

Avaliação do uso do extrato bruto de *Euphorbia tirucalli* na inibição do tumor ascítico de ehrlich

Use of raw Euphorbia tirucalli extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor

ORLANDO JOSÉ DOS SANTOS, TCBC-MA¹; EULER NICOLAU SAUAI FILHO²; FLÁVIA RAQUEL FERNANDES DO NASCIMENTO¹; FRANCISCO CARDOSO SILVA JÚNIOR³; EDER MAGALHÃES SILVA FIALHO¹; RAYAN HAQUIM PINHEIRO SANTOS⁴; RENNAN ABUD PINHEIRO SANTOS¹; IZABEL CRISTINA PORTELA BOGÉA SERRA¹

R E S U M O

Objetivo: avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de *Euphorbia tirucalli* (ETHE) sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica. **Métodos:** quinze camundongos *Swiss* foram inoculados via intraperitoneal com $10,44 \times 10^7$ células do tumor de Ehrlich e um dia depois foram divididos em dois grupos: Grupo ETHE (oito camundongos), tratados com a dose de 125mg/kg/dia de ETHE por cinco dias e Grupo Controle (sete camundongos), tratado apenas com 0,9% de solução salina isotônica em relação ao mesmo período. O tratamento foi realizado por gavagem. Dez dias após a inoculação, quatro animais de cada grupo foram sacrificados para a quantificação do número de células de tumor, do volume de fluido ascítico e do número de células da medula óssea. Os demais animais foram mantidos, para avaliar a sobrevivência. **Resultados:** o volume de líquido ascítico e do número de células tumorais foram menores no grupo ETHE quando comparado ao grupo controle, porém sem significância estatística. Por outro lado, a sobrevivência dos animais foi maior no grupo de ETHE, bem como, a quantidade de células de medula óssea. **Conclusão:** o tratamento com ETHE, após a inoculação do tumor, diminuiu o seu desenvolvimento e aumentou a sobrevivência, bem como, a celularidade da medula óssea, reduzindo assim, a mielossupressão presente nos animais portadores de tumor de Ehrlich.

Descritores: Fitoterapia. Extratos Vegetais. Euphorbiaceae. Carcinoma de Ehrlich. Camundongos.

INTRODUÇÃO

Euphorbia tirucalli L. [Euphorbiaceae] é conhecido no Brasil como “aveloz” e seu látex tem sido usado como anti-helmíntico, antissifilítico e antitumoral na medicina tradicional¹⁻⁴. Algumas propriedades biológicas da *Euphorbia tirucalli* têm sido confirmadas como atividades larvicida, moluscicida, bactericida e anti-herpética.⁵⁻⁹ Essas atividades são comumente relacionadas à presença de fitoesteróis e triterpenos².

O tumor de Ehrlich é um carcinoma de crescimento rápido com comportamento muito agressivo, que induz mielossupressão em camundongos e afeta fortemente a resposta inflamatória. Foi demonstrado que os níveis de prostaglandina E2 (PGE2), que estão dramaticamente aumentados em camundongos portadores do tumor, foram abolidos pelo tratamento com extrato de *E. tirucalli*¹⁰⁻¹².

Baseado no uso popular e nos resultados acerca do efeito de *E. tirucalli* na resposta inflamatória, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da *Euphorbia tirucalli*, via oral, usando o tumor de Ehrlich em sua forma ascítica.

MÉTODOS

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), protocolo número 23115 008767/2008-40. O estudo seguiu as normas de uso de animais em experimentação, preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e a pesquisa realizada no Departamento de Medicina II, no Departamento de Patologia e no Laboratório de Imunofisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

A amostra foi composta de 15 camundongos *Swiss* machos (*Swiss Webster*, Rodentia Mammalia), fornecidos pelo Biotério UFMA, com idades entre 60 e 100 dias (média de idade de 72 dias). O peso estava entre 20 e 25 g (22,3g de peso médio). Eles foram mantidos em grupos de cinco por gaiola padrão para a espécie no Laboratório de Pesquisa de Imunofisiologia, com ciclo claro-escuro de 12 horas e umidade 44-56%, iguais ao ambiente natural, sem qualquer regulação artificial. A temperatura era constante em $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais foram alimentados

1. Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brasil; 2. Hospital Universitário Presidente Dutra, UFMA, São Luís, MA, Brasil; 3. Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, SP, Brasil; 4. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brasil.

com ração comercial padrão e tiveram livre acesso à água durante todo o experimento.

As cascas de *E. tirucalli* foram coletadas e identificadas no Herbário Ático Seabra da UFMA (espécimens voucher nº 1373). As cascas foram mecanicamente trituradas e adicionadas a 1L de etanol (70%), sendo misturadas a cada 8h durante 72h. Após este período, o extrato hidroalcoólico foi filtrado usando um funil de algodão. Após este processo, o extrato foi concentrado através de um evaporador rotativo e novamente filtrado para se obter 190ml de extrato hidroalcoólico. Finalmente, o extrato foi seco e o resíduo obtido diluído em água destilada em uma concentração de 15mg/ml.

Com a finalidade de tratar os camundongos, o extracto de *E. tirucalli* foi diluído novamente com água e administrado por gavagem com doses únicas diárias (125mg/kg de peso corporal) durante cinco dias. O tratamento foi iniciado 24 horas após o implante do tumor de Ehrlich. O grupo controle foi tratado apenas com solução salina isotônica (0,2ml).

O tumor ascítico de Ehrlich, derivado de um adenocarcinoma murino de mama espontâneo, foi mantido na forma ascítica através de passagens intraperitoneais sucessivas em camundongos *Swiss*, por transplante semanal no Laboratório de Imunofisiologia da UFMA. O fluido ascítico foi removido por abertura do abdome e coleta cuidadosa de todo o fluido, com a ajuda de uma seringa de 3ml estéril. Contagem de células tumorais foram feitas em um hemocítometro Neubauer. As células encontradas foram mais do que 99% viáveis pelo método de exclusão do corante azul de Tripano e quantidade de $5,22 \times 10^8$ células/ml de líquido ascítico.

Um volume de 0,2ml de células de tumor de Ehrlich foi injetado no espaço intraperitoneal para o desenvolvimento da forma ascítica. O montante final da suspensão de células tumorais utilizada em cada aplicação foi $10,44 \times 10^7$ células viáveis.

Após a inoculação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Grupo ETHE (GE), com oito camundongos, e grupo controle (GC), com sete animais. Os animais com tumor ascítico foram pesados a cada três dias.

No dia seguinte à inoculação, os animais do GE receberam diariamente 125mg/kg de extrato hidroalcoólico por gavagem e o mesmo volume de solução salina isotônica a 0,9% no GC, durante cinco dias consecutivos.

No décimo dia após a inoculação, quatro camundongos de cada grupo foram mortos por dose letal de 2% xilazina (20mg/kg, IM) e 5% de cloridrato de quetamina (30mg/kg, IM) para contagem celular da medula óssea femoral, bem como, volume e celularidade do líquido ascítico. Os camundongos remanescentes (quatro do GE e três de GC) foram mantidos para avaliar a sobrevivência.

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão de quatro animais por grupo. A avaliação estatística foi feita pelo teste ANOVA. A sobrevivência dos

animais foi demonstrada pela curva de Kaplan-Meier e foi aplicado o teste estatístico de Log-Rank para comparar as curvas. As diferenças foram consideradas significativas a $p < 0,05$ e são representados por um asterisco. Todos os experimentos foram repetidos ao menos duas vezes.

RESULTADOS

Volume total ascítico de Ehrlich e o número total de células tumorais foram menores nos camundongos tratados com *E. tirucalli* (125mg/kg), mas sem significância estatística (Figura 1 A e B). Os tratamentos com *E. tirucalli* também aumentaram significativamente a expectativa de vida (Figura 1C).

Houve também um aumento significativo no número de células da medula óssea do fêmur no GE (Figura 2).

Os pesos médios foram significativamente menores no GE (Figura 3).

DISCUSSÃO

Foi demonstrado aqui que o volume de fluido ascítico e o número de células de tumor de Ehrlich no peritônio foram menores em camundongos tratados com *E. tirucalli*, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. Apesar disso, esta diminuição pode demonstrar

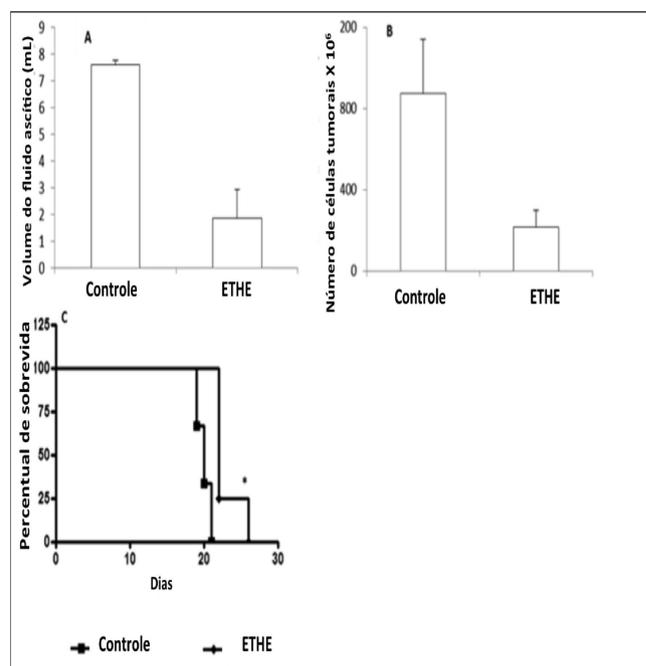


Figura 1 - Efeito de *E. tirucalli* em tumor de Ehrlich ascítico no volume de fluido ascítico (A), o número de células de tumor do fluido ascítico (B) e sobrevivência dos camundongos (C).

* $p < 0,05$ em comparação com o grupo de controle.

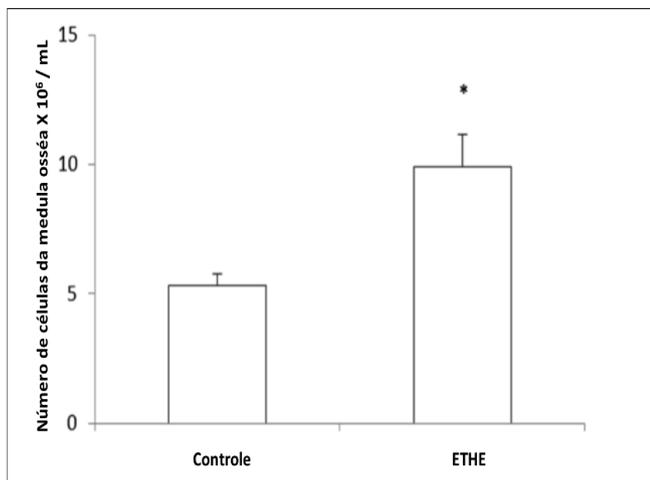


Figura 2 - Efeito da *E. tirucalli* no número de células da medula óssea do fêmur em camundongos portadores de tumor de Ehrlich.

* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

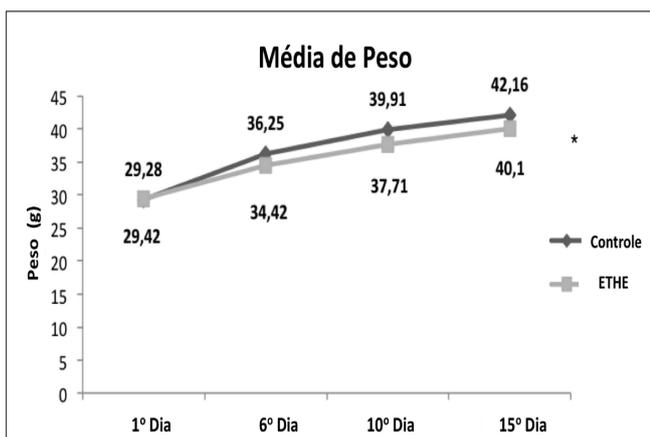


Figura 3 - Evolução do peso médio do GE e GC no primeiro, sexto, décimo e 15º dias do ensaio.

* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

a inibição do crescimento de ascite em camundongos do GE. Este fato, em conjunto com os pesos médios significativamente inferiores no GE, sugere retardamento do crescimento do tumor em animais tratados com o extrato.

O mecanismo exato pelo qual a *E. tirucalli* medeia o seu efeito antitumoral é desconhecido. No entanto, alguns dos compostos presentes em *E. tirucalli*, tais como terpenos, poderiam explicar estes resultados¹³. Estes compostos têm sido mencionados como antioxidante e, conseqüentemente, podem ser envolvidos nas atividades antitumorais¹⁴. Os extratos derivados da planta contendo os princípios antioxidantes mostraram citotoxicidade para células tumorais e atividade antitumoral em animais experimentais¹⁵⁻¹⁷.

A resposta inflamatória é, de fato, indispensável para modular o desenvolvimento de tumores. Foi demonstrado que a resposta inflamatória de neutrófilos é essencial para o controle do tumor de Ehrlich. No entanto, o elevado influxo destas células promove o desenvolvimento do tumor¹⁸. Este efeito é, provavelmente, relacionado com a angiogênese e fatores de crescimento induzidos por inflamação, que são necessárias para o desenvolvimento do tumor. A implantação do tumor ascítico de Ehrlich induz, por si só a uma reação inflamatória local, com aumento da permeabilidade vascular, o que resulta na formação de intenso edema, migração celular e formação progressiva do fluido ascítico¹⁹. O fluido ascítico é essencial para o crescimento do tumor, uma vez que constitui a fonte nutricional direta para as células tumorais²⁰.

O crescimento do tumor de Ehrlich induz à inibição da enzima superóxido dismutase e catalase, que são fundamentais para a eliminação de radicais livres, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio^{21,22}. Em camundongos portadores de tumor de Ehrlich, a atividade antioxidante atua por um mecanismo que envolve a modulação da peroxidação lipídica e aumenta o sistema de defesa antioxidante²⁰.

Propomos que a aditiva e sinérgica atividade antioxidante de fitoquímicos, como terpenóides, presentes na *E. tirucalli* sejam responsáveis por sua atividade antitumoral potente, que pode ser inferida a partir do aumento da expectativa de vida de camundongos com tumores e pela inibição do crescimento ascítico.

No que diz respeito à celularidade da medula femoral, verificou-se um aumento significativo no número de células medulares no grupo tratado com Aveloz, um resultado que é consistente com o que foi exposto por Valadares *et al.*²³. Este autor descreveu a propriedade do extrato de *Euphorbia tirucalli* em restaurar mielopoiese medular suprimida pelo tumor de Ehrlich durante o seu curso natural, não encontrando, no entanto, diferenças entre as três doses (125, 250 e 500 mg/kg). Estudos em camundongos inoculados com o tumor de Ehrlich mostrou uma diminuição rápida de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea, ao passo que foi observado um aumento progressivo no número de células e de CFU-GM no baço, seguido de esplenomegalia²⁴.

Quanto à sobrevivência dos animais, verificou-se, em nosso estudo, aumento estatisticamente significativo na sobrevivência dos animais tratados com Aveloz. O mesmo foi relatado no estudo de Valadares *et al.* para todas as doses disponíveis (125, 250, e 500 mg/kg/dia, durante cinco dias), sugerindo um aumento dose dependente na sobrevivência (sobrevivência maior em animais tratados com o extrato de 500mg/kg)²³.

A B S T R A C T

Objective: to evaluate the effect of the *Euphorbia tirucalli* hydroalcoholic extract (ETHE) on the development of Ehrlich Tumor, in its ascitic form. **Methods:** Fifteen mice Swiss were inoculated intraperitoneally with $10,44 \times 10^7$ cells of Ehrlich Tumor and one day after were divided in two groups: ETHE Group (8 mice), treated with dose of 125mg/kg/day of ETHE for five days, and Control Group (7 mice), treated only with 0.9% isotonic saline solution over the same period. The treatment was done by gavage. Ten days after inoculation, four mice from each group were sacrificed for quantification of tumor cell number, ascitic fluid volume and bone marrow cell number. The remaining animals were maintained to evaluate the survival. **Results:** the ascitic fluid volume and the tumor cell number were decreased in ETHE group when compared to control group, but with no statistical significance. On the other hand, the survival of mice was higher in the ETHE group as well as the number of bone marrow cells. **Conclusion:** treatment with ETHE, after the inoculation of tumor, decrease its development and increase the survival and the bone marrow cellularity, reducing so, the myelosuppression present in the Ehrlich Tumor bearing mice.

Key words: Physical Therapy Specialty. Plant Extracts. Euphorbiaceae. Carcinoma, Ehrlich Tumor. Mice.

REFERÊNCIAS

- Hecker E. Cocarcinogenic principles from seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* 1968;28(11):2338-49.
- Khan AQ, Ahmed Z, Kazmi NU, Malik A. Further Triterpenes from the Stem Bark of *Euphorbia tirucalli*. *Planta Med.* 1987;53(6):577.
- Rezende JR, Rodrigues SB, Jabor IAS, Pamphie JA, Rocha LMSC. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. *Acta sci biol sci.* 2004;26(4):481-4.
- Silva AC, Faria DE, Borges NB, Souza IA, Peters VM, Guerra Mde O. Toxicological screening of *Euphorbia tirucalli* L.: developmental toxicity studies in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007;110(1):154-9.
- Tiwari S, Singh P, Singh A. Toxicity of *Euphorbia tirucalli* plant against freshwater target and non-target organisms. *Pak J Biol Sci.* 2003;6(16):1423-9.
- Jurberg P, Cabral Neto JB, Schall VT. Molluscicide activity of the "Avelós" plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusc vector of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985;80(4):423-7.
- Betancur-Galvis LA, Morales GE, Forero JE, Roldan J. Cytotoxic and antiviral activities of colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(4):541-6.
- Lirio LG, Hermano ML, Fontanilla MQ. Note antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. *Pharm Biol.* 1998;36(5):357-9.
- Fürstenberger 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.* 1986;49(3):386-97.
- Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunol Lett.* 2000;74(2):111-5.
- Baiocchi E, Bigonha JG, Heymann RE, Feder D, Cabral M, Zyngier SB. Estrógeno em tumor de Ehrlich: estudo da sobrevivência e avaliação da resposta imunológica. *Arq méd ABC.* 1986;9(1-2):22-7.
- Zyngier S, Bueno MAS, Krybus J, Novak A, Feder D, Cabral M, et al. Alteração da resposta inflamatória e imunológica em animais portadores de tumor experimental. *Arq méd ABC.* 1991;14(1):24-7.
- Kiuchi F, Itano Y, Uchiyama N, Honda G, Tsubouchi A, Nakajima-Shimada J, et al. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *J Nat Prod.* 2002;65(4):509-12.
- Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004;134(12 Suppl):3479S-85S.
- Li JJ, Oberley LW. Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and/or hyperthermia. *Cancer Res.* 1997;57(10):1991-8.
- Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan KN, Kuttan R. Antitumor and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.* 1995;94(1):79-83.
- Nascimento FR, Cruz GV, Pereira PV, Maciel MC, Silva LA, Azevedo AP, et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci.* 2006;78(22):2650-3.
- Bergami-Santos PC, Mariano M, Barbuto JA. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sci.* 2004;75(2):245-55.
- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation.* 1990;14(1):125-32.
- Gupta M, Mazumder UK, Kumar RS, Kumar TS. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice [corrected]. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(8):1070-6.
- Sun XS, Xu Y, Xia YJ. Determination of E-rosette-forming lymphocytes in aged subjects with Taichiquan exercise. *Int J Sports Med.* 1989;10(3):217-9.
- Rushmore TH, Pickett CB. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem.* 1993;268(16):11475-8.
- Valadares MC, Carrucha SG, Accorsi W, Queiroz ML. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. *Int Immunopharmacol.* 2006;6(2):294-9.
- Queiroz ML, Valadares MC, Bincoletto C, Dieamant GC. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2004;26(4):511-25.

Recebido em 08/04/2015

Aceito para publicação em 26/11/2015

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:

Orlando José dos Santos

E-mail: orlanddojs@hotmail.com