..... 44

Tabela 10. Efeitos do EET sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em animais BALB/c inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos..... 76

	PÁG.
Figura 1. Aspecto morfológico da <i>Euphorbia tirucalli</i>	22
Figura 2. Aspecto morfológico de uma colônia de células precursoras hematopoéticas da medula óssea.....	29
Figura 3. Gráfico da Curva de Sobrevida - Efeito do tratamento com diferentes doses do EET, sobre a sobrevida de animais BALB-C inoculados com dose letal de células do TAE (6×10^6 células/animal).....	35
Figura 4. Gráfico CFU-GM/Medula óssea - Número de unidades formadoras de colônias de granulócito/macrófago (CFU-GM) na medula óssea de camundongos Balb/c tratados durante 5 dias consecutivos com 125, 250 e 500 mg/Kg/dia de EET (tintura de Avelóz liofilizada).....	38
Figura 5. Gráfico CFU-GM/Baço - Número de unidades formadoras de colônias granulócito/macrófago (CFU-GM) no baço de camundongos Balb/c tratados durante 5 dias consecutivos com 125, 250 e 500 mg/Kg/dia de EET (tintura de Avelóz liofilizada).....	39
Figura 6. Gráfico do Peso do Baço - Peso do Baço (gramas) de camundongos Balb/c tratados durante 5 dias consecutivos com 125, 250 e 500 mg/Kg/dia de EET (tintura de Avelóz liofilizada).....	41

RESUMO

Neste trabalho, investigamos o efeito do extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli* L. (EET), sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço, assim como na sobrevivência dos animais, utilizando-nos de um modelo de inoculação tumoral de células de tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

Para a realização dos experimentos, inoculou-se o tumor na dose de 6×10^6 células/animal, tendo sido iniciado o tratamento 24 horas após a inoculação. O tratamento com o EET, consistiu na administração oral (gavagem) de diferentes doses (125, 250 ou 500 mg/Kg) durante 5 dias consecutivos, tendo sido realizada a técnica de cultura clonal para avaliação do número de precursores hematopoéticos (CFU-GM), 24 horas após a última dose.

A inoculação do TAE produziu nos animais uma redução no número de CFU-GM na medula óssea e um aumento desse número no baço. Na avaliação dos resultados, observamos que os animais inoculados com TAE e tratados com as 5 doses de EET apresentaram uma proteção contra mielossupressão induzida pelo TAE, tendo sido significativos os valores obtidos para as três doses avaliadas. Quanto à hematopoese esplênica, observou-se uma redução significativa no número de CFU-GM, para as três doses avaliadas, quando comparados aos animais somente inoculados com o TAE. Para os grupos de animais normais, tratados com as 3 doses do EET, não foram observadas alterações no número de precursores hematopoéticos para CFU-GM, tanto para a medula óssea como para o baço.

Em relação ao estudo da sobrevivência, ficou demonstrado um aumento significativo dose - dependente no número de dias que os animais inoculados com TAE e

tratados com as diferentes doses do EET sobrevivem, quando comparado ao grupo somente inoculado com TAE.

Frente aos resultados obtidos neste estudo, podemos sugerir que o EET, nas três doses estudadas, promove uma proteção dose dependente contra a mielossupressão desencadeada pelo desenvolvimento tumoral.

1. INTRODUÇÃO

Substâncias bioativas de origem natural vêm despertando interesse da comunidade científica. Aliados ao desenvolvimento tecnológico atual, métodos cada vez mais específicos e precisos permitem a avaliação dos efeitos farmacológicos de plantas conhecidas popularmente como medicinais, as quais têm seu uso consagrado pela medicina popular, assim como permitem o isolamento de componentes fitoquímicos com atividade terapêutica.

Ao longo dos tempos, um grande número de plantas tem desempenhado importante papel terapêutico no tratamento das doenças que atingem o homem como por exemplo, os digitálicos. Muitas das drogas utilizadas pela medicina contemporânea foram originalmente identificadas como substâncias bioativas encontradas em plantas específicas. Mesmo no tratamento do câncer a utilização de fitoterápicos tem sido explorada e agentes antitumorais clinicamente utilizados em nossos dias, tais como Paclitaxel, Vincristina, e mais recentemente Taxotere, Vinorelbine e Topotecano (PEZZUTO, 1997), primeiramente isolados a partir de plantas, demonstram a importância da pesquisa científica na identificação da atividade farmacológica de plantas e/ou seus extratos, para novas descobertas em áreas como oncologia, imunoterapia, entre outras.

A família Euphorbiaceae tem sido amplamente estudada devido a componentes bioativos isolados e identificados como phorbol éster e seus diterpenos similares (KAZANIETZ *et al.*, 2000). Algumas das espécies dessa família têm sido objeto de investigações químicas e farmacológicas, devido às propriedades irritantes e cocarcinogênicas de seu látex (MARCO, CERVERA, YUSTE, 1997). Porém, é interessante observar que outros trabalhos na literatura, como os citados a seguir, têm demonstrando as atividades antitumoral ou antileucêmica de diversas espécies da família

Euphorbiaceae, em testes realizados *in vitro* e *in vivo*, com os componentes bioativos isolados.

Assim sendo, os estudos realizados sobre as atividades antitumoral e antileucêmica das *Euphorbiaceae* nos mostram que os triterpenos isolados da *E. pulcherrina*, identificados como 9,19-cycloart-25-ene-3 β , 25 diol e 9,19 cycloart-25-ene-3 β , 24 diol, têm demonstrado atividade citotóxica em células do tumor ascítico de Ehrlich *in vitro* (KIELLAND *et al.*, 1996). O látex da *E. poisonii*, que é extremamente irritante para a pele humana e pode causar conjuntivite quando em contato com os olhos, foi fracionado e a toxicidade dessas frações avaliada em seis tipos de tumores humanos sólidos. Excetuando-se a fração tigliane, as outras demonstraram citotoxicidade seletiva frente a estes tumores (FATOPE *et al.*, 1996).

Em outro trabalho na literatura, foi avaliado o efeito de dois diterpenos da planta *Croton cajucara* (*Euphorbiaceae*) na sobrevivência de camundongos portadores de sarcoma 180 e de tumor ascítico de Ehrlich, tendo sido detectada uma significativa atividade para TNF alpha nos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (GRYMBERG *et al.*, 1999).

Também foi relatada atividade antitumoral do extrato da *E. lathyris L.* contra o sarcoma 180 ascítico em camundongos, atribuindo-se essa atividade ao princípio ativo ingenol-3-hexadecanoato, juntamente com o diterpeno inativo ingenol-20-hexadecanoato (ITOKAWA *et al.*, 1989).

Estudos realizados com o extrato fracionado da *L. kansui* demonstraram efeitos estimulatórios de ingenóis na expressão dos receptores Fc de macrófagos, cuja regulação depende da síntese de RNA, envolvendo a translocação e ativação da proteína quinase C (MATSUMOTO, CYONG, YAMADA, 1992).

Princípios antileucêmicos foram isolados do extrato da *E. esula* L. (diterpenoide diester, ingenol 3, 20-dibenzoato) e *Croton tiglium* L. (phorbol 12-tiglate 13-decanoato), Euphorbiaceae, e mostraram atividade contra a leucemia linfocítica P-388 em camundongos (KUPCHAN *et al.*, 1976). Temos ainda em outros estudos, onde compostos bioativos como phorbol éster, ingenol éster e derivados de daphnanes, isolados de plantas da referida família, têm também demonstrado atividade antileucêmica. Os lathyranes macrocíclicos têm sido relatados como citotóxicos contra células tumorais em cultura *in vitro* (FATOPE *et al.*, 1996).

Além destes princípios ativos citados, foram isolados do látex da *Euphorbia nivulia*, dois diterpenos do ingol, que juntamente com os triterpenos cycloart-25-en 3β -ol e cyclonivulinol, apresentaram uma atividade inibitória para prostaglandina E₂ (PG E₂) (RAVIKANTH *et al.*, 2001).

A *Euphorbia tirucalli* L. (figura 1), nosso objeto de estudo, é um arbusto pertencente à família das *Euphorbiaceae*, conhecida popularmente como aveloz ou também como árvore do lápis (pencil tree), devido aos seus ramos cilíndricos. Originária da África, foi posteriormente introduzida em outros países tropicais, como uma espécie abundante.

Atualmente, a *Euphorbia tirucalli* L. tem sido utilizada pela medicina popular no tratamento de tumores cancerosos e pré-cancerosos. A posologia indicada nestes casos é bastante empírica, recomendando-se o uso do látex, leitoso e cáustico, e de efeito irritante em contato com a pele e olhos (FRANCO, 1998). Porém, além do uso caseiro desse látex, encontramos em algumas farmácias fitoterápicas a tintura de aveloz, a qual vem sendo indicada como tratamento para casos de câncer.

Além da *Euphorbia tirucalli* L., outras espécies brasileiras como *E. anômala*, *E. gymnoclada*, *E. insulana*, que também são chamadas de aveloz, são popularmente conhecidas como anticancerígenas, sendo empregadas no tratamento de cancróides, epitelomas, sarcomas, tumores e verrugas, além de serem também utilizadas como um remédio popular em outros países como Índia, Indonésia, Malabar e Malásia. Na Índia, o látex vesicante é usado para combater asma, tosse, dor de ouvido, neuralgia, reumatismo, além de câncer. Outras aplicações farmacológicas também são citadas, como por exemplo, um efeito purgativo (com pequenas doses do látex), um efeito irritante e emético (com altas doses do látex), ou ainda utilizado em casos de impotência sexual e sífilis (DUKE, 1988).

Segundo DUKE, (1988), o látex contém 53,8 à 79,9% de água e substâncias solúveis e 2,8 a 3,8% de borracha. O látex fresco contém o álcool triterpenóico isoeuphoral ($C_{30}H_{50}O$), idêntico ao euphol da *E. resinífera*, sendo que taraxasterol ($C_{30}H_{50}O.CH_3OH$) e tirucallol ($C_{30}H_{50}O$) também foram isolados. Quanto ao látex seco, a resina talvez seja o seu principal constituinte (75,8 à 82,1%).

Outros constituintes isolados e identificados como ingenane e tiglane, do grupo dos ésteres diterpênicos, são derivados de ácidos alifáticos insaturados, ácido acético e dos álcoois diterpênicos polifuncionais 4-deoxyphorbol, phorbol e ingenol, sendo os principais constituintes os isômeros 12, 13-acetato, acylato de phorbol, bem como o 3-acylato do ingenol. O 12,20-didesoxiphorbol também está presente no látex da *E. tirucalli* (BRITO, 1981; FURSTEMBERGER & HECKER, 1977, 1985 e 1986).

BRITO, (1981), isolou princípios ativos da *Euphorbia tirucalli* e detectou, em testes realizados, um antagonismo para prostaglandina E_2 (PGE_2), na fração identificada como ácido elágico.

Apesar de seu uso na medicina popular como antitumoral, estudos na literatura sugerem uma redução da imunidade celular específica para o vírus Epstein-Barr, em presença da *Euphorbia tirucalli* L. (IMAI *et al.*, 1994).

Diante do exposto e dos achados conflitantes da literatura, na qual alguns trabalhos apontam para um efeito pró-carcinogênico de espécies da família *Euphorbiaceae*, enquanto outros para uma atividade antitumoral, e somando-se a isso o uso pela medicina popular da *Euphorbia tirucalli* como anticarcinogênico, tornam-se fundamentais novos trabalhos que explorem essas propriedades. Dessa forma, neste trabalho, com o intuito de contribuir para a elucidação da atividade antitumoral dessa espécie, utilizando um modelo de inoculação tumoral, avaliamos os efeitos protetores da *Euphorbia tirucalli* em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

Estudos recentes realizados em nosso laboratório¹ demonstraram que o tumor ascítico de Ehrlich, compromete o sistema hematopoético do hospedeiro, induzindo uma mielossupressão drástica, manifestada através de uma redução no número de precursores hematopoéticos, para granulócitos e macrófagos (CFU-GM), da medula óssea (JUSTO, DÚRAN, QUEIROZ, 2000; JUSTO, SILVA, QUEIROZ, 2001; MIRANDOLA, JUSTO, QUEIROZ, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2001a; QUEIROZ *et al.*, 2001b; VALADARES *et al.*, 1998; VALADARES & QUEIROZ, 2002). A utilização de modelos experimentais de inoculação tumoral é importante para avaliar a atividade antitumoral, pois vários estudos realizados em nosso laboratório com os compostos dicitlopentadienildiclorotitânio I, MAPA (agregado de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio protéico), extrato

¹ nosso laboratório - refere-se ao laboratório de Cultura de Células do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas, que de agora em diante neste trabalho, assim será referido.

de *Caesalpinia ferrea*, extrato de *Acanthospermum australe* entre outros, em camundongos BALB-C, demonstraram um efeito imunoprotetor nos precursores hematopoéticos da medula óssea.

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma de mama, de origem espontânea, encontrado em camundongos, tendo sido descrito pela primeira vez por EHRLICH & APOLANT, (1905). Esse tumor caracteriza-se por seu crescimento bastante rápido e por não regredir espontaneamente, sendo mantido facilmente por transplantes sucessivos, com uma percentagem de 100% de crescimento, tanto no tecido subcutâneo (crescimento na forma sólida) como no peritônio (crescimento na forma ascítica), de diferentes linhagens murina (SIGIURA, 1965).

A influência do crescimento tumoral na proliferação e diferenciação das células pluripotentes (CFU-S) e progenitoras (CFU-C) da medula óssea ou baço tem sido sugerida por inúmeras observações. Estudos demonstraram que o tumor de Ehrlich produz alterações severas no sistema hematolinfopoético do hospedeiro, sendo freqüentemente associado à imunodepressão, trombocitopenia, anemia, depleção do timo, esplenomegalia e leucocitose granulócito-dependente (DELMONTE, LIEBELT, LIEBELT, 1966; CLERICI *et al.*, 1971; LALA *et al.*, 1977; KEEB & LALA, 1978; WHITNEY, KELLY, LEVY, 1978; PESSINA *et al.*, 1982a; PESSINA *et al.*, 1982b; PARHAR & LALA, 1988; LALA *et al.*, 1990; BALDUCCI & HARDY, 1992; RUIZ DE MORALES, VÉLEZ, SUBIZA, 1999). Essas alterações hematológicas se dão devido à produção de fatores solúveis pelas células tumorais, interagindo com os mecanismos homeostáticos da medula óssea do hospedeiro. PESSINA *et al.*, (1982a) demonstraram, através de estudos *in vitro*, que

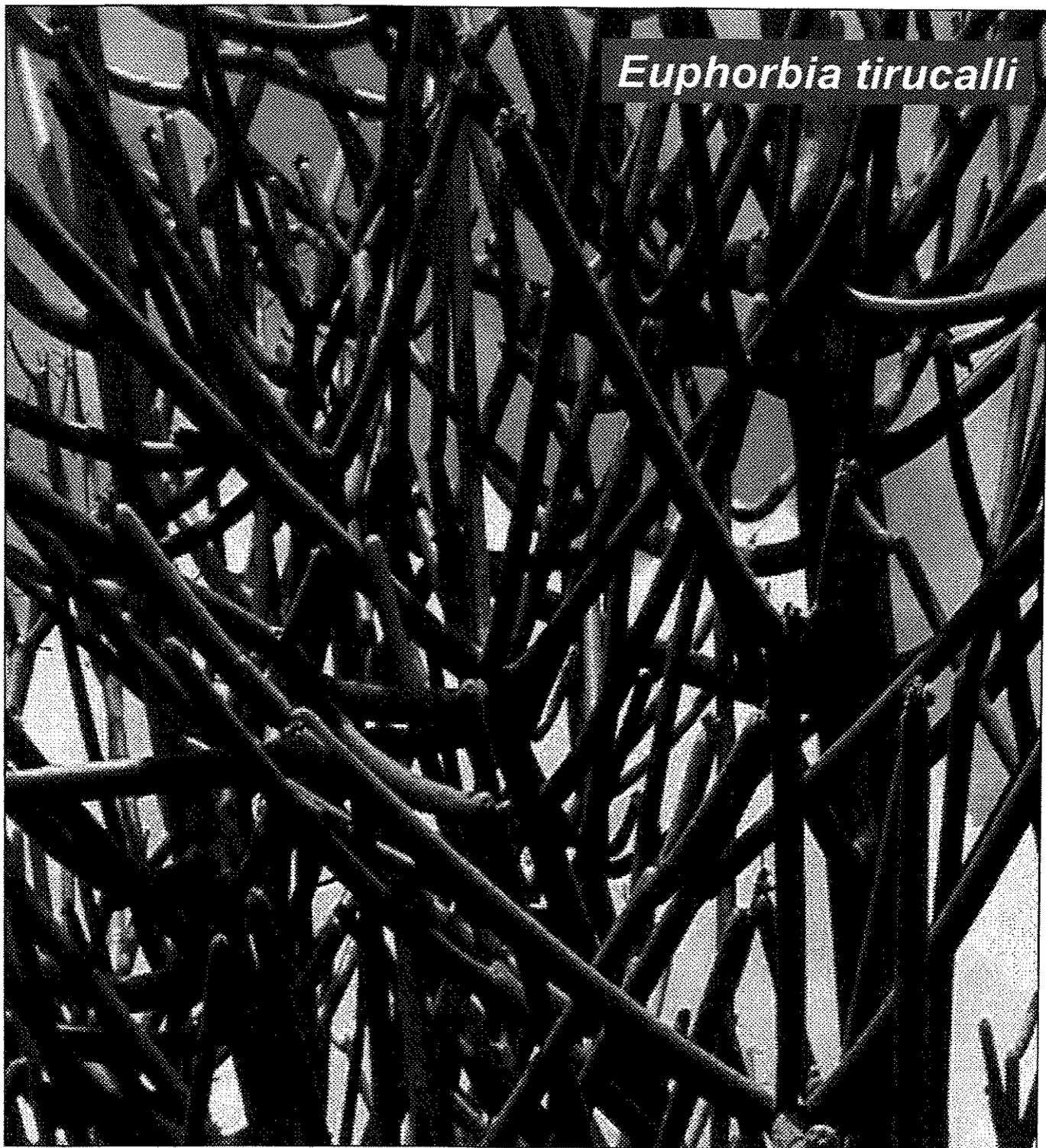
células normais da medula óssea, tratadas com fluido ascítico de Ehrlich acelular, apresentaram uma severa redução no número de progenitores (CFU-C) comprometidos com a série granulócito-macrófago e de células pluripotentes. Outros autores têm sugerido que fatores humorais produzidos pelas células do TAE, ou pela interação tumor-hospedeiro, afetam a atividade normal dos macrófagos, provocando alterações na resposta imunológica do hospedeiro. Entre esses fatores, podem ser citados as prostaglandinas da série E₂ (PGE₂), os fatores de crescimento tumoral (TGF-β), fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores estimuladores de crescimento para granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e a presença de células supressoras naturais (PELUS *et al.*, 1979; SMITH & LEVINSON, 1979; PARHAR & LALA, 1988; FECCHIO *et al.*, 1990a; VIÑUELA *et al.*, 1991; SEGURA, BARBERO, MÁRQUEZ, 1997; ELGERT, ALLEVA, MULLINS, 1998; LUO *et al.*, 1998; SEGURA, BARBERO, MÁRQUEZ, 2000).

Nesse sentido, temos que a intensidade da reação inflamatória provocada pela implantação do tumor, mediada principalmente por macrófagos, é de fundamental importância na evolução do crescimento tumoral, sendo responsável por alterações no padrão de migração celular e de exsudação, além da estimulação/ativação de macrófagos inflamatórios. Mediante tais informações, temos que o desenvolvimento tumoral utiliza-se de mecanismos próprios que inibem a resposta inflamatória do hospedeiro, favorecendo a implantação do tumor (BONTA & BEM-EFRAIM, 1993; FECCHIO *et al.*, 1990a; MANTOVANI *et al.*, 1992; ELGERT, ALLEVA, MULLINS, 1998).

Diante do exposto, e sabendo-se que a resposta hematopoética é fundamental para a manutenção da homeostase do organismo, e ainda que as células progenitoras

hematopoéticas estão organizadas hierarquicamente, de acordo com sua capacidade de auto-renovação e seu comprometimento com uma linhagem específica (METCALF, 1984; QUEIROZ, 1988), avaliou-se neste trabalho um possível efeito do extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli* L. (EET) sobre o número de precursores hematopoéticos da medula óssea e baço (CFU-GM), assim como na produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoéticas, na celularidade da medula óssea, além dos efeitos do EET sobre o peso de órgãos linfóides como o baço. Em paralelo, avaliamos a sobrevida de animais inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich e tratados com extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli*.

Figura 1. Aspecto morfológico da *Euphorbia tirucalli*.



2. OBJETIVOS

Foram objetivos desse trabalho, diante da importância da modulação hematopoética do hospedeiro na resposta antitumoral, utilizando um modelo de inoculação tumoral com células do tumor ascítico de Ehrlich, avaliar:

- os efeitos do extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli* sobre a hematopoese medular e extramedular, em animais portadores de tumor;
- A celularidade da medula e o estudo da sobrevivência destes animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS:

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/C machos, com idade entre 7 e 11 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Após obtenção, os animais foram divididos em grupos (6 animais por grupo) e submetidos ao tratamento, de acordo com o protocolo experimental utilizado, a saber:

- a) animais controle, sem tratamento;
- b) animais tratados com o extrato liofilizado de *Euphorbia tirucalli* (EET), nas doses de 125, 250 ou 500mg/Kg por 5 dias consecutivos, sendo o tratamento iniciado 24h após a inoculação tumoral;
- c) animais inoculados com TAE;
- d) animais inoculados com TAE e tratados com o EET, nas doses e protocolo descritos no item " b".

3.2. Obtenção do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE):

As células tumorais do TAE têm sido isoladas de camundongos machos BALB/c portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e mantidas através de passagens sucessivas intraperitoneais em animais da mesma linhagem utilizada para o experimento. Para este repasse, retira-se o líquido ascítico do peritônio de animais doadores, sendo o número e a viabilidade das células determinados, utilizando-se o corante azul de trypan, em câmara de Neubauer e inoculando-se estas células em uma concentração de 5×10^7 cél./animal.

Para o desenvolvimento do TAE, os camundongos dos grupos portadores de tumor, foram inoculados intraperitonealmente com 0,2 mL de uma suspensão contendo 6×10^6 células tumorais. Nesta concentração, o tumor implantou-se em 100% dos animais. Para obtermos esta suspensão, sacrificamos camundongos portadores do tumor, colhemos o líquido ascítico com uma seringa e diluímos o mesmo na proporção de 1:10 (em solução fisiológica estéril). A suspensão resultante foi novamente diluída na proporção de 1:10, em azul de trypan, para a realização da contagem das células em câmara de Neubauer, por microscopia óptica.

3.3. Obtenção da *Euphorbia tirucalli*:

A tintura da *Euphorbia tirucalli* foi cedida pela farmácia de manipulação do Prof. Valter R. Acorsi (Escola Agrícola Luíz de Queiróz - ESALQ - Piracicaba) e liofilizada pelo Centro de Química do Instituto de Tecnologia de alimentos (ITAL) - Campinas, por intermédio da Prof. Dra. Vera Baldini.

As tinturas vegetais são preparadas à temperatura ambiente, pela ação do álcool sobre a erva, tendo sido neste caso utilizado o processo de maceração, que requer uma longa imersão (TESKE & TRENTINI, 1997).

A tintura utilizada em nossos experimentos, foi preparada a uma concentração de 20% (200g de *E. tirucalli* - Avelóz, para 1000g de etanol a 70%), tendo sido utilizada a planta fresca (partes aéreas), fracionada em partes menores, imersa em solução hidroalcoólica a 70%, sendo necessário após o período de maceração, proceder a filtração da solução obtida.

3.4. Tratamento:

Os animais dos grupos inoculados com o TAE e tratados com o EET nas doses de 125, 250 ou 500mg/Kg, começaram a receber este tratamento após 24h da inoculação do tumor, tendo sido tratados por 5 dias consecutivos e sacrificados 24h após o último dia de tratamento. Já os grupos que só receberam o EET nas doses de 125, 250 ou 500mg/Kg, foram tratados por 5 dias consecutivos e sacrificados 24h após o último dia de tratamento.

Para administração do EET, utilizou-se a via oral pelo método de gavagem, sendo a água destilada o veículo de diluição do extrato. Os animais do grupo controle e do grupo somente portador de TAE, receberam apenas água destilada.

3.5. Procedimentos Experimentais:

3.5.1. Cultura clonal de precursores hematopoiéticos da Medula Óssea e Baço de Camundongos (CFU-C):

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que o número de células presentes seja ajustado, a fim de se evitar uma quantidade exagerada de colônias em

cada placa de Petri, com conseqüente superposição das mesmas. Também é importante que o fator estimulador de crescimento (CSF) seja utilizado em concentrações supramáximas. Além disso, a escolha do soro bovino fetal deve ser realizada cuidadosamente, devido a variações de atividade entre os vários lotes e marcas de soro (METCALF, 1984).

3.5.1.1. Técnica:

Após sacrificar o animal por deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool 70%. Expôs-se o fêmur, removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior. A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma). O baço foi removido assepticamente e colocado em tubo de ensaio estéril, contendo 5 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma). As células foram liberadas cuidadosamente, utilizando-se um macerador. Mais 4 ml de RPMI-1640 foram adicionados ao tubo de ensaio.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hemocitométrica, após diluição (1:10) das células, em Turkey 1% para células da medula e a concentração da suspensão celular ajustada para 1×10^5 células/ml. O mesmo procedimento foi realizado para as células de baço, porém a diluição feita foi de (1:20) em azul de tripan 1% e a concentração ajustada para 2×10^5 células/ml.

Preparou-se a suspensão para a incubação das células em cultura a qual consistia de:

- 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Sigma) 2x concentrado;
- 20% de soro bovino fetal (SBF);
- 50% de ágar (0,3%) (Bacto-ágar-Difco).

A seguir, adicionou-se ao meio descrito acima, o volume apropriado de células (1×10^5 células/ml para a medula óssea e 2×10^5 células/ml para o baço) e distribuiu-se um volume de 2 ml em cada placa de Petri (35 mm), já contendo 100 µl do fator estimulador (SCM), homogenizou-se a placa com movimentos giratórios permitindo uma maior distribuição por toda a superfície da placa de Petri. Deixou-se gelificar e incubou-se por 7 dias a 37 °C em presença de 5% de CO₂. Após este período contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecação, em aumento de 40x.

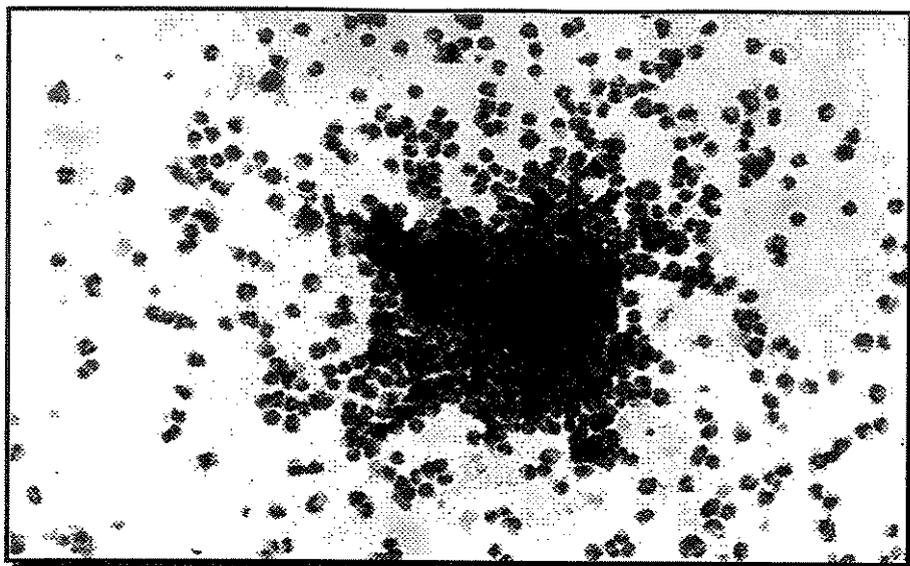


Figura 2. Aspecto microscópico de uma colônia de células precursoras hematopoiéticas da medula óssea de camundongo normal. Aumento de 250x.

3.6. Peso do baço dos animais submetidos aos referidos tratamentos:

Após remoção do baço (como descrito no item anterior), seu peso foi mensurado em gramas para posterior análise.

3.7. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM):

Baços de camundongos BALB/c foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril. Preparou-se uma suspensão com 2×10^6 células/ml em meio RPMI-1640 (Cultilab) contendo 10% de soro bovino fetal. Adicionou-se ao meio 5×10^{-5} moles/L de 2-mercaptoetanol e 1,65 $\mu\text{g/ml}$ de “pokeweed mitogen”. Incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO_2 no ar. A seguir, centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em membrana milipore (0,45 μm).

A atividade funcional do CSF foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas de animais normais em meio semi-sólido.

A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 forneceu resultados que estão dentro dos níveis de resposta supermáxima. Os resultados em duplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na tabela abaixo:

Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c:

DILUIÇÃO SCM	CFU-C x 10 ² *
1:1	109,2 ± 4,2
1:2	102 ± 3,5
1:4	105,6 ± 5,1
1:8	75,6 ± 4,2
1:16	57,6 ± 4,0
1:32	34,8 ± 3,0
1:64	7,2 ± 1,2
1:168	0

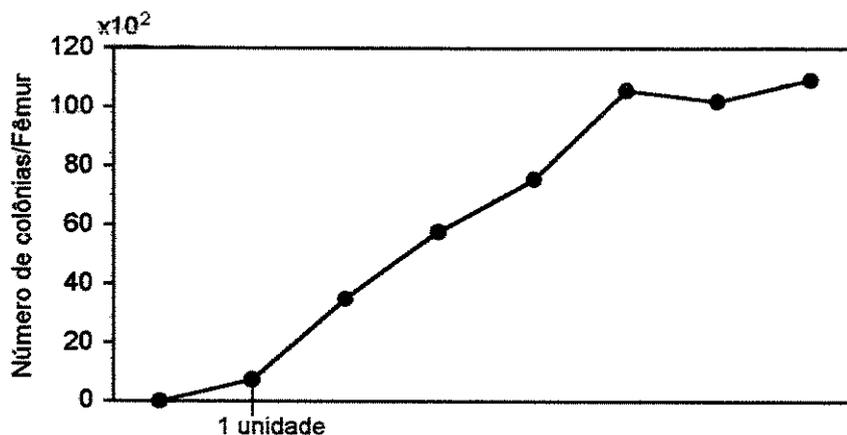
* Número total de células por fêmur

Resultados obtidos em duplicata por diluição.

3.8. Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias:

O sangue dos animais dos 8 grupos experimentais, foi obtido através de punção do plexo braquial, centrifugado para obtenção do soro, e este armazenado à -20°C. A produção dos fatores estimuladores de colônias do soro dos animais em questão, foi determinada através de sua capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais normais.

A determinação desta atividade estimuladora de colônias foi expressa em unidades por ml, conforme curva de titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM), ilustrada abaixo. De acordo com VAN DEN ENGH & BOL, (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de clones é considerado como 1 unidade de CSF/ml.



3.9. Contagem diferencial de células da medula óssea:

Após remoção da medula óssea (como descrito no item 5.1.1), as células de cada um dos animais dos grupos experimentais ($n = 6$), foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de meio RPMI-1640 (Cultilab) e 500 μ L desta suspensão foram transferidos para uma lâmina de citocentrifugação (800 rpm durante 5 minutos). As lâminas foram coradas com Leishman e a leitura foi realizada em objetiva de 100x.

3.10. Curva de Sobrevida:

Para o estudo dos efeitos do EET (125, 250 ou 500mg/Kg), na sobrevida dos animais inoculados com TAE (6×10^6 células /animal), realizou-se a curva de sobrevida. Os animais foram divididos em quatro grupos ($n=20$): Inoculados com TAE, Inoculados com TAE e tratados com 125,250 ou 500mg/Kg. O tratamento foi iniciado 24h após a inoculação tumoral e mantido por 5 dias consecutivos. Os animais foram observados diariamente para controle da mortalidade.

3.11. Análise estatística:

A Análise de Variância ANOVA foi utilizada para avaliar as diferenças entre CFU-C/fêmur, CFU-C/baço; fatores estimuladores de colônias; celularidade da medula óssea e peso dos baços (INSTAT). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Tukey que detecta diferenças significativas entre os grupos. Na avaliação da sobrevida dos animais portadores de TAE e tratados com EET, utilizamos o método de Kaplan-Maier, 1958 (COLLET, 1994) – (WINSTAT). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-Rank (procedimentos não paramétricos).

Em todos os grupos estudados, considerou-se estatisticamente significativos aqueles que possuíam $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1.- Efeitos do EET na sobrevida de animais inoculados com o TAE:

Podemos observar na figura 3, tabela 1 (apêndice), que o grupo de animais apenas inoculados com TAE, apresentou mortalidade de 100% até o vigésimo primeiro dia após a inoculação do tumor. Por outro lado, após o tratamento com as três doses do EET estudadas (125, 250 e 500mg/Kg), verificamos um aumento na sobrevida dos animais portadores do TAE. Para os grupos tratados com 125 ou 250 mg/Kg, há uma sobrevivência de 6 dias a mais (aproximadamente 21%) em relação ao tempo de sobrevida do grupo somente portador de TAE. Para o grupo tratado com a dose de 500 mg/Kg, esta sobrevivência é de 8 dias a mais, o que representa um aumento de aproximadamente 27% no tempo de sobrevida destes animais, quando comparado ao grupo controle. Esses resultados foram significativos em relação ao TAE ($p < 0,05$ - Curva de Kaplan-Maier, Log-Rank).

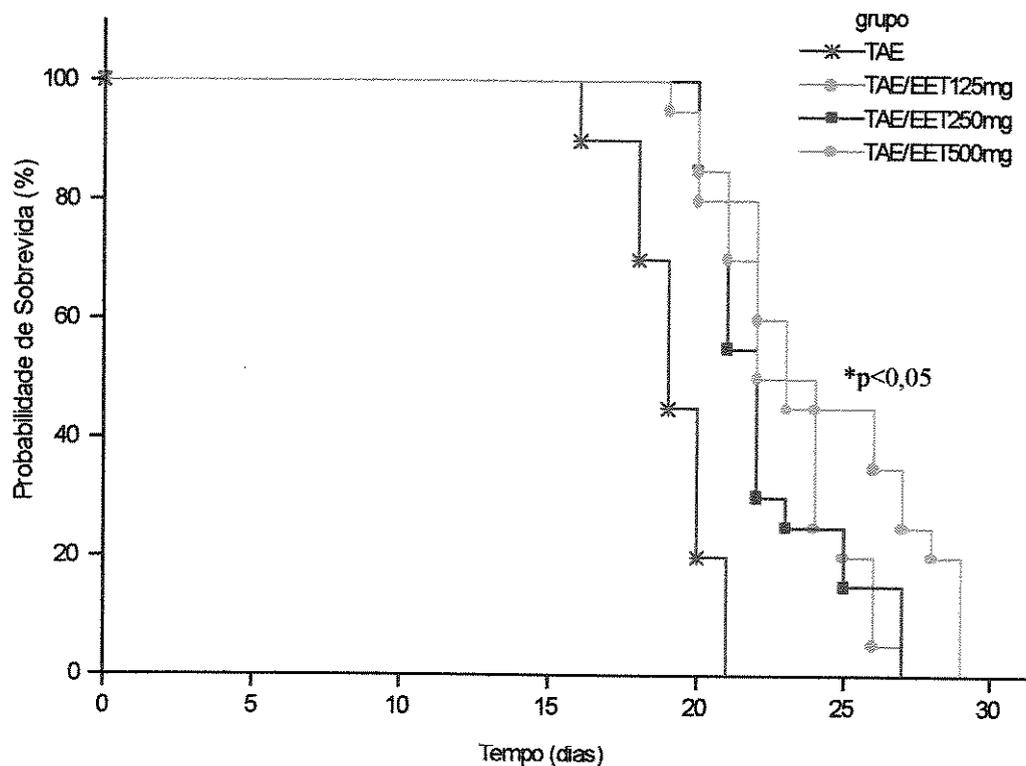


Figura 3. Efeito do tratamento com diferentes doses do EET, sobre a sobrevida de animais BALB-C inoculados com dose letal de células do TAE (6×10^6 células/animal). O tratamento foi realizado por via oral, tendo sido iniciado 24h após a inoculação do tumor, durante 5 dias consecutivos; (n=20, Curva de Kaplan-Maier, Log-Rank; *p<0,05 em relação ao grupo inoculado com TAE).

4.2.- Efeitos do extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli* (EET) sobre os precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço:

Os efeitos do tratamento com o extrato da *Euphorbia tirucalli*, 125, 250 e 500mg/kg, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea de camundongos estão representados na figura 4; tabela 2 (apêndice). A administração do extrato liofilizado da planta em animais normais nas diferentes doses não produziu alterações significativas no número de CFU-GM, quando comparado aos animais controle. Como já demonstrado anteriormente em nosso laboratório (JUSTO, DÚRAN, QUEIROZ, 2000; JUSTO, SILVA, QUEIROZ, 2001; MIRANDOLA, JUSTO, QUEIROZ, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2001a; QUEIROZ *et al.*, 2001b; VALADARES *et al.*, 1998; VALADARES & QUEIROZ, 2002), a evolução do TAE produz uma drástica redução no número de CFU-GM da medula óssea. Portanto, nossos resultados mais uma vez confirmam uma redução significativa no número de CFU-GM no 6^o dia de progressão tumoral, quando comparados aos do grupo controle ($P < 0,05$ - ANOVA, Tukey). Por outro lado, quando os animais foram tratados com 125, 250 ou 500mg/kg do extrato da planta, o número de CFU-GM atingiu valores próximos a aqueles encontrados no grupo controle, sendo esses resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo portador do TAE ($P < 0,05$ - ANOVA, Tukey).

Estudos realizados *in vitro*, utilizando o soro de animais portadores do TAE como estímulo para o crescimento de células da medula óssea de animais normais, levaram-nos a verificar que a presença do TAE induziu um aumento significativo nos níveis de fatores estimuladores de colônias (CSFs), quando comparado ao grupo controle normal ($P < 0,05$ -

ANOVA, Tukey). Para os animais apenas tratados com as três diferentes doses do EET, o soro utilizado como estímulo para o crescimento de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais normais, não induziu a formação de colônias de CFU-GM, não sendo esses resultados significativos. Tais dados estão demonstrados na tabela 10 (apêndice).

Os resultados da avaliação da hematopoese extramedular (esplênica) estão representados na figura 5; tabela 3 (apêndice). Nos animais normais, tratados com as três doses do EET, não observamos alterações significativas no número de CFU-GM no baço, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, verificamos nos animais inoculados com o TAE um aumento de aproximadamente 13 vezes no número de CFU-GM, valor este, extremamente significativo quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$ - ANOVA, Tukey).

Por outro lado, os animais portadores do TAE, que receberam tratamento com as três diferentes doses do EET, apresentaram uma redução significativa do número de CFU-GM no baço ($P < 0,05$ - ANOVA, Tukey). Nestes animais, embora os valores encontrados não tenham atingido os níveis do grupo controle, verificamos redução no número de CFU-GM de aproximadamente 2, 3 e 3,5 vezes, nas doses de 125, 250 e 500mg/Kg, respectivamente, quando comparado ao grupo somente inoculado com o TAE.

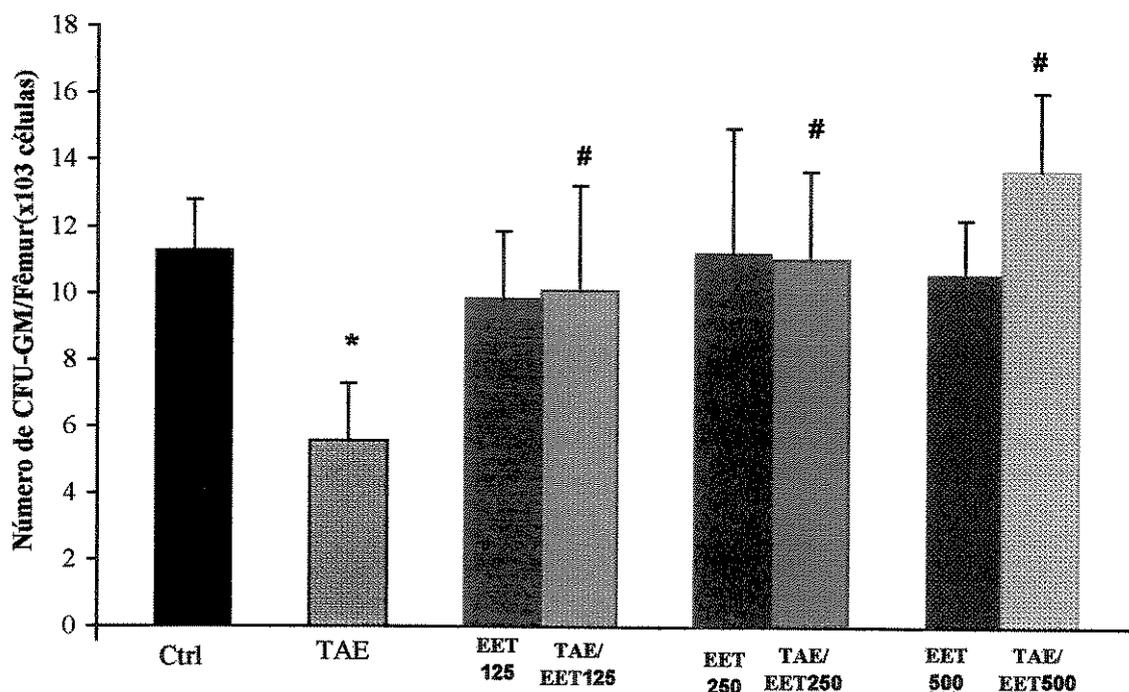


Figura 4. Número de unidades formadoras de colônias de granulócito/macrófago (CFU-GM) na medula óssea de camundongos Balb/c tratados durante 5 dias consecutivos com 125, 250 e 500 mg/Kg/dia de EET (tintura de Avelóz liofilizada). O TAE (6×10^6 células/animal) foi inoculado 24 horas antes do início do tratamento. Os animais foram sacrificados 24 horas após a última administração de EET. Teste ANOVA-TUKEY, $P < 0,05$; $n = 6$.

Ctrl = Controle; TAE = Tumor; EET = Tratado com extrato de *E. tirucalli*; TAE/EET = Tumor Tratado com extrato de *E. tirucalli*.

* - redução significativa em relação ao controle ($p < 0,05$)

- aumento significativo em relação ao tumor ($p < 0,05$)

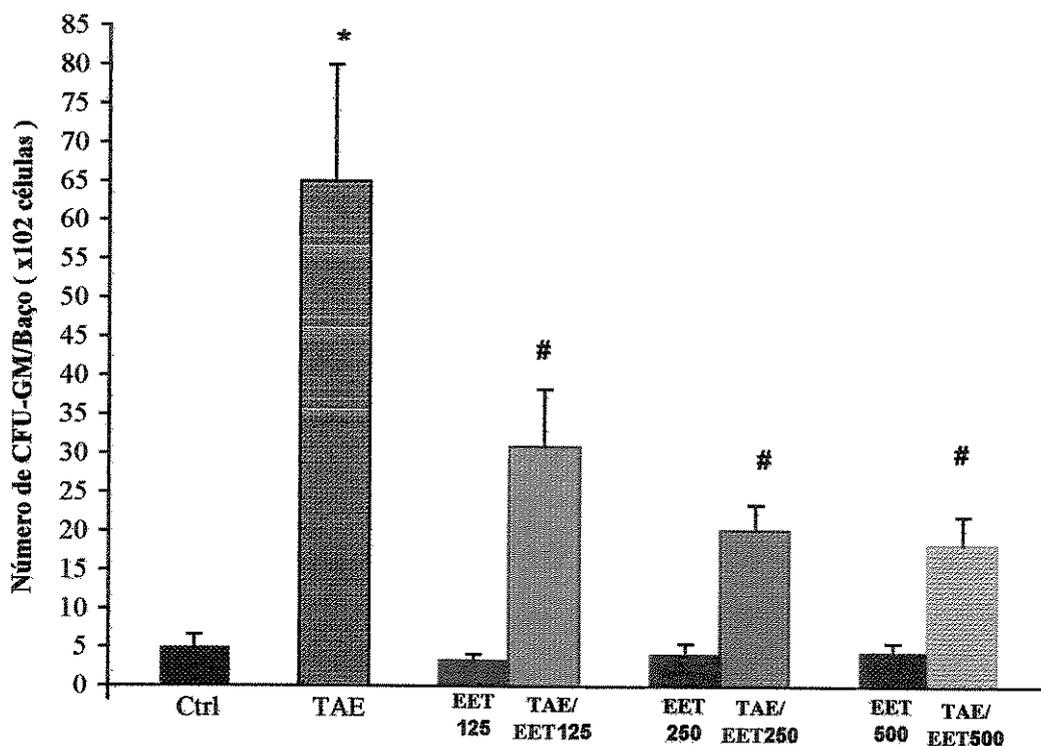


Figura 5. Número de unidades formadoras de colônias granulócito/macrófago (CFU-GM) no baço de camundongos Balb/c tratados durante 5 dias consecutivos com 125, 250 e 500 mg/Kg/dia de EET (tintura de Avelóz liofilizada). O TAE (6×10^6 células/animal) foi inoculado 24 horas antes do início do tratamento. Os animais foram sacrificados 24 horas após a última administração de EET. Teste ANOVA-TUKEY, $P < 0,05$; $n = 6$.

Ctrl = Controle; TAE = Tumor; EET= Tratado com extrato de *E. tirucalli*; TAE/EET= Tumor Tratado com extrato de *E. tirucalli*.

* - aumento significativo em relação ao controle ($p < 0,05$)

- redução significativa em relação ao tumor ($p < 0,05$)

4.3.- Peso do baço:

Os resultados obtidos na avaliação do peso do baço dos animais estão apresentados na figura 6; tabela 4 (apêndice). Neste estudo, verificamos que a progressão tumoral induz uma acentuada esplenomegalia, com aumento no peso do baço de aproximadamente 70% em relação ao grupo controle. Porém, o tratamento destes animais portadores de TAE com o EET, nas doses 125, 250 ou 500mg/kg, produziu uma redução significativa no peso desse órgão de aproximadamente 14%, 35% e 49% respectivamente, quando comparado ao grupo somente inoculado com TAE ($P < 0,05$ - ANOVA, teste Tukey). Para os animais somente tratados com EET, não foram observadas alterações em relação ao grupo controle.

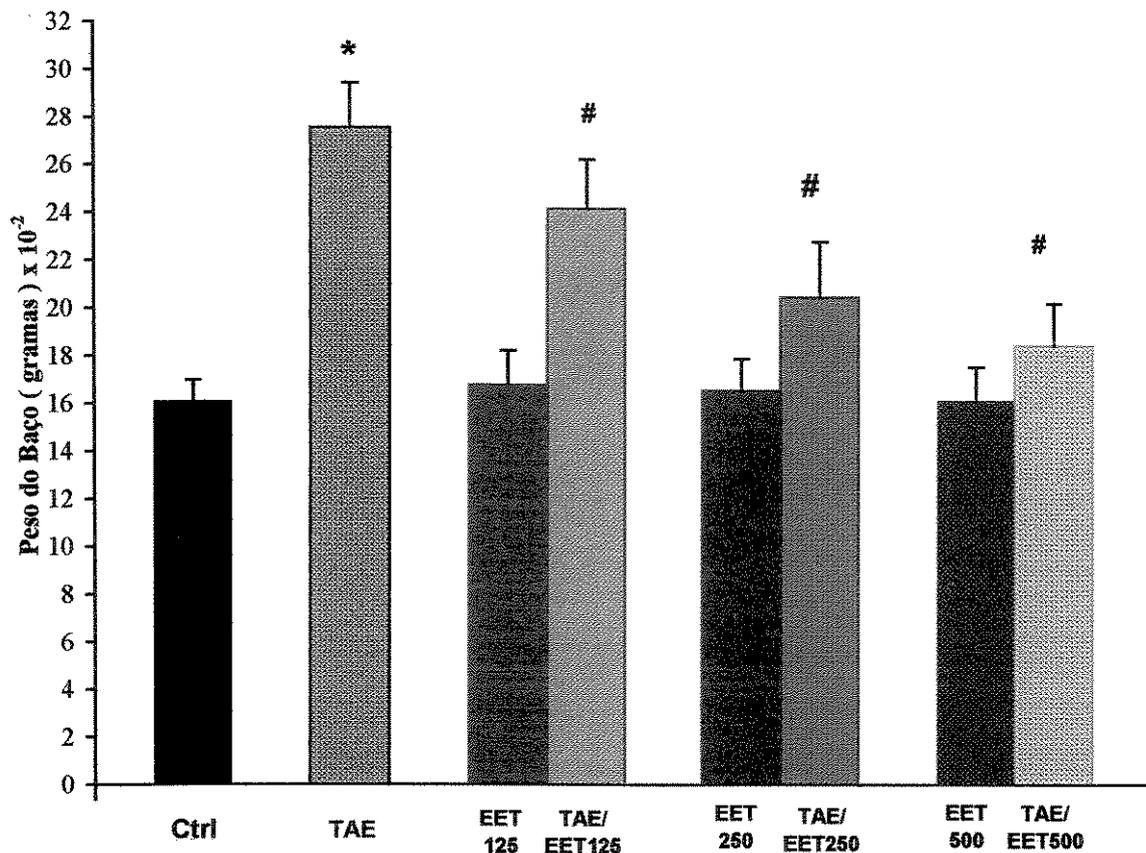


Figura 6. Peso do Baço (gramas) de camundongos Balb/c tratados durante 5 dias consecutivos com 125, 250 e 500 mg/Kg/dia de EET (tintura de Avelóz liofilizada). O TAE (6×10^6 células/animal) foi inoculado 24 horas antes do início do tratamento. Os animais foram sacrificados 24 horas após a última administração de EET. Teste ANOVA-TUKEY, $P < 0,05$; $n = 6$.

Ctrl = Controle; TAE = Tumor; EET = Tratado com extrato de *E. tirucalli*; TAE/EET = Tumor Tratado com extrato de *E. tirucalli*.

* - aumento significativo em relação ao controle ($p < 0,05$)

- redução significativa em relação ao tumor ($p < 0,05$)

4.4.- Efeitos do EET sobre a contagem diferencial de células da medula óssea:

Os resultados obtidos na contagem de mieloblastos, promielócitos/mielócitos, neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos, estão apresentados na tabela 9.

Na avaliação da celularidade total, podemos observar que o tratamento com o EET, nas três diferentes doses avaliadas, não produziu nenhuma alteração significativa nestes grupos, quando comparado ao grupo controle. No entanto, uma redução significativa na celularidade total da medula óssea é observada quando comparamos o grupo portador de TAE ao grupo controle ($P < 0,05$ - ANOVA, Teste de Tukey) (VALADARES & QUEIROZ, 2002). Para os animais portadores do TAE e tratados com EET nas doses de 125 ou 250mg/Kg, nenhuma alteração significativa foi observada; porém, para os animais portadores de TAE e tratados com a dose de 500 mg/Kg, constatamos um aumento significativo ($P < 0,05$ - ANOVA, Teste de Tukey), quando comparamos ao grupo portador de TAE.

Ao avaliarmos separadamente cada um dos tipos celulares, as seguintes alterações foram observadas: para os animais portadores do tumor e tratados com a dose de 500mg/kg, observamos um aumento significativo no número de mieloblastos ($P < 0,05$ - ANOVA, Teste de Tukey), quando comparado com o grupo somente portador de TAE e com o grupo controle. Este aumento é ainda significativo em relação aos grupos portadores de TAE e tratados com as doses de 125 ou 250mg/kg ($P < 0,05$ - ANOVA, Teste de Tukey). As doses de 125 e 250mg/Kg não produziram efeito significativo, estando os valores encontrados muito próximos daqueles encontrados para o grupo somente portador de TAE.

Em relação aos mielócitos/promielócitos, verificamos uma redução significativa no número dessas células ($P < 0,05$ - ANOVA, Teste de Tukey) para o grupo dos animais

portadores do tumor, assim como para os animais somente tratados com as doses de 250 ou 500 mg/kg do EET, quando comparados ao grupo controle. Os animais portadores do TAE e tratados com EET na dose de 500 mg/Kg sofreram uma redução no número dessas células quando comparado ao grupo somente portador do TAE, porém este valor não é significativo.

Quanto aos metamielócitos/neutrófilos (PMN), um aumento significativo ($P < 0,05$ - ANOVA, Teste de Tukey) no número dessas células foi observado nos animais inoculados com TAE e tratados com as três diferentes doses de EET, quando comparados os resultados aos do grupo de animais somente portadores do TAE.

No caso dos linfócitos, verificamos uma redução significativa ($P < 0,05$ - ANOVA, Teste de Tukey) no número dessas células nos animais portadores do TAE. Por outro lado, nos animais portadores/tratados com 500 mg/kg verificamos uma recuperação significativa ($P < 0,05$ - ANOVA, Teste de Tukey), quando comparados os resultados aos do grupo dos animais portadores do TAE, embora esse aumento não tenha atingido os valores encontrados para os animais controle. Para essa mesma dose, observamos também um aumento significativo em relação aos grupos portadores de TAE e tratados com as doses de 125 ou 250mg/kg ($P < 0,05$ - ANOVA, Teste de Tukey).

Pode-se observar que, para os animais portadores do TAE/tratados, a dose de 500mg/Kg sinaliza a melhor resposta entre as três doses trabalhadas, o que demonstra coerência com os dados obtidos na sobrevivência.

CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA

GRUPOS	CONTROLE	TAE	EET (Dose mg/kg)			TAE + EET (Dose mg/kg)			
			125	250	500	125	250	500	
TIPOS CELULARES	cél. x 10 ⁵								
MIELOBLASTOS	\bar{X}	3.53	2.55	4.11	4.40	4.54	3.54	2.94	@ & # 6.55
	DP	0.72	0.58	1.14	0.40	1.51	0.77	0.64	0.84
MIELOCITOS/ PROMIELOCITOS	\bar{X}	24.30	@ 9.15	18.21	@ 16.24	@ 11.98	7.35	7.86	5.80
	DP	7.45	2.16	4.23	2.13	2.65	0.81	0.87	1.18
METAMIELOCI- TOS/PMN	\bar{X}	69.19	50.25	77.20	71.66	66.88	& 80.80	& 75.18	& 82.21
	DP	9.79	8.16	16.83	5.65	5.11	5.15	8.70	11.21
LINFÓCITOS	\bar{X}	22.99	@ 3.05	17.98	17.70	24.11	3.31	4.03	& # 10.44
	DP	2.96	0.50	4.70	3.86	5.55	0.46	1.20	0.83
Número Total de Células	\bar{X}	120.00	@ 65.00	117.50	110.00	107.50	95.00	90.00	& 105.00
	DP	17.32	10.00	25.98	10.00	8.66	4.08	10.00	13.54

Tabela 9. (síntese das tabelas 5, 6, 7 e 8 do apêndice) - Estudo da contagem diferencial de células da medula óssea de camundongos BALB-c portadores do tumor ascítico de Ehrlich (6x10⁶ cel./animal - i.p.) e tratados durante 5 dias com diferentes doses de EET, administradas oralmente. O tratamento iniciou-se 24h após a inoculação do tumor e os animais foram sacrificados 24h após a última administração do EET.

& significativo em relação ao TAE

significativo em relação aos grupos portadores de TAE e tratados (125 e 250mg/kg)

@ significativo em relação ao grupo controle.

5. DISCUSSÃO

O sistema hematopoético é constituído basicamente de três populações de células: as pluripotentes, as progenitoras comprometidas com uma determinada linhagem, além daquelas em maturação. As duas últimas podem ser consideradas como população em trânsito, em constante multiplicação e diferenciação, sendo originárias das células pluripotentes. As células pluripotentes possuem duas características distintas das demais células hematopoéticas: a primeira delas é a sua capacidade de auto-renovação; a segunda, o seu potencial para sofrer diferenciação na presença de fatores de crescimento específicos (CSFs) e produzir diferentes tipos celulares, tais como eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, os quais constituem as células maduras do sistema hematopoético, incluindo as famílias das principais células envolvidas nas reações imunológicas (ALBERTS *et al.*, 1997; QUEIROZ, 1988 METCALF, 1984).

Tendo em vista a participação dessas células hematopoéticas na resposta à progressão temporal do tumor, avaliamos neste trabalho os efeitos do tratamento com diferentes doses do EET (125, 250 ou 500 mg/kg) sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço para a série de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), a celularidade da medula óssea, a atividade estimuladora de colônias no soro e a sobrevida no modelo experimental do Tumor ascítico de Ehrlich.

Nossos resultados com a *Euphorbia tirucalli* demonstraram um aumento significativo dose-dependente na sobrevida dos animais portadores do TAE, tratados com as doses de 125, 250 ou 500 mg/kg do EET. Em paralelo ao aumento da sobrevida, o tratamento com EET produziu reversão da mielossupressão, efeito esse induzido pelo desenvolvimento do TAE, que como vimos em trabalhos anteriores do nosso laboratório e

outros, leva a uma redução drástica no número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea do hospedeiro, o que também foi constatado neste trabalho.

Estudos na literatura sugerem que a evolução tumoral induz à produção de fatores inibidores capazes de afetar a proliferação e diferenciação de células pluripotenciais da medula óssea. A esse respeito, podemos citar que produtos como prostaglandina E₂ (PGE₂), fator de crescimento tumoral (TGF- β) e fator estimulador de crescimento para granulócitos e macrófagos (GM-CSF), produzidos por macrófagos e pela próprias células tumorais, seriam responsáveis por redirecionar a atividade de macrófagos, produzindo um desequilíbrio nos mecanismos homeostáticos reguladores da mielopoese. Isto demonstra coerência nos resultados obtidos em nossa pesquisa, pois eles indicam um possível envolvimento desses fatores solúveis produzidos pelas células tumorais, ou interação tumor-hospedeiro nos mecanismos homeostáticos da medula óssea, promovendo um redirecionamento da atividade de macrófagos que estão envolvidos no processo de inibição do crescimento do tumor (PESSINA *et al.*, 1982b; YUONG & WRIGHT, 1992; HARDY & BALDUCCI, 1985; FECCHIO *et al.*, 1990a; FECCHIO *et al.*, 1990b; BONTA & BEM-EFRAIM, 1993; SEGURA, BARBERO, MÁRQUE, 1997; MORALES, VÉLEZ, SUBIZA, 1999). Além disso, com a evolução da doença, o tumor induz os macrófagos a suprimirem a função celular de linfócitos e células NK, através da produção destas substâncias proinflamatórias, citocinas citotóxicas e outros fatores (ELGERT, ALLEVA, MULLINS, 1998).

Em contraste com a medula óssea, a hematopoese periférica, que foi avaliada através do número de precursores hematopoéticos no baço em animais portadores de TAE, apresentou-se aumentada significativamente em relação ao grupo controle. Por outro lado,

nos animais portadores de tumor e tratados com EET observou-se uma redução do número desses precursores, nas três doses utilizadas, quando comparado ao grupo somente portador do TAE. Embora tenha ocorrido essa redução no número de CFU-GM no baço, a hematopoese esplênica não chegou a atingir os valores do grupo controle. Para os animais normais que receberam somente o tratamento com o EET nas três diferentes doses, nenhuma alteração no número dos precursores hematopoéticos foi observada. Paralelamente a esses dados, um outro aspecto importante detectado foi uma redução na esplenomegalia desenvolvida pelo tumor, após o tratamento com as três doses avaliadas.

Estudos demonstram que um dos aspectos importantes na progressão tumoral é a agressividade de fatores derivados das células tumorais, as quais estimulam a proliferação de macrófagos com atividade supressora (KEEB & LALA, 1978; PESSINA *et al.*, 1982b; HARDY & BALDUCCI, 1985; BONTA & BEM-EFRAIM, 1993; YAMAMOTO *et al.*, 1995). As células do TAE produzem fatores capazes de induzir a proliferação de células esplênicas com alterações fenotípicas e funcionais (TOMIDA, YAMAMOTO-YAMAGUCHI, HOZUMI, 1984; MORALES, VÉLEZ, SUBIZA, 1999). Esses dados encontrados na literatura podem contribuir para a explicação do aumento no número de CFU-GM no baço de animais inoculados com o TAE, o que foi observado neste trabalho.

FECCHIO *et al.* (1990a), mostraram que a liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂), induzida pelo TAE, provoca uma inibição do influxo inflamatório e das funções dos macrófagos, levando à imunossupressão. O aumento da produção de PGE₂ pelos macrófagos seria responsável também pela inibição da proliferação de células T e pelo bloqueio da ação estimuladora do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) nos macrófagos (ALLEVA, BURGER, ELGERT, 1993; YOUNG & HOWVER, 1986). Também foi

demonstrado que PGE₂ favorece a secreção de citocinas do tipos Th2, IL-4, IL-10 e IL-5 pela inibição das citocinas associadas à subsérie Th1, IL-2 e IFN- γ (BETZ & FOX, 1991; HILKENS *et al.*, 1995), uma vez que células do tipo Th1 promovem a ativação dos macrófagos por produzirem IFN- γ (ELGERT, ALLEVA, MULLINS, 1998). Um processo similar foi descrito para citocinas como TGF- β e IL-6, produzidas principalmente por células tumorais, provocando um declínio na produção de INF- γ e TNF- α pelos macrófagos (YAMAMOTO *et al.*, 1995; EGERT, ALLEVA, MULLINS, 1998). SEGURA, BARBERO, MÁRQUEZ, (1997), mostram a presença de TGF- β nas células produzidas pelo TAE, bem como no fluido ascítico de animais inoculados com TAE.

Mecanismos imunológicos como ativação de macrófagos, células “Natural Killer” (NK) e células T, participam da resposta antitumoral e são primordiais para inibir o crescimento do tumor. A reação inflamatória iniciada pela presença das células tumorais no organismo tem grande importância na evolução do crescimento tumoral, sendo que a presença de polimorfonucleares na cavidade peritoneal é um resultado de estímulos inflamatórios locais, provocando alterações nos padrões de migração celular e de exsudação, bem como a estimulação e ativação de macrófagos inflamatórios, induzidas pelo tumor (FECCHIO *et al.*, 1990a; MANTOVANI *et al.*, 1992).

Como mencionado anteriormente, tem sido documentado na literatura a presença de vários componentes bioativos isolados e identificados na espécie *Euphorbia tirucalli*, bem como nas demais espécies do gênero *Euphorbiaceae*. Dentre os componentes que apresentam propriedades farmacológicas, alguns são comuns às diversas espécies, ou apresentam semelhanças químicas entre os compostos (KUPCHAN *et al.*, 1976; FURSTEMBERGER & HECKER, 1977, 1985, 1986; BRITO, 1981; DUKE, 1988;

ITOKAWA *et al.*, 1989; MATSUMOTO, CYONG, YAMADA, 1992; MARCO, CERVERA, YUSTE, 1997; FATOPE *et al.*, 1996; IMAI *et al.*, 1994).

Dados da literatura, avaliando as propriedades farmacológicas dos componentes bioativos da *Euphorbia tirucalli*, verificaram uma ação antagonista desta planta sobre o PGE₂, o que poderia, pelo menos em parte, explicar nossos resultados obtidos no modelo tumoral de Ehrlich, uma vez que, a PGE₂ possui um papel fundamental na progressão tumoral (BRITO, 1981; RAVIKANTH *et al.*, 2001).

Um outro aspecto importante, referente às propriedades farmacológicas das euphorbiaceae, é um aumento na expressão dos receptores Fc para gama-globulina, os quais atuam diretamente sobre a atividade funcional dos macrófagos (MATSUMOTO, CYONG, YAMADA, 1992). Os receptores para a porção Fc das imunoglobulinas, presentes nos neutrófilos, macrófagos e outros fagócitos mononucleares, facilitam o reconhecimento do antígeno, potencializando a eficiência da fagocitose (ABBAS *et al.*, 2000).

Diante do exposto, podemos sugerir que a proteção contra a mielossupressão, induzida pelo tumor, observada após o tratamento com o EET nas doses de 125, 250 ou 500mg/Kg, disponibiliza um maior número de células funcionais, o que favorece um maior influxo inflamatório para a cavidade intraperitoneal .

Ao avaliarmos a celularidade da medula óssea, observamos que, nos animais portadores do TAE, ocorre uma redução no número de células totais e das diferentes linhagens, em relação aos animais controle, sendo essa redução significativa apenas para promielócitos/mielócitos e linfócitos. Em contrapartida, observou-se que, nos animais inoculados com TAE, e tratados com a dose de 500 mg/Kg, dose essa na qual se observa

uma maior sobrevida, ocorre um aumento significativo no número de linfócitos, mieloblastos, promielócitos/mielócitos e metamielócitos/PMN, quando comparados os resultados aos do grupo de animais apenas inoculados com o TAE.

A esse respeito, JARMELO *et al.* (2000), após realização de testes de toxicidade aguda e subcrônica com o látex da *Euphorbia tirucalli*, constataram que a planta induz a um aumento significativo de linfócitos no sangue periférico, em ratos Wistar, fêmeas, quando comparados ao do grupo controle. Para a linhagem celular linfocítica, nos animais somente tratados com as doses de 125, 250 ou 500 mg/Kg, não observamos diferenças significativas quando comparados aos animais do grupo controle.

Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a administração do extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli* possui atividade moduladora sobre a resposta hematopoética, aumentando o número de precursores hematopoéticos da medula óssea durante o processo de instalação tumoral. Faz-se necessário ressaltar que outros estudos deverão ser realizados, para uma melhor elucidação dos mecanismos pelos quais o EET leva ao aumento do tempo de sobrevida dos animais tratados.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo avaliando os precursores hematopoéticos da medula óssea e baço de animais portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e tratados com o extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli* (EET), demonstrou:

- Aumento na sobrevida de animais inoculados com TAE;
- reversão da mielossupressão induzida pelo TAE, provavelmente por um mecanismo de proteção contra a implantação do tumor;
- prevenção parcial da hematopoese extramedular nos animais inoculados com TAE;
- redução na esplenomegalia induzida pelo TAE;
- aumento da celularidade para a dose de 500 mg/Kg, o que sinaliza coerência com os dados obtidos na sobrevida.

7. SUMMARY

In this work, we have investigated the effects of the lyophilized extract of the *Euphorbia tirucalli* (TEE), on the growth and differentiation of hematopoietic progenitors for granulocyte/macrophage (CFU-GM) in the bone marrow and spleen of Ehrlich ascites tumor-bearing mice (EAT). Male Balb/c mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 6×10^6 viable tumor cells/mouse and 125, 250 or 500mg/Kg of TEE were given orally for 5 consecutive days. The bone marrow and spleen progenitor cells were collected 24 hours after the last dose of TEE. After that we studied the growth and differentiation of colony forming unit (CFU-GM), through the technique of clonal culture of hematopoietic cells in semi-solid medium.

In tumor bearing-mice, the total number of CFU-GM per femur was significantly reduced whereas in the spleen the number of CFU-GM was dramatically increased. The treatment of these animals with three doses of TEE reverted the medullar suppression and reduced the increased extramedullar hematopoiesis, which was induced by the tumor. The values found for the animals that were treated with three different doses of TEE only, stayed near the rates of normal animals.

The survival rate of the animals was evaluated for 29 days after inoculation of EAT. We verified that treating these animals with three doses of TEE, extended significantly their survival rate from 21 to 27 and 29 days, depending the dose of TEE that was used.

The results demonstrated that treatment with TEE produced protective effects on the myelopoietic response of tumor-bearing mice. In conclusion, we suggested that an antagonistic effect against PGE_2 might be one of the action mechanism.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; ANDREW, H. L.; JORDAN, S.P. – Anticorpos e Antígenos. In: _____ - Imunologia Celular & Molecular. Rio de Janeiro, REVINTER, 2000. p.37-65.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. – Células Diferenciadas e a Manutenção dos Tecidos. In: _____ - Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997. p.1139-1193.
- ALLEVA, D. G.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. – Interferon- γ reduces tumor-induced Ia macrophage-mediated suppression – Role of prostaglandin E₂ Ia, and TNF- α . **Immunopharmacol.**, **25**: 215-227, 1993.
- BALDUCCI, L. & HARDY, C. L. – High proliferation of early hemopoietic progenitors in tumor-bearing mice. **Pathobiol.**, **60**: 68-71, 1992.
- BETZ, M. & FOX, B. S. – Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **J Immunol**, **146**: 108-113, 1991.
- BONTA, I. L. & BEN-EFRAIM, S. – Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity. **J Leukoc Biol**, **54**: 613-626, 1993.
- BRITO, A.R.M.S.; **Ação Inibitória da *Euphorbia tirucalli* L. no Processo Inflamatório.** 1981. 122f. Tese (Mestrado em Produtos Naturais) – Faculdade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

- CLERICI, E.; MOCARRELLI, P.; VILLA, M. L.; NATALE, N. – Influence of Ehrlich ascites carcinoma and repopulating ability of mouse bone marrow cells. **J Natl Cancer Inst**, **47**: 555-560, 1971.
- COLLET, D. – Modeling survival data in medical research. In: _____ - **Texts in Statistical Science**. London, Chapman & Hall, 1994, p. 1-13.
- DELMONTE, L.; LIEBELT, A.; LIEBELT, R. – Granulopoiesis and trombopoiesis in mice bearing transplanted mammary cancer. **Cancer Res**, **26**: 149-159, 1966.
- DUKE, J.A.; **Handbook of Medicinal Herbs**. – Florida: CRC Press, 1988. p.191-192.
- EHRlich, P. & APOLANT, T. – Beobachtungen wiber maligne mausetumoren. **Berliner Klunisch Wochenschrift**, **28**: 871-874, 1905.
- ELGERT, D. K.; ALLEVA, D. G.; MULLINS, D. W. – Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **J Leukoc Biol**, **64**: 275-290, 1998.
- FATOPE, M.O.; ZENG, L.; OHAYAGA, J.E.; SHI, C.; McLAUGHLIN, J.L. - Selectively cytotoxic diterpenes from *Euphorbia poissonii*. **J Med Chem**, **39**: 1005-1008, 1996.
- FECCHIO, D.; RUSSO, M.; SIROIER, P.; BRAQUER, P.; JANCAR, S. – Inhibition of Ehrlich ascites tumor *in vitro* by PAF antagonists. **Int J Immunopharmacol**, **12**: 57-65, 1990b.

- FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. – Studies on inflammatory response induced by Ehrlich Tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, **14**: 125-132, 1990a.
- FRANCO, L.L.; **AS Sensacionais 50 Plantas Mediciniais Campeãs de Poder Curativo**. – volume I - Curitiba: O Naturista, 1996. p.70-71.
- FURSTENBERGER, G.; HECKER, E. – The new diterpene 4-deoxyphorbol and its highly unsaturated irritant diesters. **Tetrahedron Lett.** **11**: 925-928, 1977.
- FURSTENBERGER, G.; HECKER, E. – On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). XI. The irritant and tumor promoting diterpene esters of *Euphorbia tirucalli* L. originating from South Africa. **Z Naturforsch** **40**: 631-646, 1985.
- FURSTENBERGER, G.; HECKER, E. – On the active principles of the Euphorbiaceae, XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from *Euphorbia tirucalli* originating from Madagascar. **J. Nat. Prod.** **49**: 386-397, 1986.
- GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, J.E.; PAMPLONA, S.S.R.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. – Anti-tumor activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, *trans*-dehydrocrotonin and *trans*-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Med.** **65**: 687-689, 1999.
- HARDY, C. L. & BALDUCCL, L. – Review: Hemopoietic alterations in cancer. **Am J Med Sci**, **290**: 196-205, 1985.

- HILKENS, C. M. U.; VERMCULEN, H.; JOOST-VAN-NEERVEN, R. J.; SINIJDENWINT, F. G. M.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. – Differentiation of T helper type 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E₂ critically depends on interleukin-2. **Eur J Immunol**, **25**: 59-63, 1995.
- IMAI, S.; SIGIURA, M.; MIZUNO, F.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K.; CHIBA, S.; OSATO, T. – African Burkitt's lymphoma: a plant, *Euphorbia tirucalli*, reduces Epstein-Barr virus-specific cellular immunity. **Anticancer Res.** **14**: 933-936, 1994.
- ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; WATANABE, K.; TAKEYA, K. - An antitumor principle from *Euphorbia lathyris*. **Planta Med**, **55**: 271-272, 1989.
- JARMELO, B. A.; RODRIGUES, D. S.; SANTORO, D. M.; NETO, J. J.; WADT, S. Y. W. – Atividade Toxicológica do Látex de *Euphorbia tirucalli* L. **Revista Brasileira de Toxicologia**, **1**: p.87, 2000. Suplemento.
- JUSTO, G. Z.; DÚRAN, N.; QUEIROZ, M. L. S. – Myelopoietic response in tumour-bearing mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Eur J Pharmacol**, **388**: 219-226, 2000.
- JUSTO, G. Z.; SILVA, M. R.; QUEIROZ, M. L. S. – Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, **23**: 119-132, 2001.

KAZANIETZ, M.G.; CALOCA, J.M.; EROLES, P.; FUJII, T.; GARCÍA-BERMEJO, M.L.; REILLY, M.; WANG, H. – Pharmacology of the receptors for the phorbol ester tumor promoters. **Biochemical Pharmacology**, **60**: 1417-1424, 2000.

KEEB, G. & LALA, P. K. – Effect of Ehrlich ascites tumour transplantation in mice on the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies in vitro. **Eur J Cancer**, **14**: 331-342, 1978.

KIELLAND, I. S.; DORNISH, J.M.; MALTERUD, K.E.; HVISTENDAHL, G.; ROMMING, C.; BOCKMAN, O. C.; KOLSAKER, P.; STENSTROM, Y.; NORDAL, A. - Citotoxic triterpenoids from the leaves of *Euphorbia pulcherrima*. **Planta Med**, **62**: 322-325, 1996.

KUPCHAN, S.M.; UCHIDA I.; BRANFMAN, A.R.; DAILEY, R.G. Jr.; FELB, Y. - Antileukemic principles isolated from euphorbiaceae plants. **Science**, **191**: 571-572, 1976.

LALA, P. K.; PARHAR, R. S.; SINGH, P.; LALA, P. K. – Cure of murine Ehrlich ascites tumors with chronic oral indomethacin therapy combined with intraperitoneal administration of LAK cells and IL-2. **Cancer Lett**, **51**: 27-35, 1990.

LALA, P. K.; TERRIN, M.; LIND, C.; KAIZER, L. – Hematopoietic redistribution in tumor-bearing mice. **Exp Hematol**, **6**: 283-298, 1977.

LUO, J. C.; YAMAGUCHI, S.; SHINKAI, A.; SHITARA, K.; SHIBUYA, M. – Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. **Cancer Res**, **58**: 2652-2660, 1998.

- MANTOVANI, A.; BOTAZZI, B.; COLOTTI, F.; SOZZANI, S.; RUCO, L. – The original and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today**, **13**: 265-70, 1992.
- MARCO, A.J.; CERVERA, J.F.S.; YUSTE, A. – Ingenane and Lathyrane Diterpenes from latex of *Euphorbia canariensis*. **Phytochemistry** **45**: 563-570, 1997.
- MATSUMOTO, T.; CYONG, J.C.; YAMADA, H. - Stimulatory effects of ingenols from *Euphorbia kansui* on the expression of macrophage Fc receptor. **Planta Med**, **58**: 255-258, 1992.
- METCALF, D. – **Clonal culture of hemopoietic cells: techniques and applications**. New York, Elsevier, 1984. P 167.
- MIRANDOLA, L.; JUSTO, G.Z.; QUEIROZ, M.L.S. – Modulation by *Acanthospermum australe* extracts of tumor induced hematopoietic changes in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, **24**: 275-288, 2002.
- PARHAR, R. S. & LALA, P. K. – Prostaglandin E₂ – mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. **J Leukoc Biol**, **44**: 185-190, 1988.
- PELUS, L. M.; BROXMEYER, H. E.; KURLAND, J. I.; MOORE, M. A. S. – Regulation of macrophage and granulocyte proliferation. **J. Exp. Méd.**, **150**: 277-285, 1979.

- PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; BELLA, S.; MAOCARELLI, P. – CFU-S and CFU-C proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich ascitic fluid. **Oncology**, **39**: 391-395, 1982a.
- PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; BELLA, S.; MAROCCHI, A.; MAOCARELLI, P. – Factors produced by macrophages and tumour cells: influence on the granulocytic precursor cells (CFU-C) in normal and tumour bearing mice. **J Cancer Res Clin Oncol**, **102**: 235-244, 1982b.
- PEZZUTO, J.M. – Plant-Derived Anticancer Agents. **Biochemical Pharmacology**, **53**: 121-133, 1997.
- QUEIROZ, M.L.S.- Células pluripotenciais hematopoiéticas em cultura – revisão bibliográfica, **Ciência e Cultura**, **40**: 421, 1988.
- QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA DA SILVA, F. R.; MULLER, A. H. – Adjuvant effect of *Pluchea quitoc* extract on the resistance of tumor-bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, **23**: 215-228, 2001a.
- QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA DA SILVA, F. R. – Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, **23**: 367-382, 2001b.
- RAVIKANTH, V.; REDDY, L.N.; RAO, T.P.; DIWAN, P.V.; RAMAKRISHNA, S.; VENKATESWARLU, Y. – Macrocyclic diterpenes from *Euphorbia nivulia*. **Phytochemistry** **59**: 331-335, 2002.

- RUIZ DE MORALES, J.; VÉLEZ, D.; SUBIZA, J. L. – Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Exp Hematol**, **27**: 1757-1767, 1999.
- SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MÁRQUEZ, J. – Early tumor effect on splenic Th lymphocytes en mice. **FEBS Letters**, **414**: 1-6, 1997.
- SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MARQUEZ, J. – Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. **Immunol Lett**, **74**: 111-115, 2000.
- SIGIURA, K – Tumor transplantation. In: _____ - W.I. Gray, ed. - **Methods of animal experimentation**. New York, Academic New Yirjm, 1965. p.171-172. v. 2.
- SMITH, T. C. & LEVINSON, C. – Ehrlich ascitic tumor cell surface labeling and kinetics of glycocalyx release. **J Supramol Struct**, **12**: 115-125 1979.
- TESKE, M. & TRENTINI, A. M. M. – **Herbarium compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. p. I-IX.
- TOMIDA, M.; YAMAMOTO-YAMAGUCHI, Y.; HOZUMI, M. – Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. **J Biol Chem**, **259**: 10978-82. 1984.

- VALADARES, M. C.; KLEIN, S.I.; ZYNGIER, S.; QUEIROZ, M. L. S. – Growth and differentiation of bone marrow hematopoietic cells in mice bearing Ehrlich ascite tumor and treated with Dicyclopentadienildichlorotitanium (IV). *Int J of Immunopharmacol*, **20**: 573-581, 1998.
- VALADARES, M. C.; QUEIROZ, M. L. S. – The effect of a Titanocene Dichloride derivative, Ti IV (C₅ H₅)₂ NCS₂, on the haematopoietic response of Ehrlich tumor-bearing mice. *Eur J Pharmacol*, **439**: 35-42, 2002.
- VAN DEN ENGH, G. J. & BOL, S. – The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin treated mice. *Cell Tiss Kinet*, **8**: 579-587, 1975.
- VIÑUELA, J. E.; RODRÍGUEZ, R.; GIL, J.; COLL, J.; DE LA CONCHA, E. G.; SUBIZA, J. L. – Antigen shedding vs. Development of natural suppressor cells as mechanism of tumor escape in mice bearing Ehrlich tumor. *Int J Cancer*, **47**: 86-91, 1991.
- WHITNEY, R. B.; KELLY, B. S.; LEVY, J.G. – Immunosuppression in mice bearing primary tumors. *Eur J Cancer*, **14**: 699-705, 1978.
- YAMAMOTO, T.; ZOU, J. P.; LI, X. F.; TAKENADA, H.; NODA, S.; FUJII, T.; DOBAYASHI, Y.; MUKIDA, N., MATSUSHIMA, K.; FUJIWARA, H.; MAMAODA, T. – Regulatory mechanisms for production of INF- γ and TNF by T-cells or macrophages in tumor-bearing state. *J Immunol*, **154**: 2281-90, 1995.

YOUNG, M. R. & HOWVER, C. S. – Inhibition of spleen cells cytotoxic capacity toward tumor by elevated prostaglandin E₂ levels in mice bearing Lewis lung carcinoma. **J Immunother**, **10**: 326-335, 1986.

YOUNG, M. R. L. & WRIGHT, M. A. – Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors: interferon- γ plus TNF- α synergistically reduce immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells and diminish tumor recurrence and metastasis. **Cancer Res**, **52**: 6335-6340, 1992.

9. Apêndice

Tabela 1 . Avaliação da sobrevida de animais portadores do TAE (6×10^6 cels/animal) e tratados 5 dia consecutivos com as doses de 125, 250 ou 500mg/kg de EET e de animais controle (sem tratamento) - (n=20/grupo).

<i>Dias</i>	SOBREVIDA			
	<i>Controle*</i>	<i>125mg/kg</i>	<i>250mg/kg</i>	<i>500mg/kg</i>
16 ^º	2	-	-	-
17 ^º	-	-	-	-
18 ^º	4	-	-	-
19 ^º	5	-	-	1
20 ^º	5	4	3	2
21 ^º	4	-	6	3
22 ^º		4	5	4
23 ^º		3	1	-
24 ^º		4	-	1
25 ^º		1	2	-
26 ^º		3	-	2
27 ^º		1	3	2
28 ^º				1
29 ^º				4

***Controle:** animais portadores do TAE (6×10^6 cel./animal) que não receberam tratamento.

Tabela 2: Efeitos do tratamento com diferentes doses do EET administrados oralmente, por 5 dias consecutivos, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais BALB/c inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich.

Número de CFU-GM /femur x103								
Animais	Ctrl	TAE	ET 125mg/kg		ET 250 mg/kg		ET 500 mg/kg	
			Trat.	TAE/Trat.	Trat.	TAE/Trat	Trat.	TAE/Trat.
1	13.64	8.38	8.76	8.63	6.96	13.38	11.24	16.38
2	12.39	6.03	10.40	5.75	16.74	12.45	10.50	16.63
3	11.02	3.60	13.58	8.25	13.63	9.23	12.96	11.43
4	9.88	3.97	8.03	10.70	12.12	13.88	7.95	13.80
5	9.90	5.20	8.91	13.23	7.70	10.17	10.62	11.88
6	11.10	6.20	9.60	14.00	10.37	7.15	10.36	11.99
Média	11.32	5.56	9.88	10.09	11.25	11.04	10.61	13.685
D.P.	1.47	1.74	1.98	3.16	3.70	2.64	1.62	2.33

Ctrl - Controle

TAE- Tumor ascítico de Ehrlich

Trat - Tratados

TAE/Trat.- Tumor ascítico de Ehrlich + tratamento.

Tabela 3: Efeitos do tratamento com diferentes doses do EET administrados oralmente, por 5 dias consecutivos, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de animais BALB/c inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich.

Número de CFU-GM /Baço x10 ³								
Animais	Ctrl	TAE	ET 125mg/kg		ET 250 mg/kg		ET 500 mg/kg	
			Trat.	TAE/Trat.	Trat.	TAE/Trat	Trat.	TAE/Trat.
1	6.30	57.42	2.70	22.23	5.94	18.36	3.96	23.76
2	5.76	60.75	4.32	31.68	2.16	21.78	5.76	13.86
3	2.61	86.13	3.78	40.32	3.24	23.94	3.78	17.28
4	4.86	63.00	3.96	31.32	4.32	21.60	3.96	17.01
5	3.78	44.46	3.24	37.26	4.59	20.70	3.42	21.60
6	6.75	78.12	2.70	22.50	4.86	14.63	5.94	16.83
Média	5.01	64.98	3.45	30.89	4.19	20.17	4.47	18.39
D.P.	1.58	14.97	0.68	7.43	1.32	3.26	1.09	3.61

Ctrl - Controle

TAE- Tumor ascítico de Ehrlich

Trat.- Tratados

TAE/Trat.- Tumor ascítico de Ehrlich + tratamento.

Tabela 4: Efeitos do tratamento com diferentes doses do EET administrados oralmente, por 5 dias consecutivos, sobre o peso do baço de animais BALB/c inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich.

PESO DO BACO (EM GRAMAS)								
Animais	Ctrl	TAE	ET 125mg/kg		ET 250 mg/kg		ET 500 mg/kg	
			Trat.	TAE/Trat.	Trat.	TAE/Trat	Trat.	TAE/Trat.
1	0.159	0.287	0.156	0.271	0.147	0.214	0.146	0.199
2	0.165	0.275	0.187	0.235	0.177	0.194	0.165	0.158
3	0.148	0.287	0.176	0.247	0.151	0.177	0.178	0.159
4	0.154	0.289	0.159	0.208	0.164	0.221	0.175	0.167
5	0.167	0.239	0.177	0.246	0.172	0.235	0.151	0.201
6	0.171	0.272	0.153	0.238	0.179	0.181	0.149	0.195
Média	0.161	0.275	0.168	0.241	0.165	0.204	0.161	0.184
D.P.	0.009	0.019	0.014	0.021	0.014	0.023	0.014	0.018

Ctrl - Controle

TAE - Tumor ascítico de Ehrlich

Trat. - Tratados

TAE/Trat. - Tumor ascítico de Ehrlich + tratamento.

Tabela 5: Contagem diferencial de células da medula óssea de camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos com diferentes doses de EET, administradas oralmente. O tratamento iniciou-se 24 horas após a inoculação do tumor.

Contagem diferencial de Mieloblastos da medula óssea						
Número de Animais	1	2	3	4	\bar{X}	DP
Grupos	células $\times 10^5$					
Controle	4.20	3.15	4.05	2.70	3.53	0.72
TAE	3.00	2.40	1.80	3.00	2.55	0.58
EET125mg	2.85	2.60	5.60	3.80	4.11	1.14
EET250mg	3.25	5.00	3.25	2.80	4.40	0.40
EET500mg	5.25	3.60	6.30	3.75	4.54	1.51
TAE/EET125mg	2.25	1.35	2.85	1.90	3.54	0.77
TAE/EET250mg	3.80	2.85	2.85	2.25	2.94	0.64
TAE/EET500mg	7.00	6.00	5.40	7.50	6.55	0.84

TAE - Tumor ascítico de Ehrlich

EET - Extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli*

Tabela 6: Contagem diferencial de células da medula óssea de camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos com diferentes doses de EET, administradas oralmente. O tratamento iniciou-se 24 horas após a inoculação do tumor.

Contagem diferencial de Promielócitos/Mielócitos da medula óssea						
Número de Animais	1	2	3	4	\bar{X}	DP
Grupos	Células $\times 10^5$					
Controle	14.70	23.10	27.00	32.40	24.30	7.45
TAE	7.20	10.40	9.60	7.80	9.15	2.16
EET125mg	20.90	13.00	23.80	13.30	18.21	4.23
EET250mg	10.40	18.75	8.45	10.50	16.24	2.13
EET500mg	75.75	9.60	11.55	9.75	11.98	2.65
TAE/EET125mg	4.05	3.60	6.65	6.65	7.35	0.81
TAE/EET250mg	9.50	10.45	8.55	7.50	7.86	0.87
TAE/EET500mg	6.00	6.00	5.40	8.75	5.80	1.18

TAE - Tumor ascítico de Ehrlich

EET - Extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli*

Tabela 7: Contagem diferencial de células da medula óssea de camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos com diferentes doses de EET, administradas oralmente. O tratamento iniciou-se 24 horas após a inoculação do tumor.

Contagem diferencial de Neutrófilo PMN/ Metamielócito da medula óssea						
Número de Animais	1	2	3	4	\bar{X}	DP
Grupos	Células $\times 10^5$					
Controle	64.05	58.80	81.00	72.90	69.19	9.79
TAE	47.40	62.40	45.00	46.20	50.25	8.16
EET125mg	62.70	93.80	89.60	62.70	77.20	16.83
EET250mg	68.25	78.75	73.50	66.15	71.66	5.65
EET500mg	63.00	74.40	65.10	65.00	66.88	5.11
TAE/EET125mg	73.80	86.00	82.65	80.75	80.80	5.15
TAE/EET250mg	80.75	79.80	77.90	62.25	75.18	8.70
TAE/EET500mg	77.00	79.00	74.10	98.75	82.21	11.21

TAE - Tumor ascítico de Ehrlich

EET - Extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli*

Tabela 8: Contagem diferencial de células da medula óssea de camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos com diferentes doses de EET, administradas oralmente. O tratamento iniciou-se 24 horas após a inoculação do tumor.

Contagem diferencial de Linfócitos da medula óssea						
Número de Animais	1	2	3	4	\bar{X}	DP
Grupos	Células $\times 10^5$					
Controle	22.05	19.95	22.95	27.00	22.99	2.96
TAE	2.40	3.20	3.60	3.00	3.05	0.50
EET125mg	13.30	19.60	23.80	15.20	17.98	4.70
EET250mg	15.75	22.50	13.65	18.90	17.70	3.86
EET500mg	21.00	32.40	22.05	21.00	24.11	5.55
TAE/EET125mg	3.60	3.00	2.85	3.80	3.31	0.46
TAE/EET250mg	2.85	9.80	5.70	3.75	4.03	1.20
TAE/EET500mg	11.00	10.00	9.50	11.25	10.44	0.83

TAE - Tumor ascítico de Ehrlich

EET - Extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli*

Tabela 10: Estudo dos efeitos do EET sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em animais BALB/c inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 5 dias consecutivos. O soro dos animais foi coletado 24h após o último dia de tratamento.

Fatores estimuladores de colônias - Unidades/ml								
Animais	Ctrl	TAE	EET 125mg/kg		EET 250 mg/kg		EET 500 mg/kg	
			Trat.	TAE/Trat.	Trat.	TAE/Trat	Trat.	TAE/Trat.
1	0.2916	4.2292	0.4375	3.9375	0.4375	4.0830	0.4375	3.7916
2	0.2916	3.7916	0.4375	3.6458	0.4375	3.9375	0.4375	4.0830
3	0.2916	4.0830	0.2916	3.6458	0.4375	3.7916	0.1458	3.5000
4	0.1485	4.2292	0.2916	3.5000	0.4375	3.6458	0.4375	3.6458
5	0.4375	3.9375	0.2916	3.7916	0.2916	3.7916	0.4375	3.5000
6	0.2916	3.9375	0.2916	4.0830	0.2916	3.5000	0.4375	9.9375
Média	0.2916	4.0347 @	0.3402	3.7673	0.3889	3.7916	0.3889	3.7430
D.P.	0.0922	0.1766	0.0753	0.2146	0.0753	0.2061	0.1191	0.2380

@ - significativo em relação ao grupo controle

Ctrl - Controle

TAE - Tumor ascítico de Ehrlich

Trat. - Tratados

TAE/Trat. - Tumor ascítico de Ehrlich + tratamento.