



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**AYSLAN BATISTA BARROS**

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *in vitro* E *in vivo* DE UM  
HETEROPOLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DO EXSUDATO DO CAULE DE  
*Anacardium occidentale* L.**

**PARNAÍBA  
2019**

**AYSLAN BATISTA BARROS**

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *in vitro* E *in vivo* DE UM  
HETEROPOLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DO EXSUDATO DO CAULE DE  
*Anacardium occidentale* L.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Novas tecnologias e metodologias de diagnóstico e tratamento

Orientador: José Delano Barreto Marinho Filho

**PARNAÍBA – PI  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba

Serviço de Processamento Técnico

B277e Barros, Ayslan Batista.

Estudo do potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* de um heteropolissacarídeo extraído do exsudato do caule de *Anacardium occidentale* L. [manuscrito] / Ayslan Batista Barros. – 2019.

84 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2019.

Orientação: Prof. José Delano Barreto Marinho Filho.

**AYSLAN BATISTA BARROS**

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *in vitro* E *in vivo* DE UM  
HETEROPOLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DO EXSUDATO DO CAULE DE  
*Anacardium occidentale* L.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADO EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho  
Universidade Federal do Piauí  
(Orientador)

---

Prof. Dra. Andrea Felinto Moura  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros  
Universidade Federal do Ceará

PARNAÍBA – PI  
2019

*Nunca se esqueça de que todas as vantagens ou benefícios que desfrutemos da vida são empréstimos de Deus.*

*André Luiz*

Dedico esta dissertação à  
minha família e a todos os meus  
amigos que me apoiaram e  
auxiliaram nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Sem o apoio incondicional e amor infinito dos nossos pais não temos a força de conseguir chegar até o fim, por isso agradeço imensamente aos meus Pais pelo apoio dado nesta luta diária, pelo carinho e por tudo o que sempre me forneceram. Agradeço também à minha irmã (**Andressa**), que sempre cuidou e me apoiou em todos os momentos. A família nós amamos e cuidamos sempre.

E por isso, agradeço imensamente ao professor Dr. **José Delano**, orientador deste trabalho e PAI científico, pelo imenso apoio dado continuamente em toda esta trajetória, e pelo grande exemplo de ser humano, pesquisador e amigo, pelos puxões de orelha e pelos incentivos dado em todo o momento, principalmente durante as dificuldades enfrentadas na pesquisa e na procura de novos conhecimentos. Pela paciência nos momentos complicados e por saber o momento de dizer “vai dar tudo certo”. O senhor não imagina o carinho que sinto por sua amizade. Muito obrigado.

À minha co-orientadora e MÃE científica **Ana Jérсия**, por ter me aceitado desde o começo de tudo, e por ter influenciado (para não dizer obrigado) o prof. Delano a me aceitar, por ter ensinado tantas e tantas vezes vários protocolos, e mostrado o caminho das pedras e o caminho das rosas. Sou muito grato por todo o seu carinho.

À prof. Dr<sup>a</sup> **Andrea Felinto**, pela grande amizade, momentos felizes e claro, pelos auxílios nos vários experimentos realizados na Universidade Federal do Ceará, e por tantos ensinamentos passados ao logo do caminho, mais uma grande amizade adquirida durante o mestrado. E que venham muitas outras colaborações.

Agradeço também à Universidade Federal do Ceará pela colaboração cedida nos experimentos *in vivo*, e a todos os colaboradores que auxiliaram na execução do mesmo.

Aos alunos de graduação, mestrado e doutorado do laboratório BIOTEC, por tantos momentos alegres e por todo o apoio dado em vários experimentos.

À Prof<sup>a</sup>. **Durcilene Alves**, pelo constante apoio desde o começo do mestrado, por ter me ensinado tanto sobre o mundo da nanotecnologia, por ter me fornecido o material necessário para realização desta e de outras pesquisas, enfim, por tantos e tantos auxílios fornecidos.

Aos grandes amigos (porque esses eu realmente posso considerar AMIGOS), **Alyne, Jéssica Teles, Bruno e Fábio**, pela verdadeira amizade construída, por tantos momentos de descontração, e claro pelas imensas ajudas fornecidas durante esta jornada. Amizade verdadeira a gente leva para a vida, e a nossa estará além desta e de outras vidas.

Aos amigos/irmãos da Tenda São João Batista pelo companheirismo e apoio moral e espiritual dispensado durante todo este tempo, e por entender as minhas faltas nos eventos por conta de experimento e/ou estudo.

Aos membros do Laboratório LAFIDG, em nome do prof. **Jand Venes**, pela ajuda fornecida nos experimentos de estresse oxidativo.

A todos que contribuíram direto ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Piauí

Universidade Federal do Ceará

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade e Produtos Naturais  
(INCT-BioNat)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Piauí - FAPEPI



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Câncer</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Tratamento do câncer</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3 Quimioterápicos e seus efeitos colaterais</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4 Produtos naturais e Câncer</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5 Polissacarídeos e suas aplicações</b> .....	<b>26</b>
2.5.1 Goma do cajueiro .....	31
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 Objetivos Gerais</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>34</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 Desenho experimental</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2 Obtenção da Goma do Cajueiro</b> .....	<b>37</b>
4.2.1. Isolamento e purificação do polissacarídeo obtido do cajueiro <i>Anacardium occidentale L.</i> .....	37
<b>4.3 Estudos <i>in vitro</i></b> .....	<b>37</b>
4.3.1. Manutenção das linhagens celulares .....	37
4.3.2. Estudos de citotoxicidade .....	38
<b>4.4 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i></b> .....	<b>39</b>
4.4.1 Animais .....	39
4.4.2 Avaliação do efeito antitumoral do polissacarídeo isolado do cajueiro <i>Anacardium occidentale L.</i> em camundongos transplantados com melanoma murino B16F-10 .....	40
4.4.3 Análise morfológica e histopatológica dos tecidos .....	41
4.4.4 Análise do tecido tumoral por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	42
4.4.5 Avaliação de estresse oxidativo através de quantificação de GSH, MDA e MPO .....	42
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>

<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>71</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética no uso animal - CEUA.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. ....	18
<b>FIGURA 2:</b> Fatores que caracterizam a proliferação de células tumorais. ....	19
<b>FIGURA 3 :</b> Aplicações de polissacarídeos naturais .....	31
<b>FIGURA 4 :</b> Exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> L.....	32
<b>FIGURA 5 :</b> Desenho experimental da metodologia .....	35
<b>FIGURA 6 :</b> Ensaio de migração para goma do cajueiro (GC) na concentração de 100 µg/mL. As células do controle negativo tratadas com o veículo de diluição (PBS).....	46
<b>FIGURA 7:</b> Fotomicrografia do baço de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento .....	53
<b>FIGURA 8:</b> Fotomicrografia do fígado de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento. ....	54
<b>FIGURA 9:</b> Fotomicrografia do rim de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento. ....	55
<b>FIGURA 10:</b> Fotomicrografia do pulmão de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento.....	56
<b>FIGURA 11:</b> Fotomicrografia do tumor de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento.....	57
<b>FIGURA 12:</b> Fotomicrografia do tumor de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento.....	58
<b>FIGURA 13:</b> Fotomicrografia do tumor de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento.....	59
<b>FIGURA 14:</b> Espectro na região do infravermelho dos grupos tratados (Goma 50 e Goma 100) e controles (Ciclofosfamida e Salina). ....	64

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1:</b> Efeito antitumoral in vivo da goma do cajueiro nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia sobre a proliferação tumoral de camundongos C57BL6 transplantados com melanoma B16F10. ....	47
<b>GRÁFICO 2:</b> Curva de peso dos animais durante os 15 dias de tratamento com Goma do cajueiro (CG) nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia. O controle negativo foi administrado Soro Fisiológico 0,9%. Ciclofosfamida (25 mg/kg/dia) foi utilizada como controle positivo. ....	48
<b>GRÁFICO 3:</b> Gráficos dos pesos dos órgãos de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento com a goma do cajueiro. C- (salina), Ciclo (ciclofosfamida 25 mg/kg). ....	51
<b>GRÁFICO 4:</b> Gráfico do nível de leucócitos no sangue após os 15 dias de tratamento. Os dados estão apresentados como os valores da média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Tukey's. ....	60
<b>GRÁFICO 5:</b> Gráfico do nível de linfócitos no sangue após os 15 dias de tratamento. Os dados estão apresentados como os valores da média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Tukey's. ....	61
<b>GRÁFICO 6:</b> Avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA) em tecido tumoral de animais <i>Mus musculus</i> transplantados com células de melanoma metastático murino (B16F10), tratados com ciclofosfamida (Ciclo) e goma do cajueiro. ....	65
<b>GRÁFICO 7:</b> Avaliação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em tecido tumoral de animais <i>Mus musculus</i> transplantados com células de melanoma metastático murino (B16F10), tratados com ciclofosfamida (Ciclo) e goma do cajueiro. ....	66
<b>GRÁFICO 8:</b> Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em tecido tumoral de animais <i>Mus musculus</i> transplantados com células de melanoma metastático murino (B16F10), tratados com ciclofosfamida (Ciclo) e goma do cajueiro. ....	67

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1:</b> Efeitos colaterais dos principais quimioterápicos utilizados na atualidade.....	24
<b>TABELA 2:</b> Fontes usuais de alguns polissacarídeos. ....	27
<b>TABELA 3:</b> Parâmetros hematológicos após os 15 dias de tratamento. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU – 5-fluorouracil

ATR – Attenuated Total Reflectance

BRM – Modificadores de resposta biológica

CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CEUA – Comissão de Ética em uso de Animais

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50%

CONCEA – Conselho Nacional de Experimentação Animal

DCs – Células dendríticas

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimetilsulfóxido

DTNB – 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (reagente de Ellman)

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EROS – espécies reativas de oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

FTIR - Fourier-transform infrared spectroscopy (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)

GC – goma do cajueiro

GI – gastrointestinal

GSH – glutationa reduzida

GSH – Px – glutationa peroxidase

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – ácido fosfórico

HeLa – linhagem celular de câncer cervical extraído de Henrietta Lacks

HTAB – Hexadecyltrimethylammonium bromide

Il-8 - Interleucina 8

KCl- Cloreto de potássio

MDA – malondialdeído

MPO – mieloperoxidase

MTT – 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NCI – National Cancer Institute

PBS – tampão fosfato

PDW – Platelet Distribution Width

PS – polissacarídeos

RBC- Red Cell Count

RDW – Red Cell Distribution Width

RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium

SFB – Soro fetal bovino

SO<sub>4</sub> – Sulfato

TCA – ácido tricloroacético

TGF $\beta$  – Transforming Growth Factor beta

Th1 – Línfócitos T helper 1

Th2 - Línfócitos T helper 2

TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa

TNF $\beta$  – Fator de Necrose Tumoral beta

UV - ultravioleta

## RESUMO

O câncer é caracterizado por um conjunto de doenças que tem relação com o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos. Diversos novos fármacos têm sido descobertos para tratamento de diferentes tipos de câncer, oriundos de plantas, algas, microorganismos e outros. Os polissacarídeos extraídos de plantas possuem diversas aplicações descritas na literatura como atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. No entanto, o efeito antitumoral dos polissacarídeos ainda não está totalmente elucidado. Assim este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antitumoral da goma do cajueiro, através de modelos *in vitro* e *in vivo*. A goma do cajueiro não demonstrou atividade citotóxica e antimigratória *in vitro* em células tumorais murinas e humanas na concentração de 100 µg/mL. Já nos ensaios *in vivo*, a goma do cajueiro foi capaz de inibir o crescimento tumoral em melanoma metastático murino (B16F-10) em 35% e 40%, nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Além disso, o polissacarídeo não diminuiu o peso dos animais, já que o mesmo é composto basicamente por cadeias de açúcares. Em relação aos componentes hematológicos, a goma do cajueiro não causou leucopenia, nem alterações hematológicas significativas, demonstrando assim que este polímero possivelmente não causa depleção ao sistema imunológico do animal. Os cortes histológicos dos órgãos demonstraram que a goma do cajueiro não provoca lesões tóxicas no fígado, rim, pulmão e baço. Além disso, os cortes do tumor indicaram processo de morte celular indicativo de apoptose. A análise do tecido tumoral por FTIR, indicou processo de morte semelhante nos tratamentos com ciclofosfamida e goma do cajueiro, pelo estiramento de bandas representativas de lipídeos, e grupamentos presentes no DNA. Em relação à análise de componentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (GSH, MDA e MPO), observou-se que a goma do cajueiro não indicou a produção de agentes antioxidantes, demonstrando possivelmente que este polímero não provoca estresse oxidativo tecidual. Conclui-se, portanto, que este polissacarídeo poderia auxiliar no tratamento de neoplasias, através da possível redução de efeitos colaterais gerados pelos quimioterápicos, além de ajudar na redução tumoral.

**Palavras-chave:** Polissacarídeos. Goma do cajueiro. Antitumoral. Câncer.



## ABSTRACT

Cancer is characterized by a group of diseases related to the disordered growth of the cells, which invade tissues and organs. Several new drugs, derived from plants, algae, microorganisms and other sources, have been investigated due to their potential to treat different types of cancer. Polysaccharides extracted from plants have innumerable applications described in the literature, such as antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities, *in vitro* and *in vivo*. However, the antitumor effects of these polysaccharides are not fully elucidated yet. This study aimed to evaluate the antitumor potential of the cashew gum, through *in vitro* and *in vivo* models. The cashew gum did not demonstrate cytotoxic and antimigratory activity *in vitro* in murine and human tumor cells at the concentration of 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . *In vivo* assays showed that cashew gum was able to inhibit in 35% and 40% the tumor growth in murine metastatic melanoma (B16F-10), at doses of 50 and 100 mg / kg, respectively. In addition, the polysaccharide does not decrease the weight of the animals, since it is composed basically of sugar chains. Regarding hematological components, cashew gum did not cause leucopenia, and not significant hematological alterations, demonstrating that this polymer does not cause depletion of the immune system of the animal. Histological sections of the organs have shown that cashew gum did not caused toxic lesions in the liver, kidney, lung and spleen. Tumor slices indicated a cell death process indicative of apoptosis in treatment with cashew gum. The analysis of the tumor tissue by FTIR indicated a similar death process in treatments with cyclophosphamide and cashew gum, by the stretching of lipids representative bands, and groups present in the DNA. With regard to the analysis of enzymatic and non-enzymatic antioxidant components (GSH, MDA and MPO), Cashew gum did not indicate the production of these antioxidant agents, possibly demonstrating that this polymer does not cause tissue oxidative stress. Therefore, it is concluded that this polysaccharide could help in the treatment of neoplasias, by possibly reducing the side effects generated by the chemotherapeutic, besides helping in the tumor reduction.

**Keywords:** Polysaccharides. Cashew gum. Antitumor. Cancer.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer corresponde a um conjunto de centenas de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, formando metástases (WHO, 2018). As células tumorais param de obedecer estritamente aos mecanismos de controle de divisão celular, diferenciação e interação inter e extracelular e com a matriz extracelular, e tendem a ser muito agressivas e formar tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Os tumores malignos apresentam algumas características pré-estabelecidas, como instabilidade genética, ineficiência do processo de apoptose, produção contínua de sinais proliferativos, insensibilidade a fatores supressores do crescimento, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese e metástase, desregulação do metabolismo energético, invisibilidade ao sistema imune e promoção de inflamação associada ao tumor. Essa instabilidade genética é um componente chave na origem do tumor uma vez que ela possibilita a geração de diversidade genética que, por sua vez, induz a aquisição das demais características carcinogênicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

Os tratamentos atuais desta doença, englobam principalmente cirurgia, radioterapia e quimioterapia, que compreende a utilização de substâncias naturais, sintéticas e semi-sintéticas. Infelizmente as drogas antitumorais utilizadas atualmente não possuem especificidade para tecidos tumorais provocando assim lesões em outros tecidos normais, como é o caso da Doxorubicina. Este fármaco é largamente utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, induzindo diversos efeitos biológicos como apoptose, necrose, autofagia, parada de ciclo celular, entre outros. Por outro lado, o tratamento com esta droga também causa vários efeitos colaterais como vômitos, náuseas, queda de cabelo e distúrbios no sistema neurológico. Também pode causar depleção do sistema imunológico podendo levar a suscetibilidade a infecções oportunistas, além de toxicidades em órgãos como coração, fígado, rim e cérebro (CARVALHO et al., 2009; JESWANI; PAUL, 2017; HORTOBDGYI, 1997).

Assim diversas novas drogas têm sido descobertas para tratamento de diferentes tipos de câncer, oriundas de plantas, algas, microorganismos e outros. Recentemente a FDA (Food and Drug Administration) aprovou novas drogas advindas de plantas para o tratamento de linfoma não-Hodgking, além de outros tipos, demonstrando assim a grande importância da pesquisa de novos agentes oriundos de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2013; GORDALIZA, 2007)

Os produtos naturais, para a indústria farmacêutica, podem ser considerados como sendo uma das matérias-primas mais utilizada na produção de biomateriais (ZHU et al., 2011). A ampla biodisponibilidade e a diversidade de atividades farmacológicas tornam os produtos naturais promissoras fontes de produtos de interesse terapêutico. Dentre estes compostos encontram-se os polissacarídeos, moléculas ricas em açúcar que tem demonstrado atividades biológicas interessantes (PINTO et al., 2002).

Os polissacarídeos (PS) naturais são, reconhecidamente, uma fonte de agentes modificadores da resposta biológica e têm atraído considerável atenção, sobretudo dos pesquisadores da área de saúde, devido às suas propriedades terapêuticas aliadas a uma baixa toxicidade (LEUNG et al., 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Diversos estudos de caracterização dos efeitos imunomoduladores, antitumorais, antimetastáticos, anticoagulantes e de relação estrutura-atividade têm sido realizados com PS isolados de bactérias, fungos, plantas, algas e invertebrados marinhos (LEUNG et al., 2006; POMIN; MOURÃO, 2008; TZIANABOS, 2000).

A goma do cajueiro, um heteropolissacarídeo extraído do exsudato do caule de *Anacardium occidentale*, é um composto que está sendo estudado pelo nosso grupo há alguns anos e vêm apresentando atividades biológicas diversas como gastroprotetora, antidiarreica e anti-inflamatória (ARAÚJO et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; SOUZA FILHO et al., 2017). Além disso, em 2008 outro grupo mostrou que a goma do cajueiro apresentava potente atividade antitumoral *in vivo* (tumor murino sarcoma-180). No entanto, os mecanismos antitumorais dessa molécula ainda não foram elucidados. Uma vez que estudos ainda não foram realizados sobre o potencial anticâncer desse polissacarídeo *in vitro*, assim como em outros modelos tumorais *in vivo* (FLORÊNCIO et al., 2007; MOTHÉ; DE SOUZA; CALAZANS, 2008).

Diante do exposto, este projeto propõe desvendar o efeito antitumoral da goma do cajueiro a fim de auxiliar na formulação de novos medicamentos para o tratamento do câncer. Desse modo, o projeto visa estudar o potencial anticâncer *in vitro* e *in vivo* da goma do cajueiro.


## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Câncer

Ao longo do tempo, avanços importantes acerca do conhecimento sobre as neoplasias foram obtidos, porém, ainda assim o câncer é uma das doenças que mais mata na população, após as doenças cardiovasculares, sendo considerada assim um importante problema de saúde pública em todo o mundo. O número de novos casos desta doença cresce a cada ano, assim como a mortalidade, estando esta, ligada a uma série de fatores como maior exposição a agentes cancerígenos, localização primária do tumor, falta de diagnóstico precoce, entre outros (INCA, 2011a, 2018).

A estimativa mundial mostra que, em 2016, ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%). De modo geral, as maiores taxas de incidência foram observadas nos países desenvolvidos. A estimativa para o Brasil é de que para o biênio 2018-2019, haja a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos por ano. Destes, o câncer de próstata e de mama serão os mais incidentes em homens e mulheres, respectivamente. Neste contexto, é essencial que novas perspectivas de tratamento e de prevenção sejam tomadas e incorporem-se na rotina da gestão em saúde (INCA, 2018).

**FIGURA 1:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	<b>Homens</b> 		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

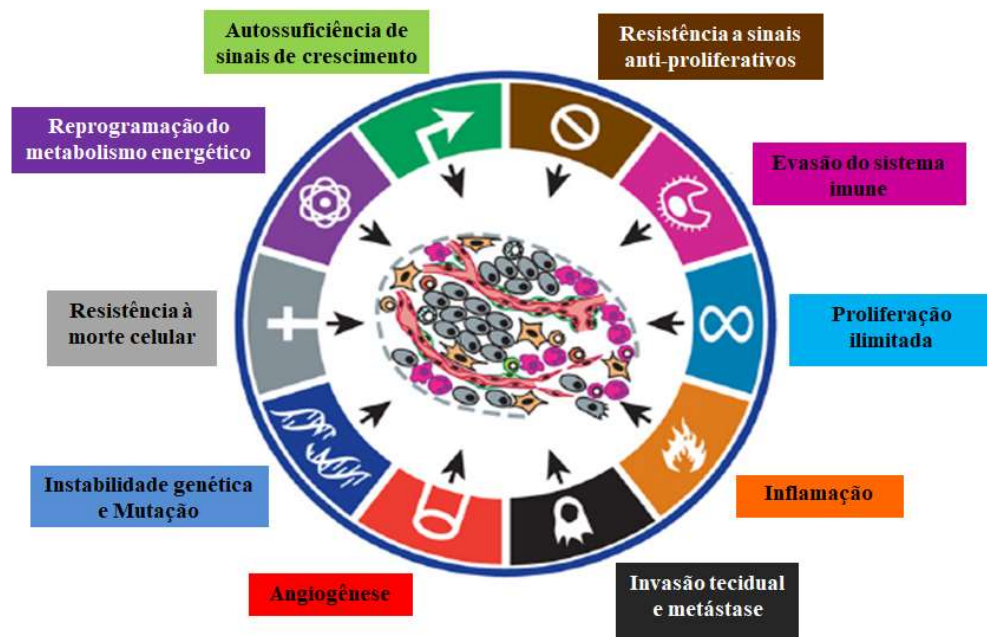
FONTE: (INCA, 2018)

A maioria das células do corpo possui um maquinário de controle de ciclo celular, algumas se proliferam constantemente como as células epiteliais e outras nunca se dividem, como os neurônios. Acreditava-se que as neoplasias se originavam por conta de influências ambientais, como radiação, que causavam o crescimento desordenado de células mutadas, e que o mesmo não tinha interação com o ciclo celular natural, porém posteriormente demonstrou-se que a desregulação do ciclo celular provocava o descontrole da proliferação

celular, caracterizando assim o fenótipo maligno das neoplasias (INCA, 2011b; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Os tumores malignos apresentam algumas características bem descritas, como instabilidade genética, ineficiência do processo de apoptose, produção contínua de sinais proliferativos, insensibilidade a fatores supressores do crescimento, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese e metástase, reprogramação do metabolismo energético, invisibilidade ao sistema imune e promoção de inflamação associada ao tumor (figura 2). Essa instabilidade genética é um componente chave na origem do tumor uma vez que ela possibilita a geração de diversidade genética que, por sua vez, induz a aquisição das demais características carcinogênicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

**FIGURA 2:** Fatores que caracterizam a proliferação de células tumorais.



FONTE: (HANAHAN; WEINBERG, 2011) com modificações

Uma das principais características patogênicas das células tumorais, é a capacidade de escapar do processo de morte celular programada ou apoptose, além disso, essa capacidade ainda fornece proteção contra o estresse oxidativo e hipóxia à medida que a massa tumoral cresce (HASSAN et al., 2014). A morte celular programada é definida por morte celular mediada por um maquinário intracelular. Acreditava-se que a apoptose era a única forma de morte celular programada, porém, na última década determinaram-se diversos outros tipos de

morte celular programa, dentre elas a autofagia e a necrose programada ou necroptose (SU et al., 2015).

No processo de apoptose, mediada por vias bioquímicas e genéticas distintas, que desempenham um papel crítico no desenvolvimento e na homeostase dos tecidos normais. Este processo contribui para a eliminação de células desnecessárias e indesejadas para manter o equilíbrio saudável entre sobrevivência e morte celular. Este processo pode ser dividido em via extrínseca (através de receptores de morte), e intrínseca ou mitocondrial. Mecanismos de defesa contra o processo de apoptose é crucial para a sobrevivência de células tumorais e é um passo importante para a tumorigênese e resistência à terapia (LI-WEBER, 2013).

## **2.2 Estratégias terapêuticas do câncer**

As células normais tendem a manter o equilíbrio (homeostase) através de mecanismos que possam regular o seu crescimento, sendo este regulado pelo balanço entre proliferação, parada do crescimento e mecanismo de apoptose. No caso de desequilíbrios entre estas características pode resultar em hiperplasia ou neoplasia. Os tratamentos para esta doença visam retirar o tecido neoplásico e/ou provocar a morte de células neoplásicas. Diversos esforços vem sendo realizados com o intuito de desenvolver ou aperfeiçoar terapias antineoplásicas, sendo as formas mais utilizadas atualmente a cirurgia, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia (MILLER et al., 2016).

Infelizmente muitos fármacos antitumorais utilizados não possuem especificidade para tecidos tumorais, provocando assim lesões em outros tecidos, como é o caso da Doxorubicina e da Ciclofosfamida. Estes fármacos são largamente utilizados para o tratamento de vários tipos de câncer, induzindo diversos efeitos biológicos como apoptose, necrose, autofagia, parada de ciclo celular, entre outros. Por outro lado, o tratamento com estas drogas também causa vários efeitos colaterais como vômitos, náuseas, queda de cabelo e distúrbios no sistema neurológico. Também pode causar depleção do sistema imunológico, o que pode levar à suscetibilidade a infecções oportunistas, além de toxicidade em órgãos como coração, fígado, rim e cérebro (CARVALHO et al., 2009; JESWANI; PAUL, 2017; SHEWACH; KUCHTA, 2009).

A ciência busca constantemente novas estratégias a fim de combater a carcinogênese e otimizar o tratamento dos pacientes. No entanto, nem sempre os resultados são satisfatórios. Novas estratégias terapêuticas tem sido desenvolvidas a fim de eliminar a massa tumoral, protegendo as células normais e minimizando o desconforto do paciente, com maior eficácia. Até o século passado, o câncer era tratado efetivamente através de cirurgias, radioterapia e

quimioterapia. Estes tratamentos usados em conjunto ou sozinhos, podiam significativamente gerar impactos no crescimento tumoral e até mesmo promover a cura. Para a maioria dos tumores sólidos, um diagnóstico cedo, juntamente com terapias eficientes são suficientes para a sobrevivência, porém, uma vez que este tumor tenha sofrido metástase, o tratamento torna-se um pouco mais complicado. Em muitos casos, mesmo a combinação de técnicas de tratamento, não conseguiam estender a vida por mais de 2 anos (ZEHNDER; GRAHAM; ANTONISSEN, 2018).

Mesmo causando grandes efeitos colaterais, muitos agentes quimioterápicos ainda são utilizados e são considerados importantes componentes no tratamento de neoplasias, como é o caso da Doxorrubicina. Muitos tecidos do corpo são suscetíveis aos efeitos da quimioterapia, principalmente o coração e o cérebro. Pelo fato das células musculares cardíacas e dos neurônios serem considerados células pós-mitóticas, os danos a estas são irreversíveis, o que acaba gerando lesões crônicas com perda de parte da função, podendo levar à morte (ABOTALEB et al., 2018).

### **2.3 Quimioterápicos e seus efeitos colaterais**

Uma das principais formas de tratamento do câncer atualmente é a utilização de quimioterápicos de origem natural ou sintética. A FDA (Food and Drug Administration) tem aprovado mais de 200 compostos para atividade antitumoral, sendo que, destes, a maioria tem demonstrado diversos efeitos colaterais. Muitos deles foram indicados como causadores de estresse oxidativo, incluindo as antraciclinas, ciclofosfamida, cisplatina, busulfan, mitomicina, fluorouracil, entre outras (CARR; NG; WIGMORE, 2008; CHEN et al., 2007; PRYOR et al., 2006).

Os quimioterápicos atuais podem ser classificados como, antimetabólitos, agentes alquilantes, antibióticos citotóxicos, hormônios agonistas e antagonistas, agentes biológicos e anticorpos monoclonais. Os mecanismos de ação e efeitos colaterais destes agentes populares, estão comumente associados a efeitos sistêmicos como cardiovascular, renal e hepático (JESWANI; PAUL, 2017).

Os fármacos da classe das antraciclinas, conhecidas por sua característica de pigmentação avermelhada, em sua maioria foram extraídas de bactérias do solo ou actinomicetos (*Streptomyces*). Dentre elas encontram-se a daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, entre outros. A doxorrubicina é muito utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, e é frequentemente associada à cardiotoxicidade em apresentações agudas, subagudas e crônicas.

Dentre os efeitos adversos demonstrados, encontram-se taquicardia supraventricular, miopericardite, cardiomiopatia e até a morte (COCHRAN et al., 2017; FLOYD et al., 2005).

Agentes alquilantes como a ciclofosfamida são comumente utilizados no tratamento de complicações, tanto malignas quanto não malignas, como câncer de mama, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo, infecções fúngicas, neuroblastoma, entre outros. Em baixas concentrações a ciclofosfamida provoca cardiotoxicidade, com processos arrítmicos e alteração no eletrocardiograma. Em altas doses, este fármaco pode causar cardiotoxicidade letal, e falha congestiva do coração, além de distúrbios gastrointestinais e severa leucopenia, o que pode estar relacionado com o aumento de infecções oportunistas (MONSUEZ et al., 2010; PONTICELLI; ESCOLI; MORONI, 2018).

A atividade antitumoral destes agentes depende de vários mecanismos interconectados, como intercalação no DNA, impedindo a transcrição de proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), provocando apoptose e necrose (MONSUEZ et al., 2010). Em estudos sobre os efeitos da ciclofosfamida, autores demonstraram que altas doses deste fármaco causam depleção de linfócitos T, provocando imunodepressão, podendo assim abrir portas para infecções oportunistas (MOTOYOSHI et al., 2006; VEAL et al., 2016).

Outro importante quimioterápico utilizado na prática clínica é a cisplatina, sendo muito conhecido por sua aplicação em tumores sólidos principalmente de caráter geniturinário, cabeça e pescoço e pulmões. Porém, a cisplatina tem sido cada vez mais limitada por sua toxicidade renal e neurotoxicidade acumulativa, além de possíveis mecanismos de resistência pelas células tumorais (STATHOPOULOS, 2013).

O mecanismo de ação da cisplatina ainda não está totalmente elucidado, porém sabe-se que este fármaco provoca lesões no DNA e interage com o mesmo formando outro complexo que, além de possuir alta citotoxicidade, também possui a capacidade de inibir a síntese de DNA. O principal efeito colateral da cisplatina descrito em literatura é a nefrotoxicidade, porém este fármaco também provoca taquicardia supraventricular, bradicardia, isquemia aguda, infarto do miocárdio, também está associado à toxicidade vascular, hipertensão e isquemia cerebral (FLOYD et al., 2005; MOHAMADI YARIJANI et al., 2018; OUN; ROWAN, 2017).

Fármacos conhecidos como antimetabólitos, como o 5-fluorouracil (5-FU), atuam inibindo processos biossintéticos essenciais ou sendo incorporados ao DNA ou RNA, impedindo seu funcionamento normal. O 5-FU é muito utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, principalmente colorretal e de mama, além de ser usado em associação com outros agentes quimioterápicos, melhorando o efeito contra o câncer de mama, cabeça e pescoço e o colorretal (CHANDRAN; NATARAJAN; SHAHIMI, 2017).



Os principais efeitos causados pela utilização do 5-FU, correlaciona-se à cardiotoxicidade, provocando isquemia, podendo levar a processos de infarto, sendo utilizado sozinho ou em associações. Na terapia do câncer, este fármaco pode provocar mecanismos de apoptose e necrose geralmente sem muita agressividade, porém a utilização deste, em associação com outros compostos, como o irinotecano, demonstrou alta agressividade (LI et al., 2010).

O Paclitaxel (taxol), foi originalmente extraído da planta *Taxus brevifolia*, por volta de 1967, e posteriormente passou a ser sintetizado no Instituto Nacional do Câncer (NCI – National Cancer Institute), sendo considerado atualmente um dos quimioterápicos mais usados e mais vendidos, com renda de cerca de 1,6 bilhões de dólares (SOFIAS et al., 2017). Este diterpeno, reduz a concentração de tubulina necessárias para a formação de microtúbulos, provocando assim a parada do processo de mitose. De maneira geral, este composto provoca arritmias e bradicardias assintomáticas, porém o taxol é frequentemente utilizado em combinação com antraciclinas, o que gera cardiotoxicidade muito mais severa (WEAVER, 2014).

Uma outra forma de tratar neoplasias malignas é através de imunossupressores como as Ciclosporinas, utilizados principalmente em casos de pacientes transplantados. Este fármaco foi descoberto por volta da década de 70, e tornou-se um dos principais compostos utilizados para promover a sobrevivência de pacientes transplantados, principalmente em tratamento contra leucemias. Atua a nível celular, inibindo a proliferação de linfócitos T através da inibição de TGF $\beta$ , e pela inibição da calcineurina provocando alterações intracelulares como produção de citocinas, inibição do processo de transcrição (BARBARINO et al., 2013; BUXERAUD; FAURE, 2017).

A talidomida foi inicialmente descrita como um sedativo não barbitúrico com baixa toxicidade, porém foi retirada do mercado por volta da década de 60, por conta dos seus efeitos teratogênicos. Esta molécula foi utilizada nas últimas décadas por conta da sua atividade antineoplásica, através dos seus efeitos imunomodulatório e antiangiogênico. A talidomida tem mostrado atividade contra o câncer renal, sarcoma de Kaposi, metaplasia mieloide, síndrome mielodisplásica, entre outros (NAKAMURA et al., 2013).

O mecanismo de ação da talidomida tem sido extensivamente estudado por mais de 50 anos, e mais de 30 proposições já foram fundadas. Dentre as suposições de mecanismos de ação, acredita-se que a talidomida pode agir das seguintes formas: 1) atuando na replicação e transcrição do DNA, 2) síntese e / ou função dos fatores de crescimento, 3) síntese e / ou função das integrinas, 4) inibição da angiogênese, 5) condrogênese e 6) provocando morte ou lesão celular (MENZINGER; LAFFITTE, 2015; RUIZ-MORI et al., 2018; ZHOU et al., 2013).

Tendo em vista a importância clínica da talidomida, é de grande importância conhecer os efeitos colaterais gerados por este composto. Além de teratogênica, a talidomida possui certa nefrotoxicidade, provoca hipertensão, neuropatia periferal, além de constipação, sedação e fadiga, além disso provoca risco de embolia pulmonar e trombose (NAKAMURA et al., 2013).

Em resumo, os tratamentos com quimioterápicos atuais, mesmo sendo eficazes e provocando a redução tumoral, possuem muitos efeitos adversos que podem deixar sequelas e até mesmo levar a morte. Dentre os fármacos mais conhecidos, os efeitos colaterais mais descritos são cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade, como pode ser visto na tabela 01. Dessa forma a pesquisa por novas moléculas obtidas de fontes naturais ou inspiradas nelas são de grande importância para o tratamento farmacológico do câncer, uma vez que as moléculas utilizadas atualmente ainda não são ideais para o tratamento dessa doença.

**TABELA 1:** Efeitos colaterais dos principais quimioterápicos utilizados na atualidade.

<b>Quimioterápico</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Efeito colateral</b>	<b>Referências</b>
<b>Doxorrubicina</b>	Intercalante de DNA, inibição da topoisomerase II	Estresse oxidativo, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade.	(CHEN et al., 2007; FERRANS et al., 1997; GIRI et al., 2004)
<b>Ciclofosfamida</b>	Intercalante de DNA, impede a síntese proteica, provoca a formação de EROS	Leucopenia, imunodepressão, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade.	(FLOYD et al., 2005; GOTTDIENER JS et al., 1981; MONSUEZ et al., 2010; MOTOYOSHI et al., 2006; MULLINS; ANDERSON; SANTOS, 1975)
<b>Cisplatina</b>	Causa lesões ao DNA, provoca citotoxicidade e impede a síntese de DNA e proteínas	Cardiotoxicidade, isquemia, hipertensão, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade gastrointestinal e mielodepressão.	(FLOYD et al., 2005; HARTMANN; LIPP, 2003; STATHOPOULOS, 2013)
<b>5-fluorouracil</b>	Impede processos biossintéticos, liga-se ao DNA e RNA impedindo a síntese de enzimas	Cardiotoxicidade: isquemias e miocardite.	(FLOYD et al., 2005; LI et al., 2010; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003)
<b>Paclitaxel</b>	Erros no processo mitótico (inibição)	Defeitos de condução, neuropatia periférica, hipersensibilidade.	(WEAVER, 2014)
<b>Ciclosporinas</b>	Imunossupressão, inibição da calcineurina	Neurotoxicidade, nefrotoxicidade, hipertensão, hiperglicemia, distúrbios gastrintestinais, infecções oportunistas e malignidade.	(BARBARINO et al., 2013; FLOYD et al., 2005)

<b>Talidomida</b>	Imunomodulação, inibição da angiogênese, morte celular	Nefrotoxicidade, hipertensão, embolia pulmonar e teratogenicidade.	(NAKAMURA et al., 2013; ZHOU et al., 2013)
-------------------	--	--	--

## 2.4 Produtos naturais e Câncer

As moléculas derivadas de fontes naturais, i. e., os produtos naturais, têm um papel de grande valor na descoberta de novos medicamentos, desde as primeiras intervenções farmacológicas realizadas pelo homem. Ao longo dos anos, inúmeros fármacos oriundos de fontes naturais chegaram ao mercado e muitos permanecem em uso na clínica até hoje. Assim, os produtos naturais continuam a ser explorados, na busca por inovação e/ou aprimoramento dos tratamentos de diversas doenças (GOUVEIA et al., 2018).

Segundo a revisão mais recente de Newman (2016), os produtos naturais permanecem líderes em prover a molécula ou inspirar o desenvolvimento de mais de 60 % de todos os novos fármacos aprovados para uso na clínica entre os anos de 1981 e 2014. Ao lado do protagonismo das clássicas fontes, como as plantas e o solo, os produtos de origem marinha vêm conquistando um papel de destaque na história mais recente da Farmacologia (NEWMAN, 2016).

Assim, diversas novas moléculas oriundas de plantas, têm sido descobertas para tratamento de diversos tipos de câncer. (CRAGG; NEWMAN, 2013; GORDALIZA, 2007). Em estudo realizado por Cragg e Newman (2013), entre os anos de 1981 e 2010, cerca de 130 fármacos foram direcionados ao tratamento do câncer, que variam desde compostos complexos como paclitaxel e vimblastina até compostos relativamente simples, como a combretastatina-A4 (HERMAWAN; PUTRI, 2018; SANDERS et al., 2016).

Dentre estes, a vinblastina e a vincristina foram introduzidas pela primeira vez no final dos anos 1960 e contribuíram para remissões e curas de leucemia infantil, teratoma testicular, doença de Hodgkin e muitos outros tipos de câncer, com tratamento a longo prazo. Vários análogos estruturais também estão em uso clínico, e os mais notáveis são vinorelbina e vindesina. O etoposídeo tem seu uso regular para o tratamento efetivo do teratoma testicular e do câncer de pulmão de pequenas células, enquanto o teniposídeo tem eficácia contra leucemia linfocítica aguda e neuroblastoma em crianças e contra linfomas não-Hodgkin e tumores cerebrais em adultos. Porém, dentre as substâncias de origem natural, a mais conhecida, como citado anteriormente, é o Taxol, extraído da planta *Taxus brevifolia*, que mostra eficácia contra o câncer de mama e de ovário refratário, sendo o fármaco anticâncer mais vendido (MANN, 2002; SANDERS et al., 2016).

Além disso, os produtos naturais podem ser obtidos também através de organismos marinhos, como no caso das algas vermelhas, esponjas e corais moles, que logo mostraram produzir várias espécies moleculares únicas, como terpenos altamente halogenados e acetogeninas. A mais promissora das substâncias extraídas de organismos marinhos, é a briostatina 1, que é isolada do briozoário *Bugula neritina*, e tem atividade contra vários tipos de câncer. Tal como acontece com a maioria dos produtos naturais de origem marinha, enormes dificuldades estão associadas a coleta do material (GERWICK; MOORE, 2012).

Estes produtos, podem também ser obtidos a partir de microorganismos, terrestres ou marinhos. Microorganismos têm sido a principal fonte de agentes antibacterianos, mas também forneceram alguns dos principais medicamentos para a quimioterapia do câncer. As mais notáveis são as bleomicinas (Blenoxane), dactinomicina, mitomicina C e as antraciclinas daunomicina e doxorubicina (adriamicina). A grande maioria deles foi introduzida na clínica antes mesmo de seu mecanismo de ação ser elucidado. A doxorubicina, por exemplo é usada no tratamento de leucemia aguda, sarcomas de partes moles e ósseos, câncer de pulmão, câncer de tireoide e linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin. O ácido tiacianico, outra substância de origem através de microorganismos, foi isolado de um endófito da árvore ameaçada, *Torreya taxifolia*, e testado em várias linhagens de células cancerosas e mostrou ser 5 a 10 vezes mais citotóxica em linhagens celulares sensíveis à proteína quinase C, causando morte celular por apoptose (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; KUMAR; ADKI, 2018; MANN, 2002).

## **2.5 Polissacarídeos e suas aplicações**

Os polissacarídeos (PS) naturais são, reconhecidamente, uma fonte de agentes modificadores da resposta biológica e atraem considerável atenção, sobretudo dos pesquisadores da área de saúde, devido às suas propriedades terapêuticas aliadas a uma baixa toxicidade (LEUNG et al., 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Diversos estudos de caracterização dos efeitos imunomoduladores, antitumorais, antimetastáticos, anticoagulantes e de relação estrutura-atividade têm sido realizados com PS isolados de bactérias, fungos, plantas, algas e invertebrados marinhos (BAO et al., 2015; DIVVELA; DUPPALA; KOLAPALLI, 2016; TZIANABOS, 2000).

Os polissacarídeos (PS) consistem em longas cadeias contendo centenas ou milhares de monossacarídeos. São componentes em quase todos os seres vivos, exercendo diversas funções. Além disso, possuem numerosas aplicações biológicas nas mais diversas áreas, assim como na indústria química e farmacêutica. O alto potencial para explorar estes biopolímeros com suas

propriedades estruturais físico-químicas e funcionais têm estimulado a pesquisa de novos polissacarídeos (PANG; WANG; ZHANG, 2018).

Os polissacarídeos naturais são obtidos de vários organismos como algas, plantas, microorganismos e animais, como pode ser observado na tabela 2. Já os polissacarídeos semissintéticos são produzidos pela modificação química ou enzimática das macromoléculas-mãe (ZONG; CAO; WANG, 2012).

**TABELA 2:** Fontes de polissacarídeos naturais utilizados na formulação de materiais e tratamentos.

Origem	Polissacarídeo	Fonte
Algas	Alginato	algas pardas
	Agarana	algas vermelhas
	Carragenana	algas vermelhas
Exsudato de planta	Goma arábica	<i>Acacia spp.</i>
	Tragacante	<i>Astragalus spp.</i>
	Goma do cajueiro	<i>Anacardium occidentale</i>
	Goma do angico	<i>Anadenanthera macrocarpa</i>
Sementes	Guar	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>
	Alfarroba	<i>Ceratonia siliqua</i>
	Tamarindo	<i>T. indica</i>
Frutas	Pectinas	maçãs e laranjas
Tubérculo, cereais	Amido	milho, trigo, batatas
	Inulina	chicória, <i>Jerusalem artichokes</i>
Animais	Ácido hialurônico	humor vítreo de bovinos, cristas de galináceos
	Heparina	pulmão de bovinos e intestinos de porcos
	Quitina	carapaças de crustáceos
	Quitosana	carapaças de crustáceos
	Fungos	Glucanas
Bactérias	Xantanas	<i>Xanthomonas spp</i>
	Dextranas	<i>Leuconostoc spp</i>
	Gelana	<i>Sphingomonas elodea</i>

As estruturas dos polissacarídeos diferem entre si principalmente pela quantidade de açúcares presentes ou pela presença de grupamentos sulfato, como é o caso dos polissacarídeos extraídos de algas marinhas. Esta diferença na estrutura dos polissacarídeos pode determinar suas características físicas e químicas, e além disso, indicar sua possível atividade biológica. A goma do cajueiro por exemplo (polissacarídeo extraído do exsudato de *Anacardium occidentale* L.), é considerada uma mistura de polissacarídeos ácidos sendo composta por cerca de 70% de galactose e de somente 3% de ramnose. Já a goma extraída do angico (*Anadenanthera macrocarpa*), é composta por cerca de 70% de arabinose e 26% de ramnose, o que de certa

forma acaba deixando a molécula um pouco mais hidrossolúvel (RIBEIRO et al., 2016; SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998).

Em contrapartida, a composição de monossacarídeos do polissacarídeo extraído de *Agardhiella ramosíssima*, demonstrou a presença de 45% de galactose e cerca de 27% de glicose, além de outros monossacarídeos. Observa-se, portanto, que estes polissacarídeos naturais possuem composições semelhantes, porém em proporções diferentes. Já os polissacarídeos extraídos de algas marinhas, possuem grupamentos diferentes em sua estrutura, além dos monossacarídeos já conhecidos. O polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha *Gracilaria birdiae* por exemplo, é caracterizado como sendo do tipo ágar, e possui em sua composição majoritariamente galactopiranosose ligada a galactose anidro. Esta característica dá a este polímero uma estrutura mais hidrofóbica. Em relação às proporções dos seus compostos, cerca de 86% são carboidratos, 3% proteínas e 8% componentes sulfatados (BATISTA et al., 2014; SILVA et al., 2012).

Muitos polissacarídeos são estudados há muito tempo para diversas aplicações, como é o caso da quitosana, caracterizado como um polissacarídeo catiônico obtido da desacetilação alcalina da quitina. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose, sendo o principal constituinte do exoesqueleto de crustáceos e insetos, encontrando-se também na parede celular de certos fungos. A quitosana é composta por unidade acetiladas e desacetiladas, unidas por ligações glicosídicas. Um conjunto de propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, propriedades de absorção, capacidade de formar membranas, bioadesividade, atividade contra fungos, bactérias e vírus e poder hemostático, tem contribuído muito para o interesse deste polímero. A aplicação mais conhecida da quitosana, e de certa forma a responsável pela divulgação comercial deste polissacarídeo, tem sido a sua utilização em produtos dietéticos, mais propriamente como inibidor da digestão de gorduras (MOURA, 2012; SHARIATINIA, 2018).

A Carragenana é um termo coletivo para um grupo de polissacarídeos sulfatados extraídos de algas vermelhas marinhas. Esse polímero pode ser encontrado nas espécies *Soliera*, *Eucheuma*, *Maristiella* e *Callophucis*. As carragenanas são classicamente utilizadas como agentes para a indução de inflamação experimental e dor inflamatória. Eles também mostraram várias propriedades farmacêuticas potenciais incluindo atividades antitumorais, imunomoduladoras, anti-hiperlipidêmicas e anticoagulantes. Alguns estudos *in vitro* sugerem que as carragenanas também podem ter propriedades antivirais, inibindo a replicação de herpes e vírus da hepatite A (AI et al., 2018; SUGANYA et al., 2016).

As carragenanas pertencem à família dos galactanos sulfatados lineares hidrofílicos. Os galactanos sulfatados são classificados de acordo com a presença da ponte 3,6-anidro no resíduo de galactona com 4 ligações e a posição e número de grupos sulfato. A carragenana e suas frações são solúveis em água, sendo insolúveis em solventes orgânicos, óleos ou gorduras. No entanto, sua solubilidade em água depende essencialmente dos níveis de grupos sulfato (muito hidrofílico) e de seus cátions associados (AI et al., 2018; CAMPO et al., 2009).

Já em relação a polissacarídeos extraídos de sementes, as galactomananas são caracterizadas como polissacarídeos neutros extraídos geralmente do endosperma de sementes de diferentes espécies da família das leguminosas. O esqueleto polimérico de uma galactomanana clássica apresenta unidades de  $\beta$ -D-manose como cadeia principal, com ligações do tipo éter 1 $\rightarrow$ 4. Os grupos laterais são constituídos por uma unidade de  $\alpha$ -D-galactose, que se encontra presa à cadeia principal pelas posições 1 $\rightarrow$ 6 (CERQUEIRA et al., 2011; ZHOU et al., 2018).

Há alguns anos, estudos científicos realizados por diferentes grupos de pesquisa mostram que os PS naturais apresentam importante efeito antitumoral (FLORÊNCIO et al., 2007; PAIVA, 2003). Além disso, diversas outras aplicações biomédicas tem sido descritas, como por exemplo atividade cicatrizante, como é demonstrado em estudo de Moreira e colaboradores (2015), através da produção de filme a base de polímeros naturais.

Alguns polissacarídeos podem apresentar atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* contra células tumorais, porém a maioria destes só apresenta um efeito considerável em doses elevadas, como é o caso do polissacarídeo sulfatado extraído de *Undaria pinnatifida*, que apresentou atividade contra células de câncer de mama (MCF7), inibindo a proliferação em cerca de 50%, porém este efeito só foi observado na concentração de 200  $\mu$ g/mL. Em relação à eficiência contra a formação de colônias, este polímero também apresentou atividade contra células de câncer de mama, variando entre 60 e 70%, nas concentrações de 25, 100, 200  $\mu$ g/mL (WU et al., 2018).

Outros polímeros podem apresentar atividade citotóxica através da ativação do mecanismo de apoptose por expressão de proteínas apoptóticas como Bax e caspases 3 e 9, reduzindo níveis de Bcl-2 e Bcl-xL (moléculas antiapoptóticas). Além disso, outros mecanismos de atividade foram descritos a nível fisiológico, como aumento TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-4, diminuição de IL-6, e o aumento de células imunes, incluindo linfócitos, macrófagos e células NK (LIU et al., 2018).

Os polissacarídeos podem estimular o sistema imune *in vitro* e *in vivo* e contribuir favoravelmente no processo cicatricial, podendo ser utilizados como materiais para tratamento

biológico. O heteropolissacarídeo proveniente do exsudato do *Anacardium occidentale* L., usualmente chamado de goma do cajueiro, vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando, em estudos preliminares, o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (RIBEIRO et al., 2016; SCHIRATO et al., 2006).

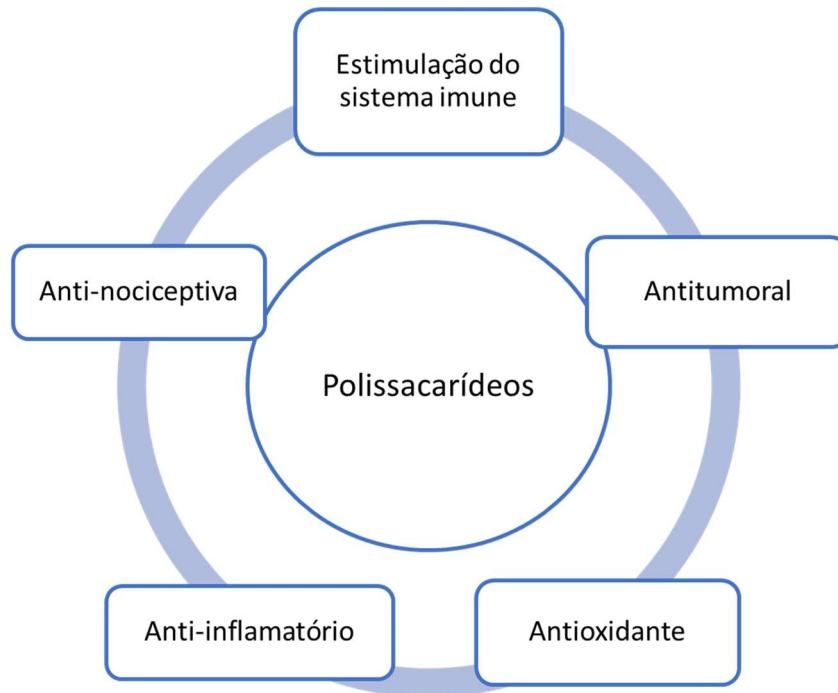
Ainda sobre esta classe de compostos, estudos também demonstram atividade anti-inflamatória de alguns polímeros oriundos de plantas. Em pesquisa sobre a atividade do polissacarídeo extraído de *Agardhiella ramosíssima*, observou-se que este é rico em carragenana e possui atividade anti-nociceptiva e anti-inflamatória em modelo de peritonite em ratos (BATISTA et al., 2014).

Polissacarídeos estão presentes também nas estruturas de algas marinhas como dos gêneros *Fucus* e *Sargassum*. Estes organismos aquáticos produzem polímeros com estruturas diferentes dos encontrados em organismos terrestres e, portanto, podem ter atividades biológicas específicas, como as encontradas no Fucoídan. Estudos sobre a atividade antitumoral deste polímero demonstrou que seu efeito está relacionado à inibição da proliferação celular, induzindo parada do ciclo celular na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, provocando também morte celular através do mecanismo de apoptose, regulando moléculas de sinalização de crescimento e inibindo metástases e angiogênese (SENTHILKUMAR et al., 2013).

Em resumo, como demonstrado anteriormente, há diversas aplicações para os polissacarídeos provenientes tanto de plantas quanto de algas marinhas, como pode ser visto na figura 3, demonstrando assim a grande importância de novas pesquisas a cerca destas substâncias.



**Figura 3** : Aplicações de polissacarídeos naturais



FONTE: própria

### 2.5.1 Goma do cajueiro

A goma do cajueiro (GC) é um polissacarídeo extraído de uma fonte de baixo custo e facilmente disponível, a árvore *Anacardium occidentale*, amplamente distribuída no nordeste do Brasil. O exsudato desta planta pode ser facilmente obtido de forma natural como pode ser observado na figura 4. Considera-se que a goma contém, em peso,  $\beta$ -D-galactose (72-73%),  $\alpha$ -D-glicose (11-14%),  $\alpha$ -D-arabinose (4,6-5%),  $\alpha$ -D-rhamnose (3,2-4%) e ácido  $\beta$ -D-glucurônico (4,7-6,3%). O polissacarídeo GC é composto por uma cadeia principal de  $\beta$ -D-galactose 1  $\rightarrow$  3 ligada a cadeias laterais de galactose e glicose. Os outros monossacarídeos estão presentes como unidades terminais (PITOMBEIRA et al., 2015).

**Figura 4 :** Exsudato de *Anacardium occidentale* L.



FONTE: Disponível em: <http://www.naturezabela.com.br/2011/09/cajueiro-anacardium-occidentale.html>

A goma do cajueiro é muito utilizada atualmente em vários processos biotecnológicos, como por exemplo, agentes de ligação e suspensão, materiais formadores de película, inibidores de cristalização, agentes espessantes, nanoformulações, dentre outros (DE PAULA; RODRIGUES, 1995). É um polissacarídeo hidrofílico e ramificado, com uma massa molecular elevada, porém ainda há uma falta de compreensão de suas propriedades físico-químicas, limitando assim a sua utilização em alimentos e produtos farmacêuticos (RIBEIRO et al., 2016).

Alguns deles também foram utilizados para a preparação de formulações farmacêuticas, devido à sua não toxicidade, baixo custo e alta disponibilidade. Estudos revelaram ainda aplicações terapêuticas, como efeito gastroprotetor (CARVALHO et al., 2015), anti-inflamatório (YAMASSAKI et al., 2015), curativo (MOREIRA et al., 2015), dentre outros.

Em estudo sobre a atividade antidiarreica, Araújo e colaboradores (2015), demonstraram importante atividade deste polissacarídeo. Neste estudo, observou-se que este PS possui atividade antidiarreica em roedores, em suas fases aguda, inflamatória e secretória. Tal efeito provavelmente possa estar ligado à habilidade de inibição de motilidade gastrointestinal, e consequentemente prevenção de acumulação de fluido intestinal e redução da secreção de água e cloretos pelo lúmen intestinal (ARAÚJO et al., 2015).

Da mesma forma, Carvalho e colaboradores (2015), demonstraram que a goma do cajueiro possui atividade de proteção gastrointestinal (GI). Tal atividade foi determinada pela administração em conjunto do polissacarídeo e de drogas anti-inflamatórias não esteroidais, que

naturalmente provocam lesões gastrointestinais. Para avaliação do processo inflamatório foram dosadas enzimas oxidativas, além de testes histológicos e por microscopia. Demonstrou-se através deste estudo que o mecanismo de proteção GI pode estar relacionado ao aumento do muco gástrico aderente e à diminuição da produção de radicais livres e à peroxidação lipídica. Esta atividade pode auxiliar na diminuição de alguns efeitos colaterais gerados pelo tratamento atual do câncer, como náuseas e vômitos.

Foi descrito também atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, na faixa de 20 a 40 mg/mL, onde as bactérias Gram-positivas demonstraram ser mais susceptíveis a este polissacarídeo. Foi possível observar através de técnicas de microscopia de força atômica, alterações morfológicas na estrutura das bactérias, possivelmente devido à interação da goma do cajueiro com a parede bacteriana. Sabe-se que a baixa imunidade de pacientes em tratamento contra o câncer pode provocar o surgimento de infecções oportunistas, o que pode levar a sérios problema e até mesmo a morte. A possibilidade de utilização de um tratamento que possa ser eficaz tanto para bactérias oportunistas, quanto para células tumorais, se mostra promissor para futuras terepêuticas (CAMPOS et al., 2012).

Portanto, o estudo das atividades biológicas dos polissacarídeos é de grande importância, visto que poderia dar origem a uma nova forma de tratamento de doenças, assim como poderia ser utilizado como coadjuvante em tratamentos contra o câncer. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de um polissacarídeo isolado de *Anacardium occidentale L.* sobre a proliferação e a migração de células tumorais, bem como seu potencial antitumoral in vivo em modelo animal de melanoma B16F10, por meio da avaliação do processo de morte celular envolvido no processo de inibição do crescimento tumoral, da toxicidade e da geração de componentes antioxidantes enzimático e não-enzimáticos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

- Avaliar o potencial antitumoral de um heteropolissacarídeo complexo extraído do exsudado do cajueiro *Anacardium occidentale* L em modelos *in vitro* e *in vivo*.

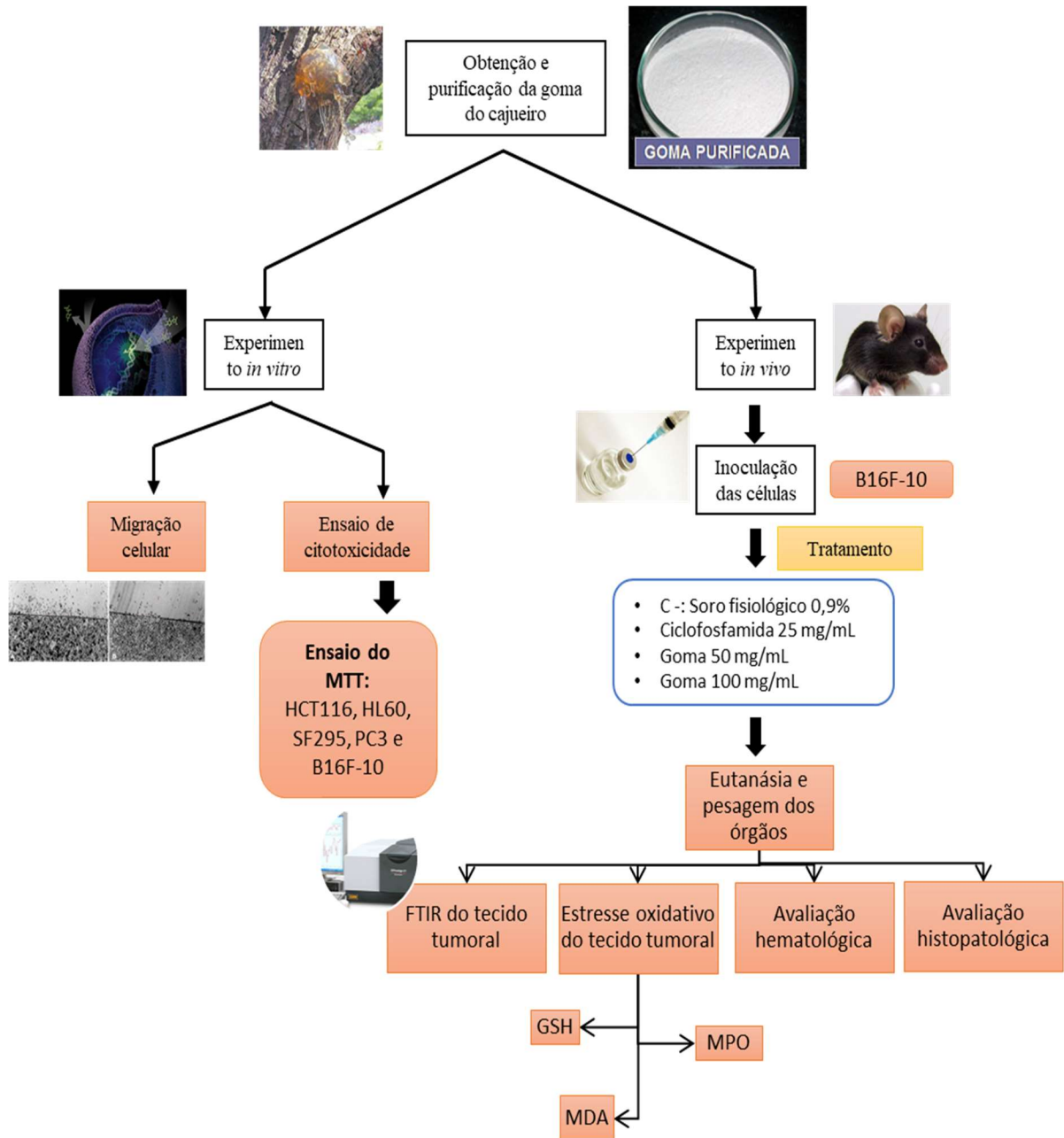
#### 3.2 Objetivos Específicos

- Averiguar a atividade citotóxica da goma do cajueiro em células tumorais humanas e murinas *in vitro* utilizando o teste do MTT;
- Avaliar a migração de células tumorais B16F10 *in vitro* na presença da goma do cajueiro;
- Verificar o potencial antitumoral da goma do cajueiro em modelo de melanoma B16F10 utilizando camundongos C57BL/6;
- Analisar os cortes histológicos do tecido tumoral e de órgãos extraídos dos camundongos tratados com a goma do cajueiro;
- Avaliar os parâmetros hematológicos dos camundongos tratados com a goma do cajueiro;
- Comparar o perfil de morte celular provocado pela goma do cajueiro, frente ao tratamento com fármaco padrão, através do FTIR.
- Analisar a atividade antioxidante *in vivo* da goma do cajueiro, através da dosagem de GSH, MDA e MPO.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenho experimental

**Figura 5** : Desenho experimental da metodologia



## 4.2 Obtenção da Goma do Cajueiro

### 4.2.1. Isolamento e purificação do polissacarídeo obtido do cajueiro *Anacardium occidentale* L.

O processo de isolamento e purificação foi realizada seguindo metodologia descrita por De Paula; Rodrigues (1995).

Para o isolamento, 30 g do exsudado bruto foram dissolvidos em água Mili-Q, e deixados sob agitação durante 24 horas para completa solubilização. Para cada 10 g de exsudado utilizou-se 100 ml de água Mili-Q. Após a solubilização, 2 g de NaCl, para cada 100 ml de água, foram adicionados à solução em agitação. O ajuste de pH para 7 foi realizado com a utilização de NaOH 0,2 M. Para a precipitação o conteúdo foi adicionado em um béquer contendo etanol (300 ml para cada 100 ml de material solubilizado), para a precipitação da goma durante o período de 24 h na geladeira, a solução de goma de cajueiro foi colocada aos poucos para a formação de um precipitado esbranquiçado. O precipitado formado no fundo foi separado do líquido e lavado 2 vezes com etanol para a remoção de água.

Para a purificação o precipitado formado tem que estar no fundo e é necessário retirar grande parte ou o máximo que puder de água presente. Após o descarte da água, foi adicionada uma pequena quantidade de etanol para a primeira lavagem, o procedimento foi realizado mais duas ou três vezes e todo o precipitado foi quebrado.

Logo após as lavagens, o precipitado foi deixado em descanso para a sua precipitação no fundo do béquer, para a retirada do etanol. O excesso de etanol foi retirado e adicionado uma pequena quantidade de acetona (entre 30 e 60 ml) para a remoção do etanol. O precipitado lavado foi depositado em um almofariz ambientalizado com acetona, logo após o precipitado foi seco e macerado em fluxo de ar quente frequente, até a obtenção da goma com coloração bege claro à branco. O rendimento foi pesado e a goma foi reservada.

## 4.3 Estudos *in vitro*

A avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foi realizada no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (LOE-UFC), em colaboração com o Prof. Dr. Manoel Odorico.

### 4.3.1. Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II) e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (NUAIRE, modelo TS Autoflow).

As linhagens tumorais utilizadas foram HL-60 (Leucemia promielocítica aguda), HCT-116 (Carcinoma colorretal), PC-3 (Adenocarcinoma de próstata), B16F10 (melanoma metastático murino) e SF-295 (Glioblastoma). As linhagens foram cultivadas em frascos de cultura de células (25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL ou 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL) em meio RPMI1640 (Gibco) ou DMEN (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). A manutenção foi feita sempre que as células atingiram uma confluência de 80 a 90%. O crescimento das linhagens foi acompanhado diariamente pelo microscópio de inversão (ZEISS, modelo Axiovert 40C).

#### 4.3.2. Estudos de citotoxicidade

##### 4.3.2.1. Método do MTT

O ensaio do MTT é um método colorimétrico que tem como objetivo quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, resultando na formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas, sendo a quantificação realizada por absorbância em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

As células em monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades, em densidade entre  $0,7 \times 10^5$  e  $0,3 \times 10^6$  células/mL. As células foram incubadas durante 72 horas juntamente com a amostra em análise, com concentração variando de 100 a 3,125 µg/mL. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150 µl da solução de MTT a 10% em meio RPMI 1640 e foi incubada durante 3 horas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, o precipitado foi ressuspensionado em 150 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) para a quantificação do sal reduzido (formazan) nas células vivas. As absorbâncias foram obtidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX – 880), utilizando o programa Multimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) no comprimento de onda de 595 nm.

##### 4.3.2.2 Ensaio de migração celular de células de melanoma B16F10 – Wound Healing

O ensaio de migração celular foi baseado no modelo descrito por Chia e colaboradores (2010), com adaptações. Este teste busca avaliar a capacidade de moléculas testadas em inibir a migração de determinadas células através de procedimentos mecânicos.

Para tanto, as células B16F10 foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB, até as mesmas atingirem confluência de

aproximadamente 90%. Foi realizada uma lesão na monocamada de células utilizando uma ponteira (p200) pressionada contra o assoalho da placa de cultura, formando uma fenda na camada de células. A cultura foi lavada três vezes com PBS para retirada completa dos resíduos celulares da fenda formada. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio suplementado com apenas 0,25% de SBF a fim de induzir privação de nutrientes e inibir a proliferação celular. Os poços foram fotografados (aumento 50x) a fim de capturar imagens correspondentes ao tempo zero ( $T_0$ ) de cada poço.

As células foram então tratadas com concentrações não citotóxicas da goma do cajueiro (50 e 100 mg/mL) e o controle negativo recebeu o veículo utilizado para diluição do composto ( $H_2O$  miliQ estéril). A migração celular foi monitorada após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação, até que ocorresse o fechamento do corte induzido pela migração das células do controle negativo. As células foram visualizadas em microscópio óptico e fotografadas novamente no aumento de 50x para fins comparativos (Olympus, Tokyo, Japan).

#### **4.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo***

Todos os estudos foram realizados de acordo com os princípios éticos de manipulação de animais, obedecendo aos critérios de cuidados no manuseio, habitat, alimentação, controle sanitário e genético, minimizando ao máximo a dor durante as experimentações. Para tanto, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará para aprovação dos procedimentos realizados, sendo aprovado com número de protocolo 22/17, como demonstrado no termo em anexo.

##### **4.4.1 Animais**

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Foram utilizados 64 camundongos (*Mus musculus*, linhagem C57BL/6) fêmeas, com idade de 4-5 semanas, pesando aproximadamente 25 g.

Os animais foram acondicionados em gaiolas confeccionadas em polisulfona, medindo 44x31x21 cm, com grade aramada em aço inoxidável, comedouro e encaixe para bebedouro. As tampas contêm filtros micro isoladores e a sala de experimentação possui sistema de exaustão. A higienização e desinfecção das gaiolas foram realizadas após cinco dias em estação de troca/cabine de biossegurança. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ C$ ) com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro e umidade relativa de 60%. Os mesmos tiveram acesso *ad libitum* à água potável da rede pública, sendo alimentados com ração comercial (Nuvilab®) *ad libitum*. Os animais foram



mantidos em cama com maravalha irradiada, sendo aclimatados por sete dias antes do início do experimento.

A manutenção e manipulação dos animais durante a execução do projeto, eutanásia e descarte das carcaças foram realizados em consonância com as resoluções do Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA (CONCEA, 2016). Os procedimentos adotados no uso de animais foram submetidos a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Ceará e supervisionado por um médico veterinário.

#### 4.4.2 Avaliação do efeito antitumoral do polissacarídeo isolado do cajueiro *Anacardium occidentale L.* em camundongos transplantados com melanoma murino B16F-10.

A indução experimental do tumor foi realizada utilizando células transplantáveis de melanoma murino (B16F-10), cultivadas primariamente *in vitro*, e posteriormente transferidas aos animais. Esta linhagem foi estabelecida por Fidler (1973) oriunda do melanoma de ocorrência natural de camundongo C57BL/6. As células foram inoculadas via subcutânea na região axilar esquerda de camundongos C57BL/6 fêmeas. Os animais foram divididos em grupos de 8 animais, onde o grupo de tratamento recebeu duas doses distintas do polissacarídeo isolado sendo estas, 50 mg/mL e 100 mg/mL durante 15 dias consecutivos. As doses foram escolhidas de acordo trabalhos anteriores para experimentos *in vivo* com o mesmo polissacarídeo como o de Araújo e colaboradores (2015). Vinte e quatro horas após o último dia de tratamento, os animais foram anestesiados com Xilazina (10 mg/kg) e Ketamina (90 mg/kg) e o sangue foi coletado via infraorbital para análise bioquímica. Os animais foram eutanasiados por hipovolemia. Os órgãos (fígado, baço, rins, pulmão) e o tumor foram coletados por meio de técnicas cirúrgicas, foram pesados e armazenados em Formol 10% para posterior análise histopatológica.

Foi utilizada como via de administração a via intraperitoneal para todos os tratamentos. O polissacarídeo foi administrado nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia. A ciclofosfamida foi utilizada como controle positivo na dose de 25 mg/kg/dia, visto que o mesmo provoca redução tumoral em cerca de 70%, sendo assim utilizada como fármaco padrão para o tratamento desta doença, e a salina a 0,9% foi utilizada como controle negativo, já que não provoca redução tumoral. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados e eutanasiados.

A progressão do crescimento tumoral foi acompanhada por meio da mensuração do tamanho do tumor, utilizando paquímetro digital, a partir décimo terceiro dia do experimento, quando o tumor já era mensurável (palpável) em todos os animais dos grupos, até o décimo

sexto dia (último dia de tratamento). Para calcular o volume tumoral (mm<sup>3</sup>) foi utilizada a seguinte fórmula (STEEL, 1977):

$$\text{Volume do tumor (mm}^3\text{)} = (D \times d^2)/2$$

Onde:

D = medida do diâmetro maior (mm).

d = medida do diâmetro menor (mm).

O percentual de inibição tumoral (IT) foi calculado a partir da fórmula:

$$\text{IT(\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde: A = média dos pesos dos tumores no grupo controle

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados

#### *Análise estatística dos dados*

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de cada grupo. Para verificação da ocorrência de diferenças estatísticas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido por Teste de Tukey's, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0.

#### 4.4.3 Análise morfológica e histopatológica dos tecidos

A coloração por hematoxilina e eosina, é uma técnica que permite avaliar a morfologia celular, já que permite diferenciar o citoplasma do núcleo e, conseqüentemente, a análise de estruturas celulares. Esta técnica permite analisar alterações que possam estar ocorrendo, e assim permitir sugerir os efeitos tóxicos causados pelo composto em teste.

Após o período de teste e o sacrifício dos animais, o tumor, baço, rins, fígado e pulmões foram retirados, pesados e fixados em solução tampão de formol a 10%. Para a preparação das lâminas, os tecidos foram retirados da solução de formol e seccionados em micrótomo. O material então foi fixado em formol a 10% por 24h, desparafinado em xilol por 15 minutos, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico até 70%, lavadas com água destilada e coradas com hematoxilina e eosina.

#### 4.4.4 Análise do tecido tumoral por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica permite demonstrar o perfil de variação dos constituintes teciduais a partir da análise dos espectros de transmissão em diferentes números de onda. É possível avaliar grupamentos específicos que podem indicar alteração e/ou indução de certos componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, entre outros, permitindo assim identificar diferenças ou semelhanças entre os tecidos análises e assim determinar possivelmente o mecanismo de morte gerado.

Para análise dos tecidos por FTIR, 100 mg de tecido foram desidratados com etanol em soluções gradativas de 70, 80, 90 e 100%, por uma hora em cada solução. Foi utilizado espectrômetro na região do infravermelho Shimadzu IRAffinity-1S, na faixa espectral de 4000 a 700  $\text{cm}^{-1}$  de resolução, com modulo ATR (Atenuated Total Reflectance). Todas as análises foram feitas com 45 scans, em cristal de seleneto de zinco.

#### 4.4.5 Avaliação de estresse oxidativo através de quantificação de GSH, MDA e MPO

Para a realização da dosagem de componentes antioxidantes, utilizou-se o tecido tumoral retirado dos animais. Utilizou-se 5 amostras para cada grupo.

##### **4.4.5.1 Glutathiona reduzida (GSH)**

A glutathiona reduzida é um antioxidante hidrossolúvel, muito importante nos sistemas vivos. Está relacionada com a metabolização de peróxido de hidrogênio e desativação de radicais livres no ambiente tecidual. Condições severas de estresse aumentam os números celulares e extracelulares de GSH, assim, este componente pode ser encontrado na forma reduzida, após reação com radicais peróxido.

Preparou-se um homogenato do tecido a 10% de EDTA (ex. 100 mg de tecido em 1mL de EDTA 0,02  $\mu\text{M}$ ), macerado e ultraturrax. Colocou-se em um eppendorf, 400  $\mu\text{L}$  de homogenato + 320  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada + 80  $\mu\text{L}$  de ácido TCA 50%. Centrifugou-se a 4°C (3000 rpm por 15 min). Transferiu-se 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para um outro eppendorf e adicionou os seguintes componentes:

- ✓ 320  $\mu\text{l}$  de tampão de TRIS 0,4 $\mu$  pH =8,9
- ✓ 20  $\mu\text{L}$  de DTNB 0,01  $\mu\text{M}$  (preparado na hora – FOTOSSENSÍVEL)

Agitou-se por 3min após colocar o DTNB e realizou-se a leitura no Espectrofotômetro a 412 nm.

#### **4.4.5.2 Malondialdeído (MDA)**

O malondialdeído é um produto final da peroxidação lipídica que contribui para a reação inflamatória por ativação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\beta$  e IL-8. O processo inicia-se pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos. Este composto é utilizado como parâmetro para determinar o aumento de radicais livres no tecido.

Preparou-se um homogenato do tecido a 10% em KCL 0,15 M. Adicionou-se 1,5 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 1% em um tubo de ensaio, com 250  $\mu$ L do homogenato e 500  $\mu$ L de solução de ácido Tiobarbitúrico 0,6%. Colocou-se os tubos com a mistura em banho Maria a 100° por 45 min. Resfriou em água corrente (realizou choque térmico em uma bacia com água gelada e gelo). Após o resfriamento, adicionou-se 2 mL de n-butanol. Agitou-se no vortex por 1 minuto, centrifugou-se a 4000 rpm por 25 min. Retirou-se a fase butanólica (sobrenadante) para a leitura em 520 e 535 nm.

#### **4.4.5.3 Mieloperoxidase (MPO)**

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada principalmente em células de defesa como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Os produtos oxidativos gerados pela MPO estão relacionados a inúmeros processos de danos teciduais. Devido a isso, acredita-se que esta enzima está relacionada a patologias de diferentes doenças como aterosclerose, câncer, esclerose e Alzheimer (JI; PENG; WANG, 2018).

Para quantificação desta proteína, pesou-se as amostras (no máximo até 100mg) e adicionar HTAB na proporção de 1:20 (1mg de tecido para 20  $\mu$ L de HTAB). Macerou-se as amostras em ultraturrax. Centrifugou a 4.500 rpm por 20 min a 4° C.

A solução de leitura foi preparada da seguinte forma:

- ✓ 27 mL de água destilada
- ✓ 3 mL de tampão fosfato
- ✓ 15  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1%
- ✓ 5 mg de o-dionisidina

Para a leitura das amostras, colocou-se em uma placa de Elisa 10  $\mu$ L do sobrenadante da amostra e 200  $\mu$ L da solução de leitura em duplicata ou triplicata e realizar a leitura a 450 nm.

#### ***4.4.5.4 Análise estatística dos dados***

Os dados foram analisados a partir das média e erro padrão da média dos grupos. A análise da diferença estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prism 6.0, onde utilizou-se os testes de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Dunnet.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

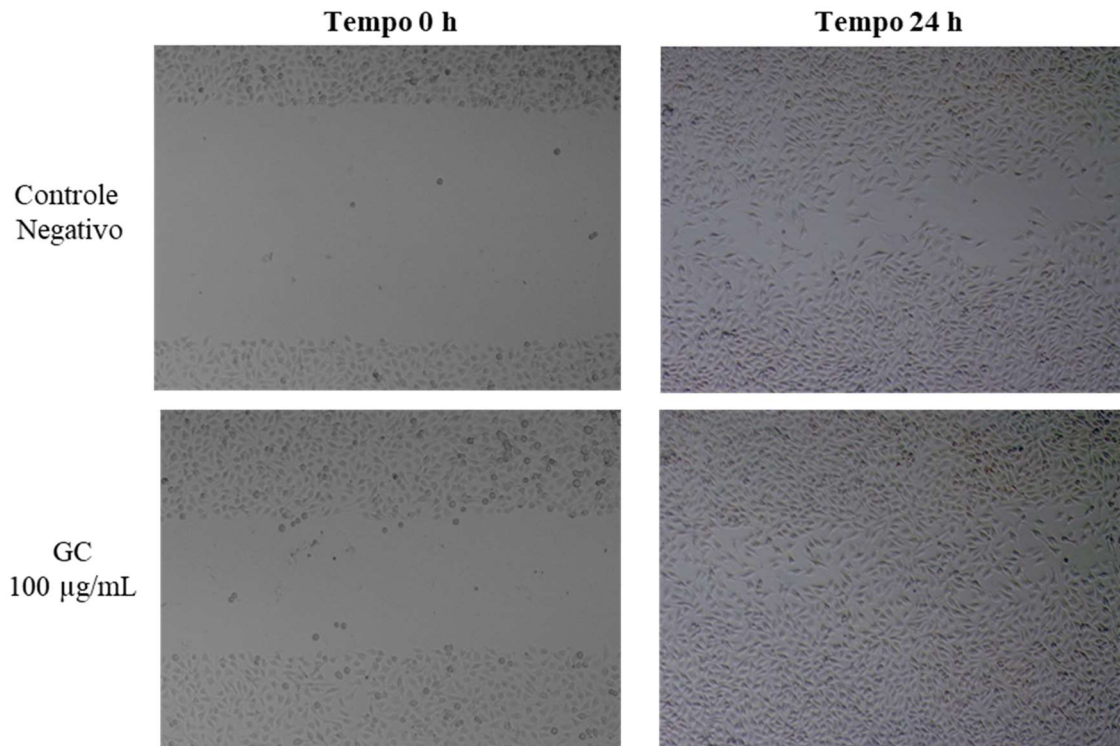
No presente trabalho, objetivou-se avaliar o perfil citotóxico e antitumoral *in vitro* e *in vivo* do heteropolissacarídeo isolado do cajueiro (*Anacardium occidentale*), para isso iniciou-se a pesquisa estudando o efeito citotóxico da goma do cajueiro em diversas linhagens celulares tumorais humanas e murinas através do teste do MTT. Nesse ensaio não foi observado efeito citotóxico em nenhuma das linhagens celulares testadas (HL-60, HCT-116, SF-295, PC-3 e B16F-10) nos modelos *in vitro*, em concentrações de até 100 µg/ml.

Este fato corrobora com dados da literatura que mostram que alguns polissacarídeos ácidos obtidos de plantas e algas não apresentam atividade citotóxica *in vitro*. Autores, como Yang et al., (2013) e Sarika et al., (2015) relataram que a baixa ou a ausência citotoxicidade de polissacarídeo em células tumorais pode estar relacionada ao tamanho da cadeia de heteropolissacarídeo, que é incapaz de penetrar na membrana celular, além dos grupamentos presentes nas extremidades do polímero que não possuem efeito a nível celular, não tendo assim atividade tanto em células normais como as cancerosas. Contudo, outro estudo relata o uso de modificações de polissacarídeos como carboximetilação, quaternização, metilação, entre outros, que podem melhorar efeitos biológicos das gomas, como por exemplo efeito antibacteriano (QUELEMES et al., 2017).

Porém, outros autores sugerem que este efeito citotóxico dos polissacarídeos ácidos, pode estar relacionado à atividade mediadora como demonstrado nos dados de Divvela et al, (2016), referente ao uso dos polissacarídeos naturais como via de controle e proliferação de células cancerígenas em modelos *in vivo*. Já em estudo recente de Wu e colaboradores (2018), um polissacarídeo sulfatados extraído da alga marinha *Undaria pinnatifida* apresentou efeitos citotóxicos em células tumorais de mama (MCF-7), gerando morte celular por apoptose além de inibir a migração dessas células tumorais, em concentrações acima de 200 µg/mL. Assim decidiu-se, portanto, avaliar os efeitos antimigratórios da goma do cajueiro frente as células de melanoma metastático B16-F10,

No ensaio de migração celular *in vitro*, não foi observado efeito inibitório sobre a migração celular da goma do cajueiro na concentração de 100 µg/ml, não sendo assim possível, sugerir que este polissacarídeo isolado de cajueiro possa interferir na migração desse tipo celular (figura 6). Os resultados encontrados contrastam com os dados de Mishima e colaboradores, (1998), que observaram uma redução significativa da migração celular em modelo *in vitro* com células metastáticas de melanoma da linhagem B16-BL6, quando colocadas em contato com polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Spirulina platensi*.

**Figura 6** : Ensaio de migração para goma do cajueiro (GC) na concentração de 100 µg/mL. As células do controle negativo tratadas com o veículo de diluição (PBS)



Polissacarídeos extraídos de algas marinhas, geralmente possuem em sua estrutura uma porção sulfatada, ou seja, um grupamento  $\text{SO}_4$  em uma das extremidades, o que possivelmente fornece as características de utilização biológica a esses polímeros, assim como descrito por Mishima e colaboradores (1998). A goma do cajueiro não possui em sua estrutura química nenhum grupamento sulfato, e possivelmente o resultado negativo relacionado à migração celular obtido neste teste está relacionado a esta característica.

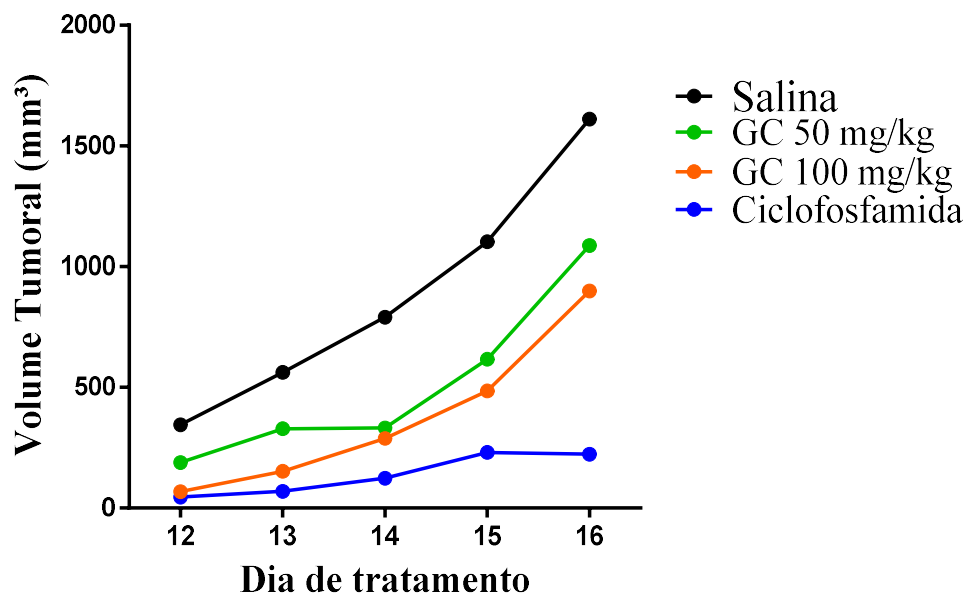
Assim como demonstrado em trabalho de Jeff e colaboradores (2016), alguns polissacarídeos naturais podem exibir efeitos anticâncer *in vivo* devido a ação imunomodulatória, através do recrutamento de macrófagos e estresse oxidativo. Alguns desses efeitos já foram descritos e podem demonstrar resultados diferentes quando comparado ao efeito *in vitro*, já que, por ter uma estrutura relativamente grande, o polissacarídeo muitas vezes não possui a capacidade de entrar na célula, não exercendo portanto sua atividade a nível celular e sim a nível fisiológico, objetivando assim os testes *in vivo* realizados neste trabalho.

Assim, devido ao suporte da literatura que demonstra que alguns polissacarídeos naturais não apresentam atividade *in vitro*, mas mesmo assim apresentam atividade *in vivo* foi decidido averiguar se a goma do cajueiro apresenta efeitos antitumorais *in vivo* em camundongos C57BL/6 transplantados com células de melanoma metastático B16-F10. Foi observado que os

animais tratados com 50 e 100 mg/kg/dia de goma do cajueiro, inibiram cerca de 50% do crescimento, em relação ao grupo Controle negativo. Enquanto que o controle positivo (ciclofosfamida) reduziu cerca de 75% do crescimento tumoral comparado com o Controle negativo (Gráficos 1A e 1B).

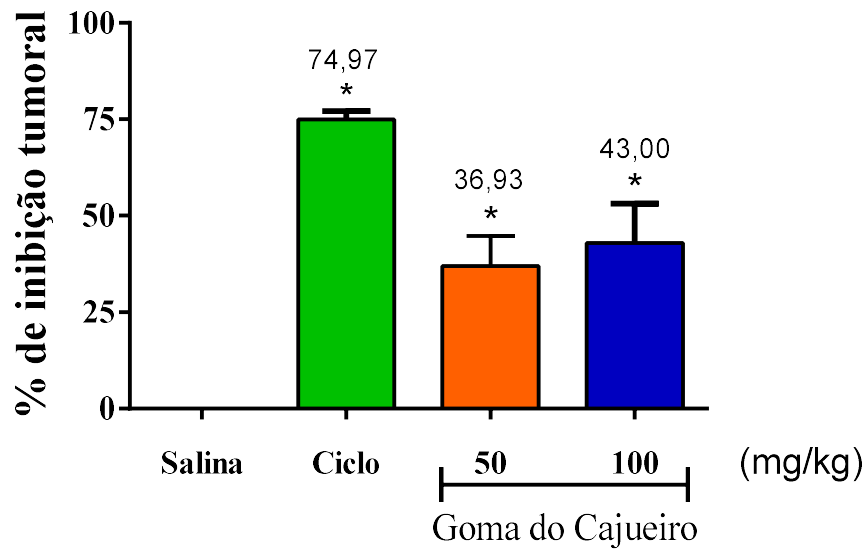
**GRÁFICO 1:** Efeito antitumoral in vivo da goma do cajueiro nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia sobre a proliferação tumoral de camundongos C57BL6 transplantados com melanoma B16F10. O grupo controle negativo (C-) foi tratado com soro fisiológico 0,9% e o grupo controle positivo (C+) foi tratado com ciclofosfamida (25 mg/kg/dia). **(A)** Mensuração diária do volume tumoral, utilizando paquímetro digital, a partir do décimo segundo dia de tratamento até o dia da eutanásia dos animais. **(B)** Percentual de crescimento tumoral com base no peso do tumor após excisão cirúrgica.

**(A)**





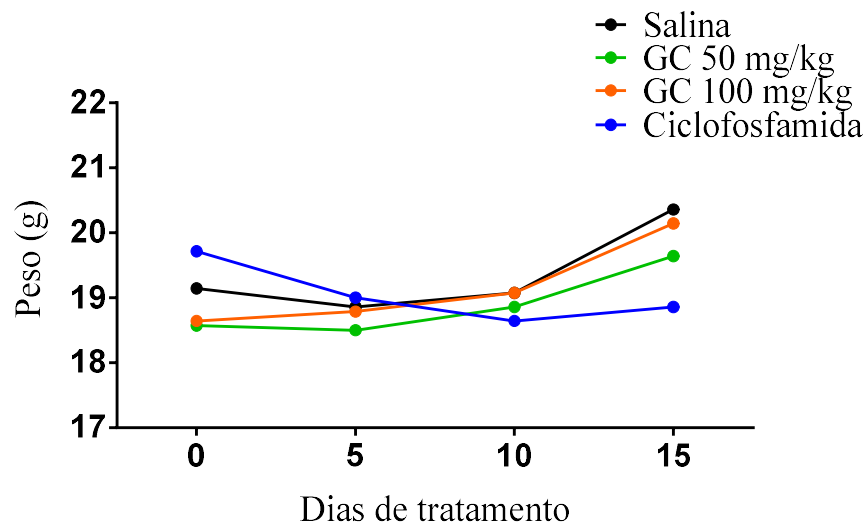
(B)



Legenda: (\*)  $p < 0,05$ .

De acordo com o gráfico 3, observou-se que a substância padrão utilizada para o tratamento de melanoma causa perda de peso dos animais, fato não observado no tratamento com a goma do cajueiro, onde na maior dose utilizada (100 mg/kg/dia), não se observou esta característica. Essa perda de peso pode indicar uma das principais evidências de que o fármaco em estudo possa estar gerando toxicidade ao animal (efeitos não desejados). A perda de peso não foi observada nos animais tratados com a goma do cajueiro, podendo assim indicar possível ausência de toxicidade sistêmica.

**GRÁFICO 2:** Curva de peso dos animais durante os 15 dias de tratamento com Goma do cajueiro (CG) nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia. O controle negativo foi administrado Soro Fisiológico 0,9%. Ciclofosfamida (25 mg/kg/dia) foi utilizada como controle positivo.



O mecanismo utilizado pelo polissacarídeo extraído de *Anacardium occidentale* L. para explicar o seu efeito antitumoral, ainda não foi elucidado. Em relação a polissacarídeos ácidos, em estudo sobre a atividade antitumoral de polissacarídeo extraído de *Phellinus linteus*, contra células de melanoma metastático murino (B16F10), observou-se que este efetivamente inibe metástases tumorais. Em termos de seu modo de ação, verifica-se que o polímero ativa funções de macrófagos e inibe a adesão e a invasão de células cancerígenas (HAN et al., 2006).

Após observar que a ciclofosfamida reduzia o peso dos animais e que a goma do cajueiro não, aliado aos dados da literatura que demonstra que fármacos citotóxicos, como a ciclofosfamida, geralmente geram potentes efeitos adversos (CARR; NG; WIGMORE, 2008; VEAL et al., 2016), decidiu-se avaliar a toxicidade dessas moléculas frente aos principais órgãos metabólicos do organismo. Para isso, realizou-se a pesagem do pulmão, rins, fígado e baço dos animais, para identificar se houve crescimento ou diminuição dos órgãos podendo demonstrar possíveis alterações morfológicas e/ou fisiológicas, como demonstrado no gráfico 3.

De acordo com os resultados obtidos na pesagem dos pulmões dos animais, observou-se diferença significativa entre os grupos Ciclofosfamida e Controle negativo. Em relação às possíveis alterações nos rins, observou-se no gráfico 3 diferença significativa no grupo controle positivo (Ciclo – ciclofosfamida, 25 mg/kg/dia), quando em comparação com o grupo controle negativo (C-), onde foi utilizado somente o veículo de diluição das substâncias. Os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida pertencente à classe de mostardas nitrogenadas, produzem efeitos tóxicos marcantes por atuarem tanto nas células neoplásicas como nas células normais em divisão. (BATIST et al., 2016; FERDINANDI; FERREIRA, 2009).

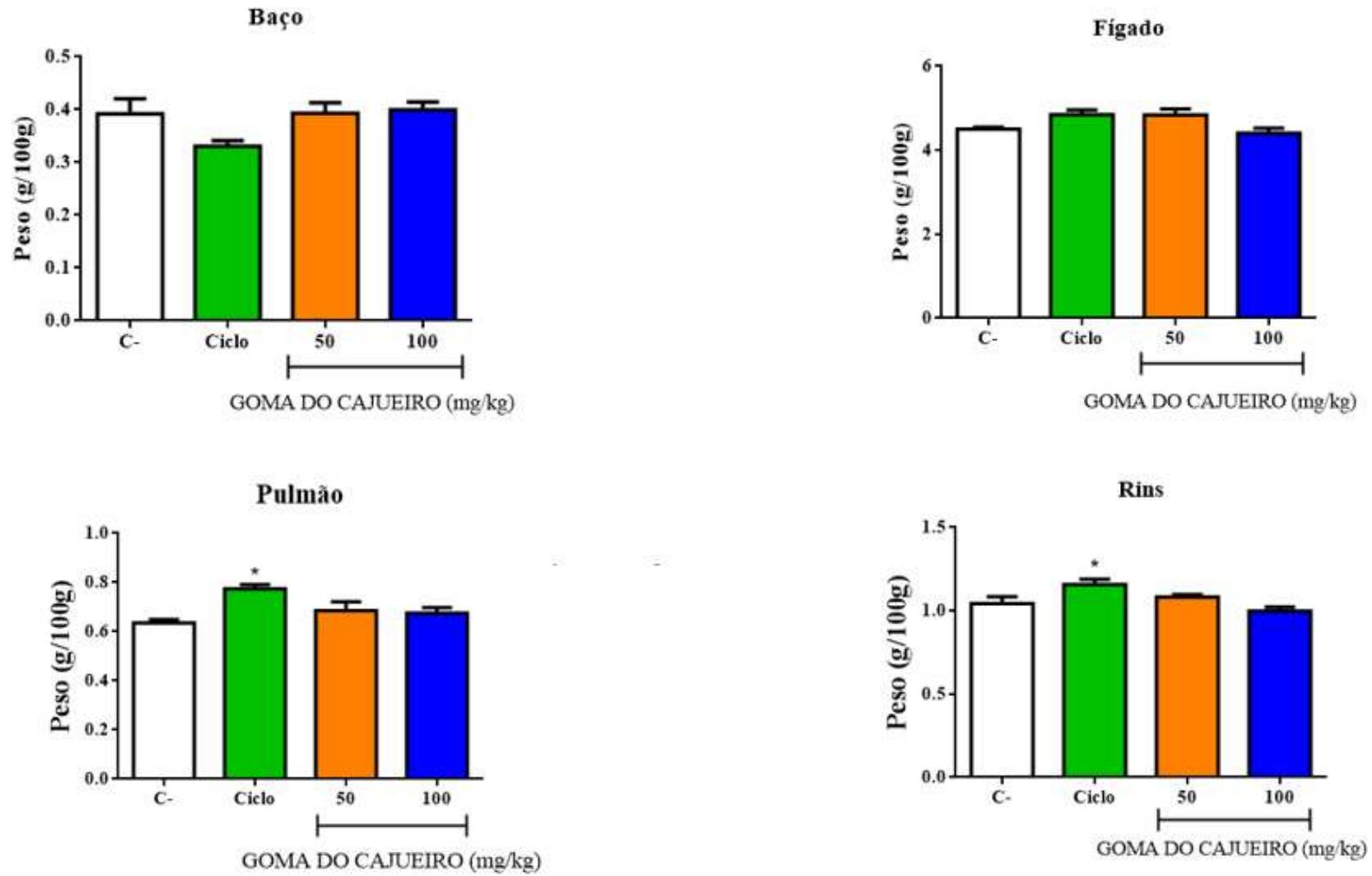
A ciclofosfamida provoca diminuição na celularidade e no peso dos órgãos, além de funcionar como uma droga supressora do sistema imune, diminuindo a quantidade de linfócitos, podendo provocar uma série de quadros clínicos como depressão da medula óssea, cistite hemorrágica, alterações gastrointestinais, infecções oportunistas, entre outros (BIN-HAFEEZ et al., 2001; SELVAKUMAR et al., 2006).

Autores afirmam que a utilização de polissacarídeos naturais para atividades biológicas é de grande vantagem, visto que possuem baixíssima ou nenhuma toxicidade e que seus efeitos estão mais relacionados à imunomodulação, como aumento de infiltração de células T, células B e macrófagos no tecido tumoral, prevenção de metástases e equilíbrio de Th1 e Th2 (células T modificadas, especializadas no sistema imune adaptativo) (LEUNG et al., 2006)

Sendo o baço um dos principais órgãos relacionados a depósito de células sanguíneas, além de participar do metabolismo de algumas substâncias, é de grande importância a observação de alterações morfológicas neste órgão. Não se observou neste estudo alterações significativas do peso do baço dos animais em nenhum dos grupos, como pode ser observado no gráfico 3.

Em relação ao peso do fígado, não foi observado diferença significativa entre os grupos analisados, demonstrando possivelmente que nem o agente alquilante utilizado como controle e nem o polissacarídeo testado, provocaram alterações nas células hepáticas, como pode ser observado no gráfico 3.

**GRÁFICO 3:** Gráficos dos pesos dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento com a goma do cajueiro. C- (salina), Ciclo (ciclofosfamida 25 mg/kg).



Legenda: (\*)  $p < 0,05$ .

De acordo com a análise histopatológica destes órgãos, nos grupos tratados com a goma do cajueiro, não foram demonstradas lesões e alterações significativas em relação aos controles, com o fígado apresentando estruturas anatômicas normais com presença de processo hemorrágico no sistema porta, os rins com estrutura glomerular preservada, o baço com presença de megacariócitos e os pulmões com estrutura alveolar preservada com presença de infiltrado hemorrágico.

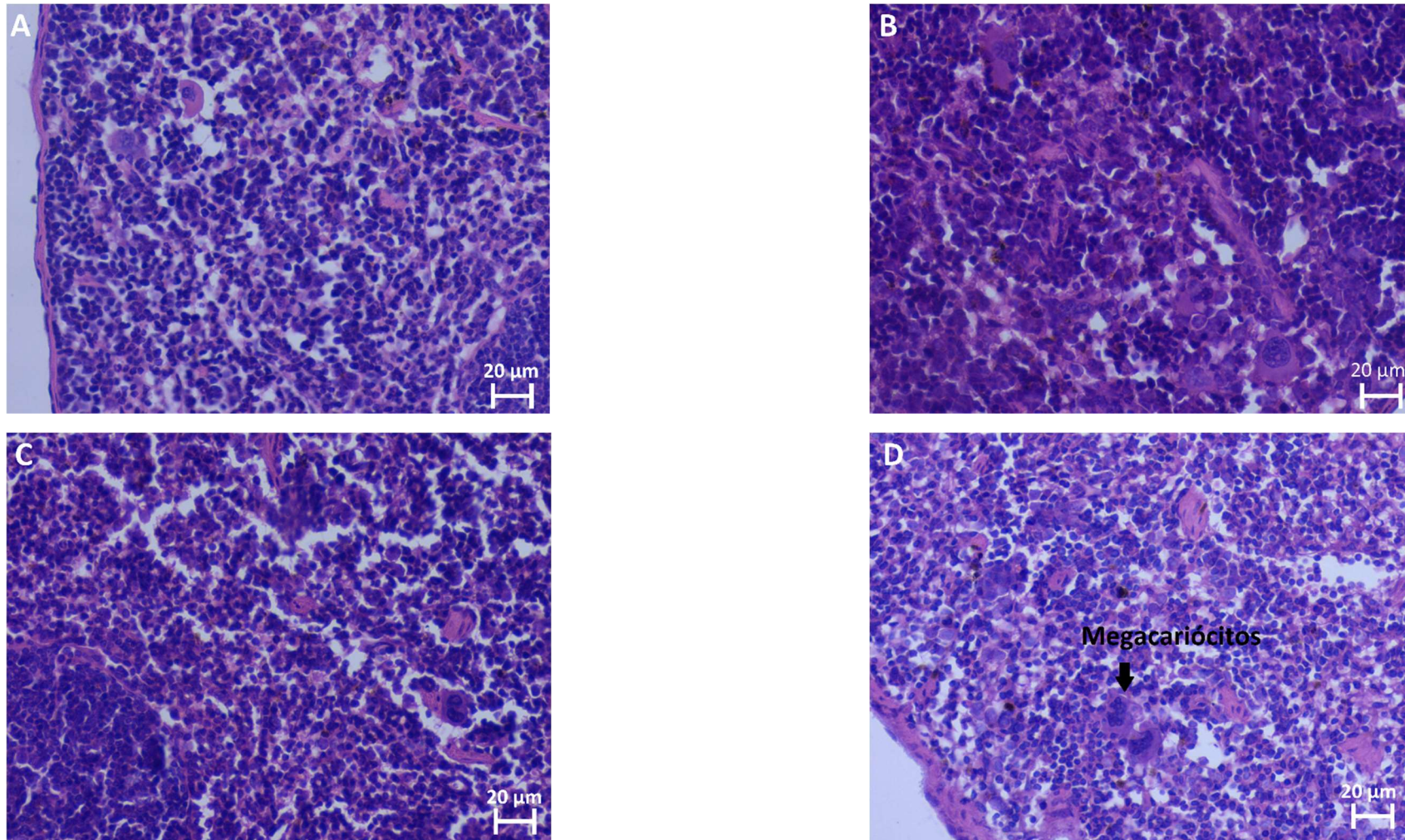
No grupo tratado com ciclofosfamida foram encontrados sinais de toxicidade no rim, no fígado e nos pulmões, como: focos inflamatórios e hemorragia no sistema porta-hepático (figura 8), sinais de hemorragia glomerular fraca passível de reversão (figura 9) e intenso infiltrado hemorrágico nos tecidos alveolares (figura 10). No baço não foi encontrado nenhum sinal de alteração em relação ao controle negativo (figura 7).

Já no tumor, em todos os grupos foi encontrado células com característica de intensa atividade proliferativa e áreas de morte celular. O controle negativo (veículo), apresentou grande número de células, sendo as mais internas com presença de morte celular com características de apoptose e necrose, relacionadas principalmente à morte celular fisiológica por conta do crescimento avançado do microambiente tumoral e hipóxia, ou seja, falta de oxigênio e nutrientes para as células (figura 11).

O grupo controle positivo (ciclofosfamida), apresentou pouca quantidade de células, com presença de inúmeros vacúolos e intensa morte celular na superfície do tumor, com a presença de vários restos celulares, podendo estar relacionado ao processo de apoptose e necrose. Já os grupos tratados com o polissacarídeo do cajueiro, também demonstraram uma quantidade menor de células em relação ao controle negativo, porém apresentaram maior número de células em relação ao controle positivo, sendo que grande parte se encontrava em processo de morte celular característico de apoptose, com a presença de condensação de cromatina (figuras 12 e 13).

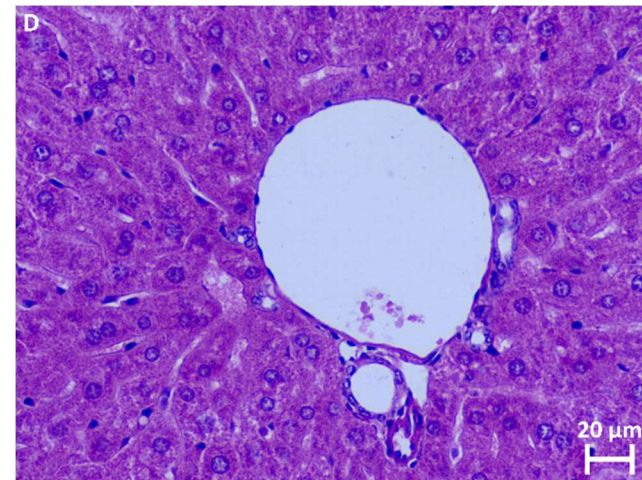
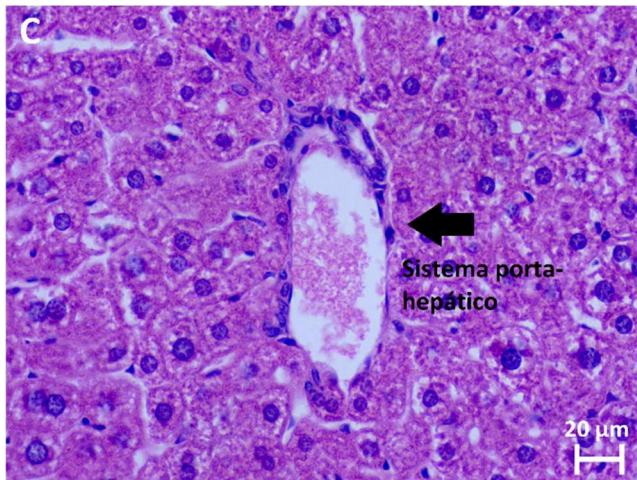
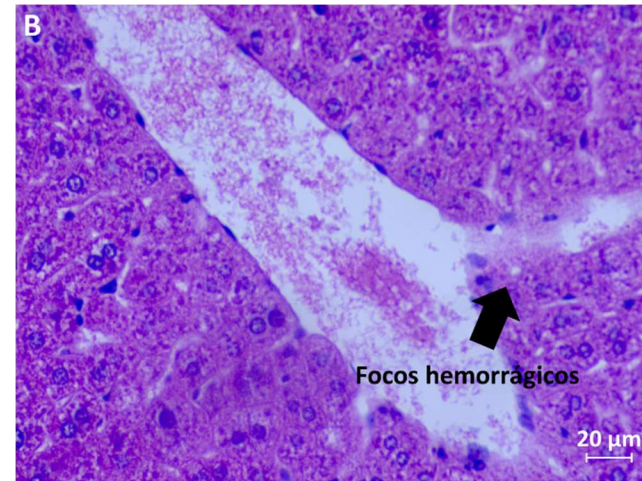
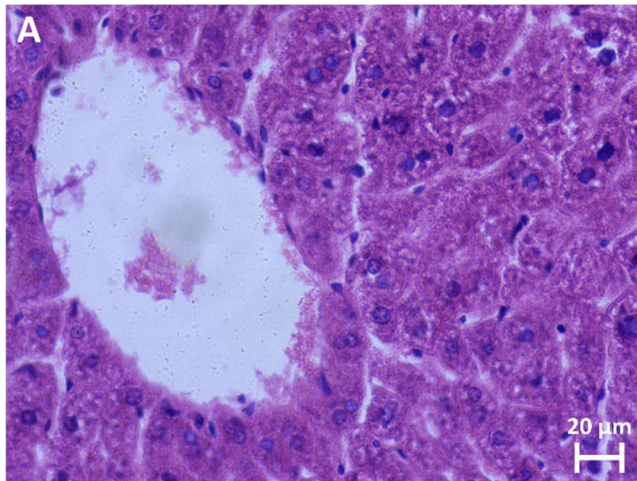
Estes resultados sugerem que a goma do cajueiro auxilia no processo de morte celular por apoptose, podendo ou não estar relacionado com a presença de células de defesa no tecido tumoral. Não foi possível diferenciar os tipos celulares neste tecido para evidenciar a presença de leucócitos ou macrófagos.

**FIGURA 7:** Fotomicrografia do baço de camundongos (*Mus musculus*) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento, demonstrando tecido morfológicamente normal. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância, o controle positivo foi tratado com ciclofosfamida na dose de 25 mg/kg/dia (B), já os tratamentos foram realizados com goma do cajueiro nas doses de 50 (C) e 100 mg/kg/dia (D) via intraperitoneal. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



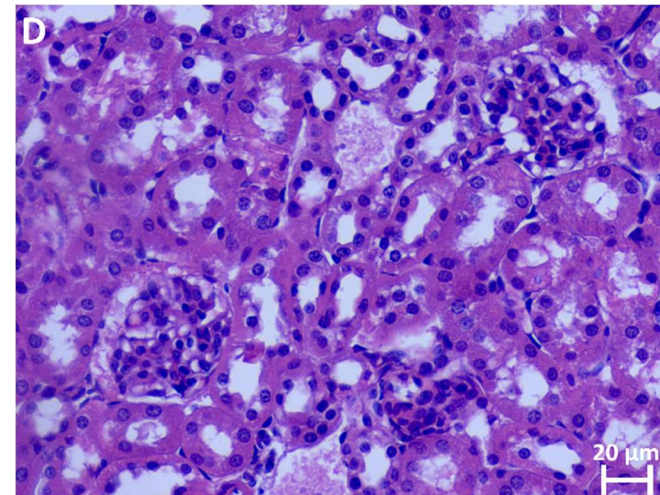
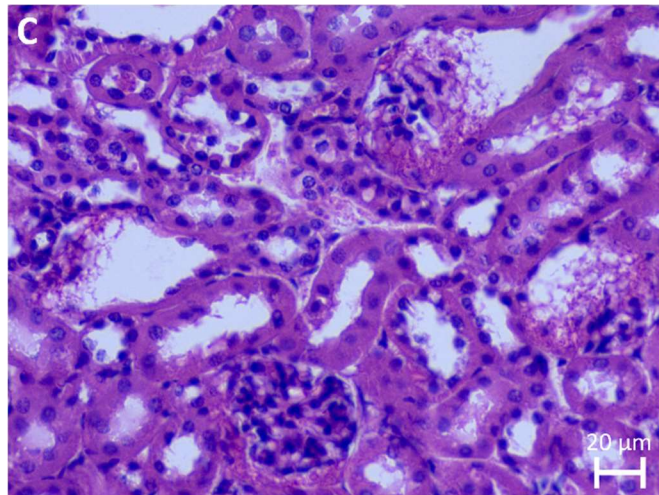
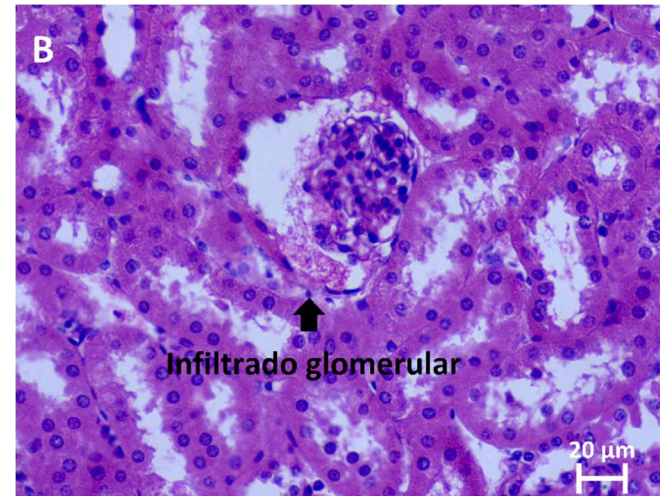
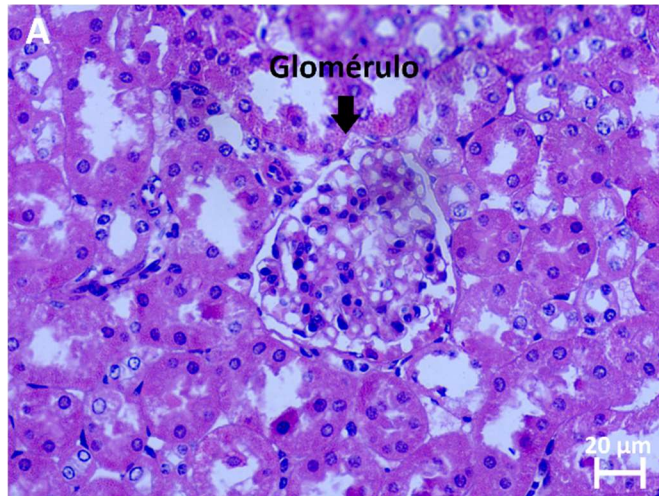


**FIGURA 8:** Fotomicrografia do fígado de camundongos (*Mus musculus*) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância, o controle positivo foi tratado com ciclofosfamida na dose de 25 mg/kg/dia (B), pode-se observar nesta imagem a presença de focos hemorrágicos no sistema porta-hepático, já os tratamentos foram realizados com goma do cajueiro nas doses de 50 (C) e 100 mg/kg/dia (D) via intraperitoneal. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



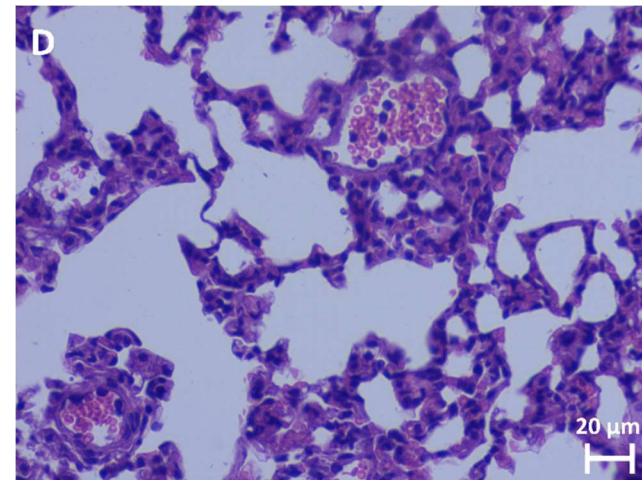
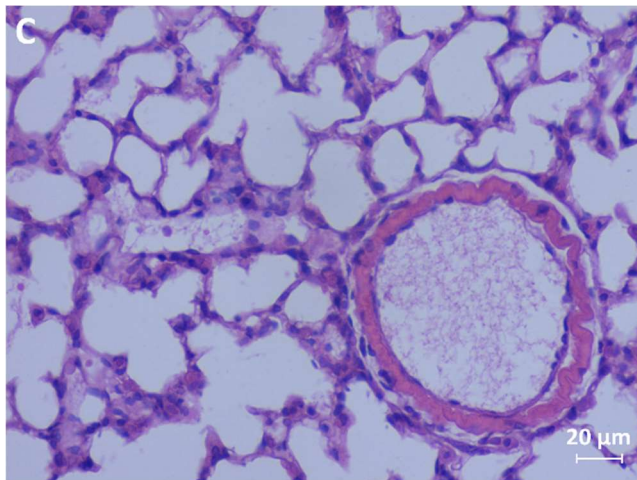
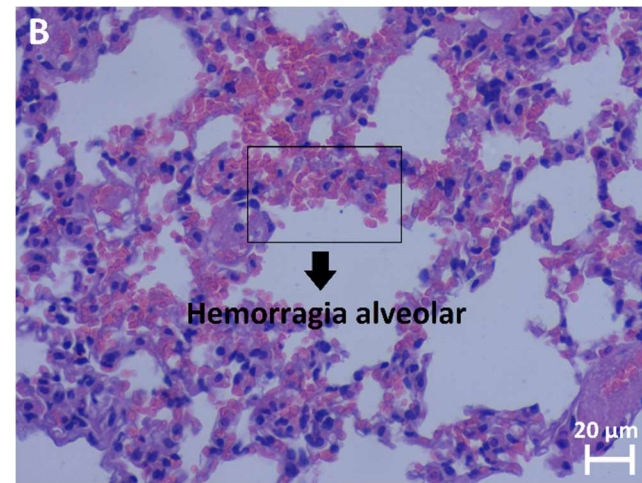
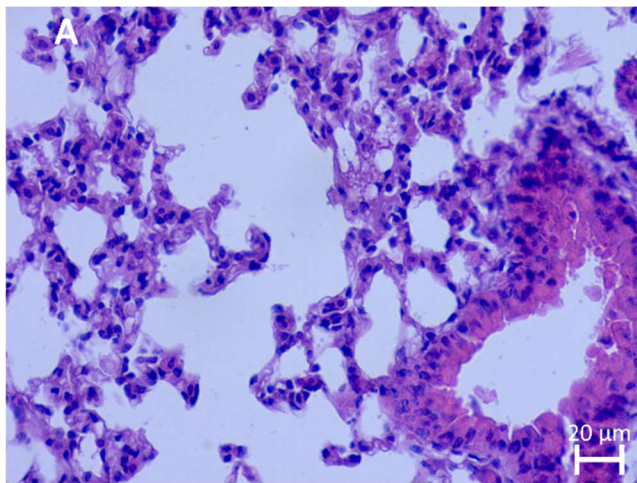


**FIGURA 9:** Fotomicrografia do rim de camundongos (*Mus musculus*) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância, o controle positivo foi tratado com ciclofosfamida na dose de 25 mg/kg/dia (B), pode-se observar nesta imagem a presença de focos hemorrágicos no sistema porta-hepático, já os tratamentos foram realizados com goma do cajueiro nas doses de 50 (C) e 100 mg/kg/dia (D) via intraperitoneal. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



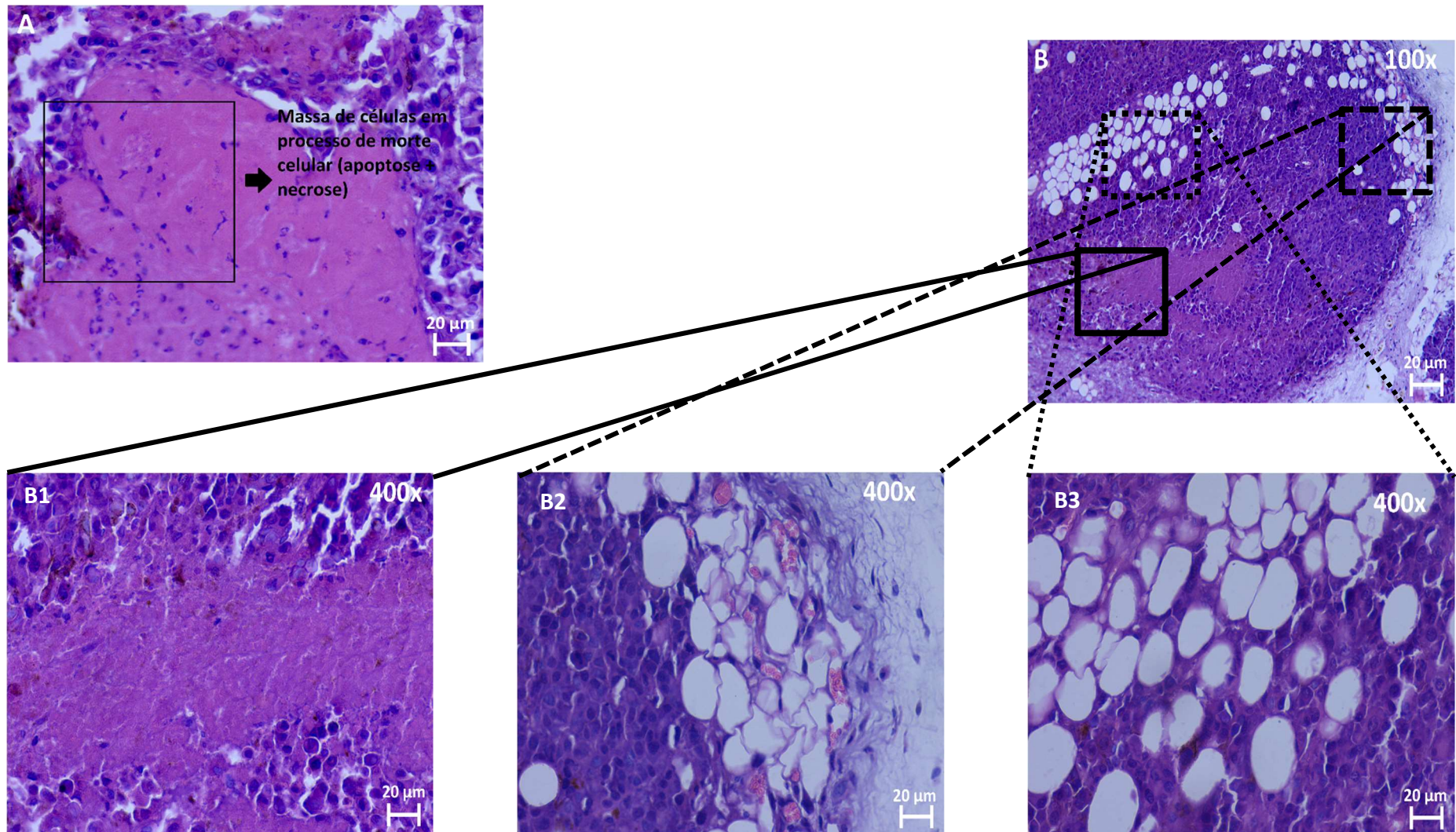


**FIGURA 10:** Fotomicrografia do pulmão de camundongos (*Mus musculus*) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância, o controle positivo (B) foi tratado com ciclofosfamida na dose de 25 mg/kg/dia, pode-se observar nesta imagem a presença de focos hemorrágicos nos alvéolos pulmonares, já os tratamentos foram realizados com goma do cajueiro nas doses de 50 (C) e 100 mg/kg/dia (D) via intraperitoneal. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



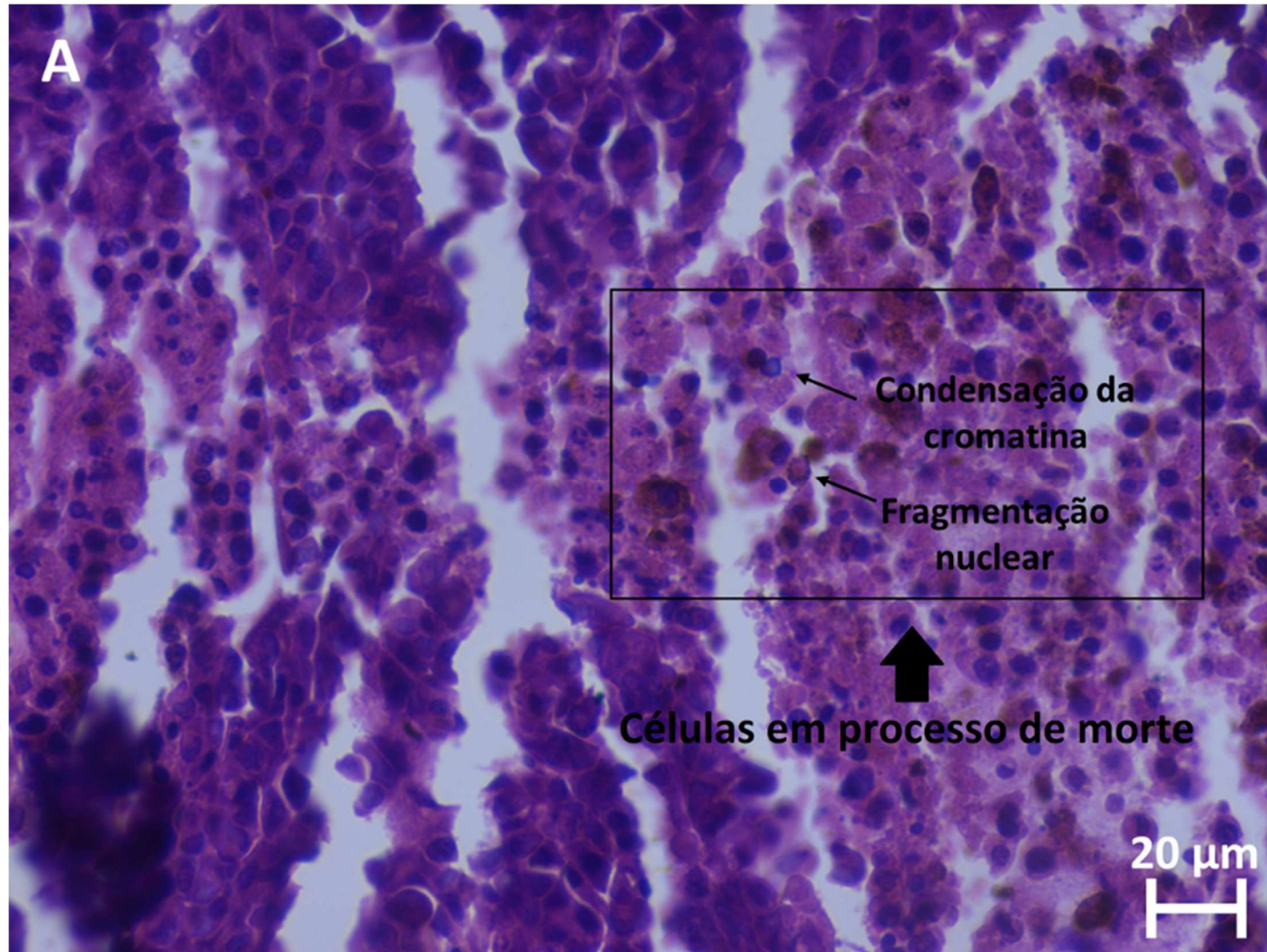


**FIGURA 11:** Fotomicrografia do tumor de camundongos (*Mus musculus*) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância, o controle positivo foi tratado com ciclofosfamida na dose de 25 mg/kg/dia (B) via intraperitoneal. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x (figuras A, B1, B2 e B3) indicando alterações morfológicas sugestivas de mecanismo de morte celular. Aumento = 100x (figura B), mostrando visão ampliada da massa tumoral com alterações morfológicas presentes.

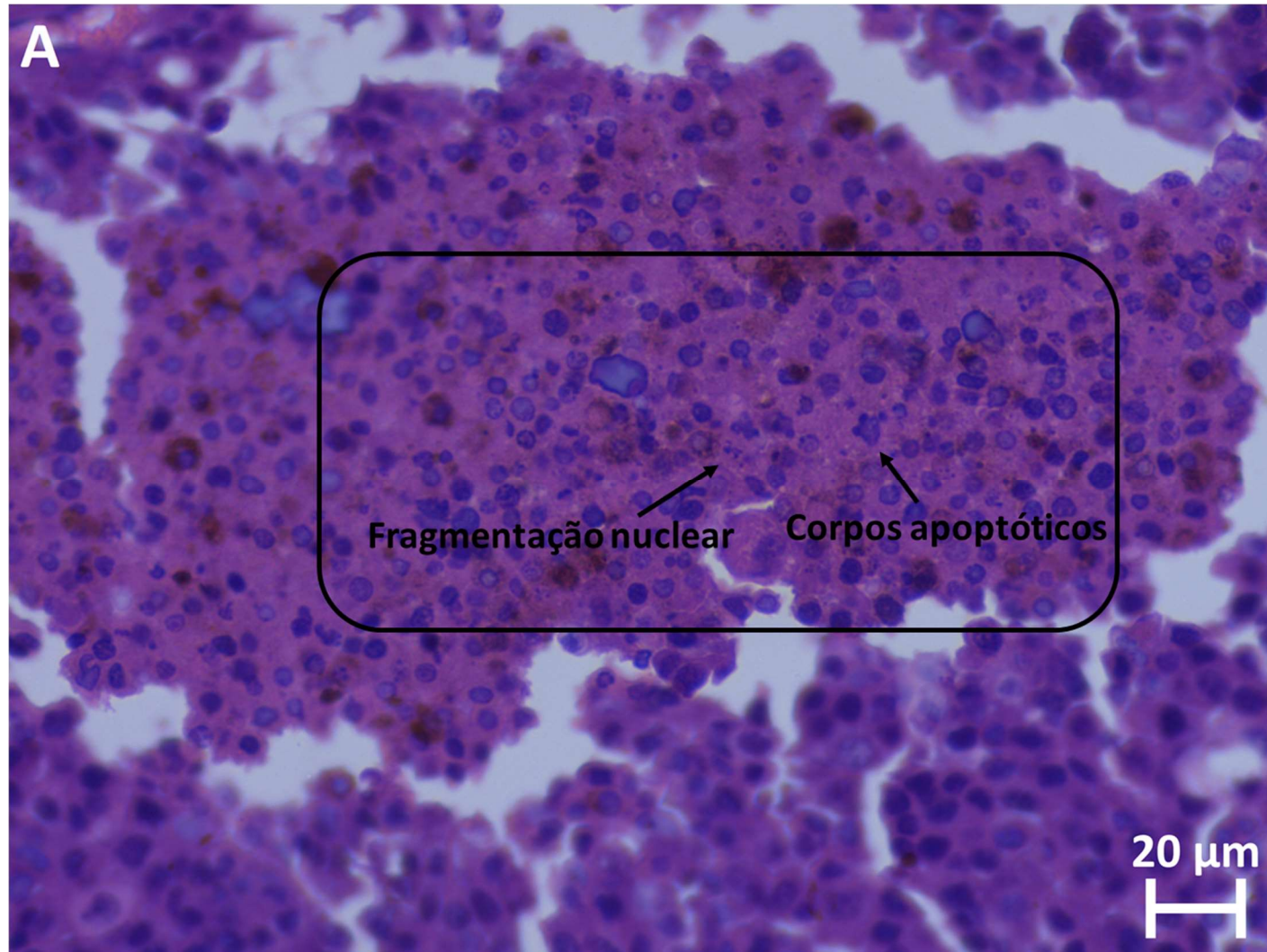




**FIGURA 12:** Fotomicrografia do tumor de camundongos (*Mus musculus*) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento. O tratamento foi realizado com goma do cajueiro na dose de 50 mg/kg/dia (A) via intraperitoneal. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



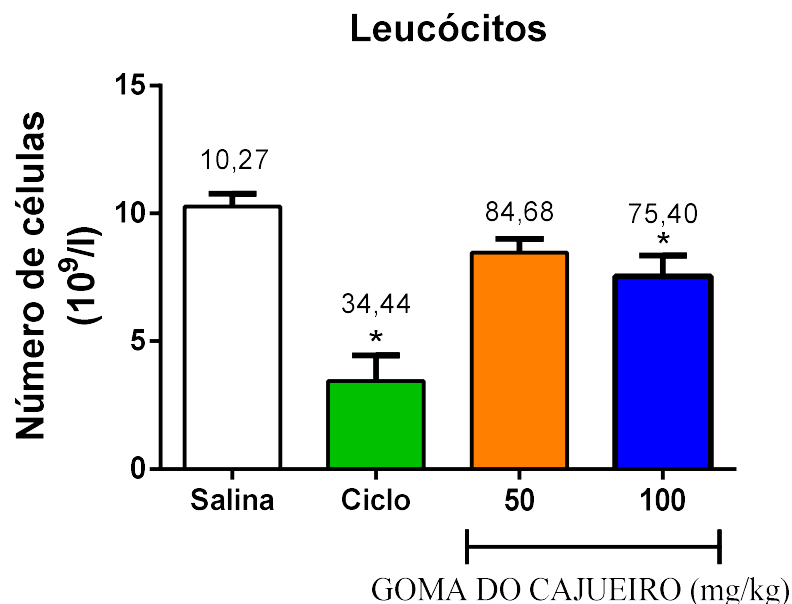
**FIGURA 13:** Fotomicrografia do tumor de camundongos (*Mus musculus*) transplantados com melanoma metastático murino (B16F10) e sacrificados após 15 dias de tratamento. O tratamento foi realizado com goma do cajueiro na dose de 100 mg/kg/dia (A) via intraperitoneal. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



Dentre as reações adversas mais comumente relatadas em pacientes que fazem uso de quimioterápicos, a toxicidade hematológica é a mais importante devido ao fato de que o tecido hematopoiético apresenta elevada taxa de proliferação celular. Devido a este efeito, os pacientes devem ser monitorados constantemente para se determinar a duração da mielodepressão e o tempo de recuperação. A leucopenia é a primeira alteração importante a ser observada devido à curta meia vida dos neutrófilos, sendo esta de 6 a 10 horas. Os agentes alquilantes produzem efeitos tóxicos marcantes por atuarem tanto nas células neoplásicas como nas células normais em divisão (FERDINANDI; FERREIRA, 2009; JESWANI; PAUL, 2017; PONTICELLI; ESCOLI; MORONI, 2018).

Como pode ser observado no gráfico 5, a utilização do quimioterápico causa leucopenia severa, ao mesmo tempo que reduz o crescimento tumoral. Este comportamento pode levar a outras alterações fisiológicas, além do aparecimento de doenças oportunistas. Este fato não foi observado no tratamento com o polissacarídeo analisado, demonstrando que a diminuição do nível de leucócitos na dose de 100 mg/kg foi menos expressiva em relação ao controle positivo, ao mesmo tempo em que o mesmo reduziu o crescimento tumoral em até 50%.

**GRÁFICO 4:** Gráfico do nível de leucócitos no sangue após os 15 dias de tratamento. Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Tukey's.



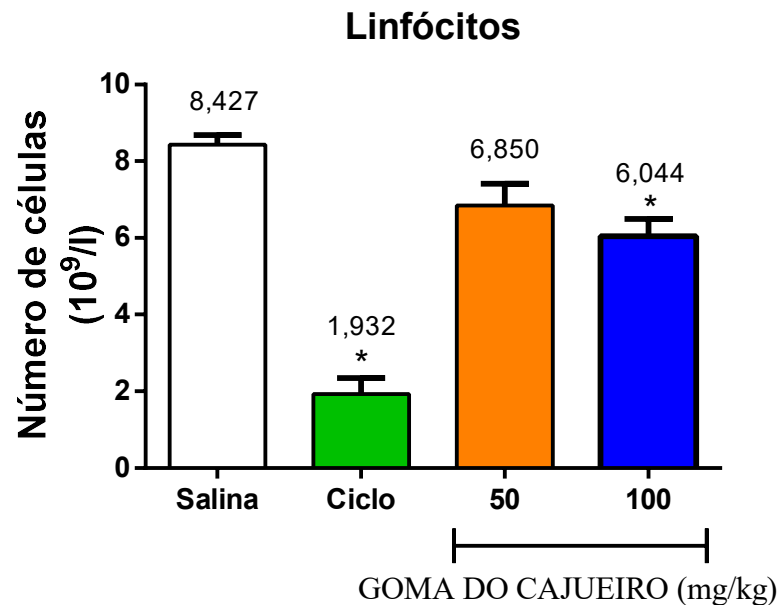
Legenda: (\*)  $p < 0,05$ .

Estes dados também podem ser observados no gráfico 6, quando realizado em função da quantidade de linfócitos presentes, onde pode-se observar uma diferença significativa entre



os grupos Ciclo e C-, confirmando dados anteriores e demonstrando a leucopenia causada pelo fármaco utilizado.

**GRÁFICO 5:** Gráfico do nível de linfócitos no sangue após os 15 dias de tratamento. Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Tukey's.



Legenda: (\*)  $p < 0,05$ .

Os polissacarídeos protegem o sistema imunológico contra toxinas, antibióticos e venenos e podem interagir diretamente com alguns leucócitos para formar uma barreira de proteção física (PANG; WANG; ZHANG, 2018; WEINER; LANGILLE; QUINTERO, 1995). As afinidades entre polissacarídeos e superfícies celulares assumiram um papel importante na função protetora dos polissacarídeos.

Outros parâmetros hematológicos foram analisados e estão demonstrados na tabela 2, onde é possível observar que houve diferença significativa entre os grupos Ciclofosfamida e controle negativo para os parâmetros volume corpuscular médio, RDW e número de plaquetas. Foi possível observar também, diferença significativa entre os grupos Goma 50 mg/kg e Controle negativo para os parâmetros Hematócrito e RBC.

**TABELA 3:** Parâmetros hematológicos após os 15 dias de tratamento. Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  DP. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Tukey's.

	Salina	Ciclofosfamida	Goma 50 mg/kg	Goma 100 mg/kg
Monócitos	0,18 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,07	0,14 $\pm$ 0,05
Granulócitos	1,65 $\pm$ 0,2	1,33 $\pm$ 0,3	1,27 $\pm$ 0,3	1,37 $\pm$ 0,6
RBC	6,91 $\pm$ 0,4	8,38 $\pm$ 0,3	*7,69 $\pm$ 0,4	6,99 $\pm$ 0,1
Hemoglobina	9,58 $\pm$ 0,4	11,44 $\pm$ 0,6	10,66 $\pm$ 0,5	9,98 $\pm$ 0,1
Hematócrito	31,5 $\pm$ 1,6	38,71 $\pm$ 2,0	35,75 $\pm$ 1,2	32,62 $\pm$ 0,6
Volume Corpuscular Médio	45,5 $\pm$ 0,2	*46 $\pm$ 0,6	44,86 $\pm$ 0,1	46,8 $\pm$ 0,3
Hemoglobina Corpuscular Média	13,9 $\pm$ 0,1	13,62 $\pm$ 0,2	13,81 $\pm$ 0,1	14,28 $\pm$ 0,1
CHCM	30,4 $\pm$ 0,3	29,54 $\pm$ 0,6	30,89 $\pm$ 0,3	30,52 $\pm$ 0,2
RDWc	14,5 $\pm$ 0,1	*14,6 $\pm$ 0,3	14,29 $\pm$ 0,05	15,24 $\pm$ 0,3
Volume total de sangue	399 $\pm$ 24,2	595,2 $\pm$ 93,5	492,4 $\pm$ 67,0	633,4 $\pm$ 71,5
Número de plaquetas	0,25 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,04
Volume plaquetário médio	6,35 $\pm$ 0,11	6,68 $\pm$ 0,26	6,37 $\pm$ 0,08	6,72 $\pm$ 0,16
PDW	33,33 $\pm$ 0,4	35,08 $\pm$ 1,0	34,13 $\pm$ 0,4	35,26 $\pm$ 0,4

Em estudo sobre a atividade de polissacarídeos contra leucopenia induzida por ciclofosfamida, Yang e colaboradores (2003) demonstraram que estes possuem bioatividade significativa contra leucopenia induzida por este fármaco em camundongos e que o aumento do conteúdo de grupos carboxila pode resultar no aumento da bioatividade.

Estes dados, demonstram o potencial deste polímero para utilização no tratamento de patologias que possam causar imunodepressão, ao mesmo tempo em que pode auxiliar na atividade e/ou diminuir os efeitos colaterais de fármacos padrão.

A identificação da morte celular apoptótica e necrótica pode ser importante para a avaliação dos efeitos dos agentes anticancerígenos. A apoptose descreve um tipo de autodestruição programada, sendo definida por grandes alterações morfológicas: encolhimento celular, formação de bolhas nas membranas e condensação da cromatina. Em contraste, a necrose refere-se à morfologia observada quando as células morrem de lesão grave, onde uma das características observadas é o aumento da pressão osmótica celular e conseqüentemente ruptura da membrana celular (HENGARTNER, 2000). Assim, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem sido amplamente aplicada na biologia e na medicina. O FTIR expandiu o conhecimento acerca da estrutura, conformação e dinâmica de vários componentes moleculares da célula, com esta técnica é possível demonstrar estruturas

relacionadas a lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos (DI GIAMBATTISTA et al., 2011).

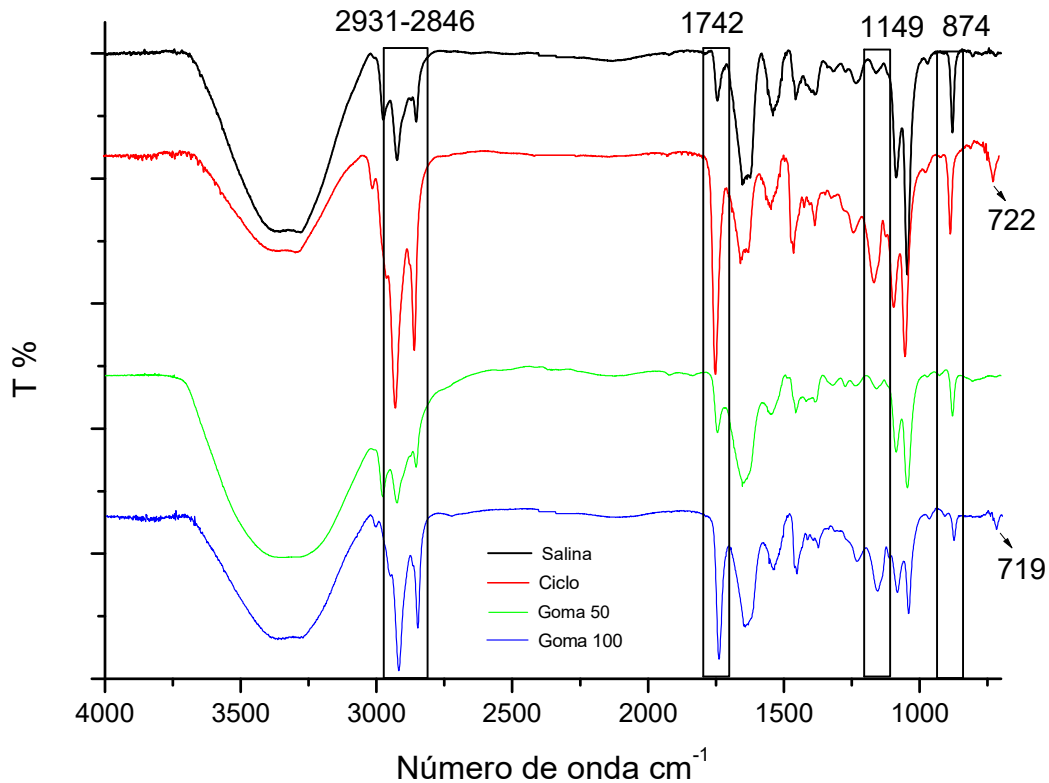
A análise feita pelo FTIR-ATR com os tecidos de Melanoma murino demonstrou conformidade entre os materiais analisados, como pode ser observada na figura 14. Na região entre 2931 e 2846  $\text{cm}^{-1}$  pode ser observado o estiramento de C-H, sendo estes demonstrados como característicos em tecidos tumorais (DOVBESHKO et al., 2000). Estas bandas demonstraram-se presentes em todos os tecidos analisados, indicando a característica do tecido.

Em 1742  $\text{cm}^{-1}$ , assim como em 874  $\text{cm}^{-1}$ , observou-se estiramento de C=O referente à presença de lipídios, possivelmente relacionado à ruptura da membrana plasmática (SHETTY et al., 2006). Este estiramento pode estar relacionado ao processo de morte celular causado pelo uso do fármaco e por células do sistema imunológico do animal. A ciclofosfamida sendo um agente alquilante, forma complexos com o DNA das células provocando morte celular por apoptose e necrose. Na necrose e no final do processo de apoptose, há ruptura da membrana celular provocando liberação de lipídeos no meio extracelular, sendo estes possivelmente identificados pela espectroscopia de infravermelho.

O estiramento destas mesmas bandas nos grupos tratados com polissacarídeo, pode indicar a presença do processo de morte celular semelhante ao ocorrido no grupo tratado com ciclofosfamida, porém em menor quantidade, que pode estar relacionada a menor intensidade da banda.



**FIGURA 14:** Espectro na região do infravermelho dos grupos tratados (Goma 50 e Goma 100) e controles (Ciclofosfamida e Salina).



Na região de  $1149\text{ cm}^{-1}$ , observa-se estiramento simétrico possivelmente relacionados a grupos fosfatos, principalmente observados na estrutura do DNA e RNA ou aos oligossacarídeos da membrana (DI GIAMBATTISTA et al., 2011; FUJIOKA et al., 2004; GARCEZ et al., 2003; YOSHIDA et al., 1997). Este resultado pode se relacionar com as características dos processos de morte gerados.

No processo de morte celular por apoptose na via intrínseca, há a permeabilização da membrana mitocondrial para liberação de proteínas pró-apoptóticas (citocromo c, fator de indução de apoptose, entre outras), reduzindo assim o potencial transmembrânico da mitocôndria. A liberação do citocromo c provoca a formação do apoptossomo, este complexo ativa a cascata de caspases a partir da caspase-9. Ao final deste processo, as caspases efetoras clivam o DNA causando a morte celular (HENGARTNER, 2000). Isso possivelmente pode explicar a presença de banda relacionada a estruturas do DNA nos grupos tratados com polissacarídeo.

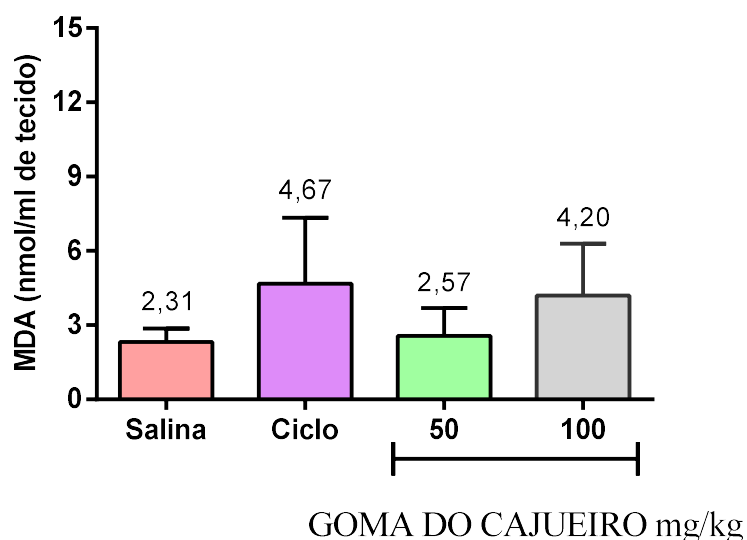
Estas características dos processos de morte celular, também se relacionam com as bandas em  $722$  e  $719\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas a dobramento de N-H de grupos amida presentes em proteínas, estando estas possivelmente relacionadas tanto a proteínas de membrana, como presença de proteínas pró-apoptóticas (STUART, 2001).

Assim, as análises realizadas por FTIR-ATR indicaram processos de morte semelhantes nos tecidos tumorais analisados, concordando com dados obtidos nos cortes histológicos, onde foi possível visualizar características celulares típicas de morte programada, além de restos celulares.

Contudo, sabe-se que o mecanismo de ação provocado por muitas substâncias com efeito antitumoral, pode estar relacionado a processos de estresse oxidativo e geração de radicais livres, que acabam por provocar lesões celulares e conseqüentemente morte, o excesso destes radicais apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. O excesso desses radicais é combatido pelo corpo, por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004). Devido a isso, é de grande importância a avaliação da quantidade destes compostos antioxidantes, a fim de determinar possíveis vias de ação, além da possibilidade de toxicidade celular.

Em relação a liberação de componentes antioxidantes a nível intra e extra celular, avaliou-se a quantidade dos antioxidantes enzimático e não-enzimático GSH (glutathiona reduzida), MDA (malondialdeído) e MPO (mieloperoxidase). De acordo com os resultados obtidos, observou-se que houve uma maior liberação de MDA como pode ser observado no gráfico 8. Mesmo o dado não sendo significativo, observa-se uma tendência a significância quando se compara os tratamentos com o controle negativo.

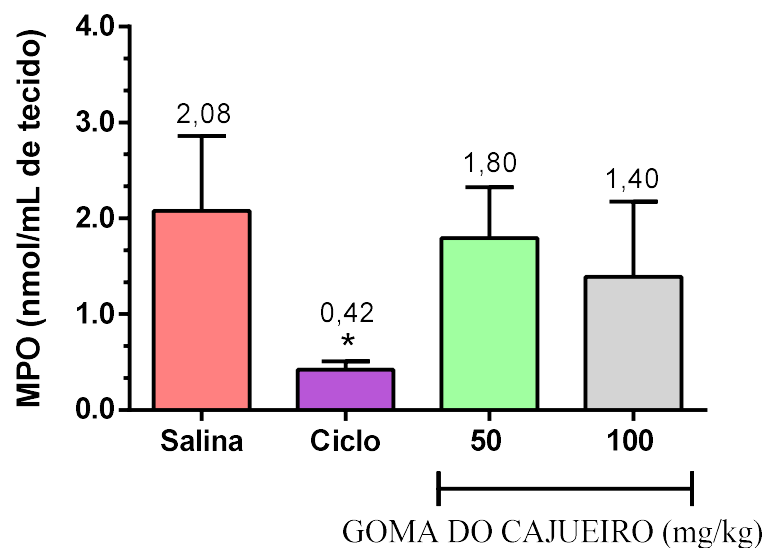
**GRÁFICO 6:** Avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA) em tecido tumoral de animais *Mus musculus* transplantados com células de melanoma metastático murino (B16F10), tratados com ciclofosfamida (Ciclo) e goma do cajueiro.



Situações de estresse oxidativo são caracterizados pelo aumento na concentração de radicais livres, os quais podem gerar danos a diferentes níveis de organização celular. O MDA é um subproduto da peroxidação lipídica sendo utilizado como indicador da geração de radicais livres na célula (AHMAD et al., 2008; QIAN et al., 2018). A concentração deste composto no tecido, além de ser um marcador da atividade da doença, também demonstra a presença de dano celular.

Quando comparados os níveis de MPO, observou-se que a ciclofosfamida diminuiu significativamente os níveis desta enzima, já os grupos tratados com a goma do cajueiro os níveis se mantiveram estáveis quando comparados com o controle negativo, como pode ser observado no gráfico 8.

**GRÁFICO 7:** Avaliação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em tecido tumoral de animais *Mus musculus* transplantados com células de melanoma metastático murino (B16F10), tratados com ciclofosfamida (Ciclo) e goma do cajueiro.



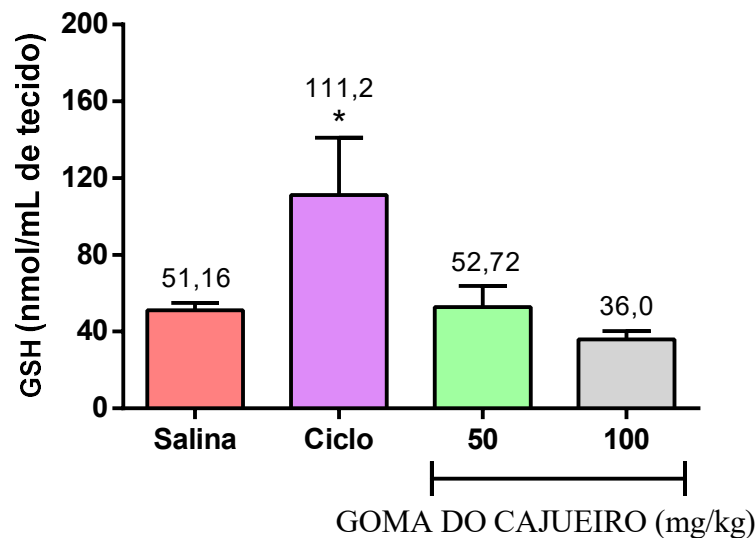
Legenda: (\*)  $p < 0,05$ .

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada predominantemente nos neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais, liberada principalmente durante a fagocitose. A MPO pode gerar vários agentes oxidantes que podem ser oxidados gerando radicais livres, por isso, a superexpressão desta enzima está relacionada a danos macromoleculares e degradação tecidual (VANHAMME et al., 2018).

Em relação aos níveis de GSH, os grupos tratados com a goma do cajueiro não demonstraram alterações significativas em relação ao grupo controle negativo. Já o grupo

tratado com a ciclofosfamida (controle positivo) demonstrou aumento significativo em meio desta molécula, no modelo analisado.

**GRÁFICO 8:** Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em tecido tumoral de animais *Mus musculus* transplantados com células de melanoma metastático murino (B16F10), tratados com ciclofosfamida (Ciclo) e goma do cajueiro.



Legenda: (\*)  $p < 0,05$ .

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) é um antioxidante endógeno conhecido principalmente pelo seu significativo papel na prevenção de danos oxidativos na célula, através da redução de hidroperóxidos. Ao reagir com peróxido de hidrogênio, esta enzima é convertida em glutathiona reduzida (GSH) que é quantificada através da absorbância. Desta forma, os agentes antioxidantes enzimáticos, removem cataliticamente radicais e espécies reativas, protegendo as células e os tecidos do estresse oxidativo (CORSO; ACCO, 2018).

Alterações nos níveis de GSH intra ou extracelular podem estar relacionados ao crescimento e progressão tumoral, assim como indicativo de morte celular. O aumento nos níveis de GSH podem estar associados com a resposta proliferativa e o crescimento tumoral, além de poder estar relacionado com lesão tecidual podendo indicar processo de morte celular (VIVANCOS et al., 2010). Além disso, o GSH pode se ligar a proteínas Bcl-2 para promover prevenção ao processo de morte celular programada em alguns modelos tumorais, além de influenciar na ativação das caspases (BALLATORI et al., 2005, 2009).

Em contrapartida, a quantificação do GSH pode sofrer influência com relação ao modelo animal utilizado. Dependendo do tipo de modelo de experimentação tumoral em animais, os níveis desta molécula não podem ser identificados ou sofrem variações positivas ou negativas.

Além disso, muitos tratamentos em potencial podem interferir nos níveis de GSH em tumores sólidos, já que a ativação do processo de apoptose pode causar destruição desta molécula de maneira ainda não elucidada pela literatura (CORSO; ACCO, 2018). Para o modelo em questão, não foi observado na literatura descrições das alterações provocadas nos níveis de GSH, indicando assim que os resultados obtidos nesta pesquisa podem ser inconclusivos para demonstrar se o polissacarídeo em questão provoca redução no estresse oxidativo gerado.

O aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS), seja por alterações fisiológicas na célula ou por exposição a carcinogênicos químicos, contribuem para o processo de carcinogênese possivelmente por efeitos genotóxicos ou por modificação da expressão de genes. Além disso, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos participam como uma fonte endógena adicional para a formação de espécies reativas de oxigênio celular (MOLONEY; COTTER, 2018).

Os antioxidantes em doses adequadas são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelas espécies reativas a biomoléculas, portanto, auxiliam na prevenção e no tratamento do envelhecimento, de doenças degenerativas, como câncer e aterosclerose. A superexpressão destas enzimas antioxidantes pode prevenir a morte celular desencadeada pelo TNF- $\alpha$ , drogas citotóxicas, UV e irradiação, porém também pode causar lesões a tecidos adjacentes, além disso, pode estar relacionado ao processo de resistência a drogas antitumorais por prevenir os danos à proteínas ou ao DNA, além de estar envolvido no processo de reparação do DNA (BALLATORI et al., 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; DROZD et al., 2016; GAL et al., 2015).

Em revisão sobre a ação de polissacarídeos no tratamento anticâncer, Zong e colaboradores, (2012) descrevem que numerosos estudos sugeriram que os polissacarídeos podem inibir o crescimento do tumor através dos seguintes mecanismos comuns: (1) a prevenção da tumorigênese pelo consumo oral de preparações ativas; (2) atividade anticâncer direta, como a indução da apoptose das células tumorais; (3) atividade de imunopotenciação em combinação com quimioterapia; e (4) a inibição da metástase tumoral.

Polissacarídeos naturais podem apresentar atividade *in vitro* ou *in vivo* contra células tumorais, porém esta característica pode estar diretamente ligada não só à estrutura e o peso molecular, como também a conformação destas moléculas. Em estudo sobre o isolamento, caracterização e atividade anticâncer *in vitro* de galactomana extraída de *S. cannabina*, o mesmo demonstrou forte inibição de crescimento tumoral nas concentrações acima de 100  $\mu\text{g/mL}$ , para linhagens de câncer humano (A549 – câncer de pulmão, Hela – câncer cervical, HepG2 – câncer de fígado, e MCF-7 – câncer de mama). Esta atividade foi relacionada com o

aumento da expressão de caspase-12, provocando assim, processo de morte celular por apoptose (ZHOU et al., 2018).

Em estudo recente sobre o efeito antiproliferativo, antimigratórios e apoptótico do polissacarídeo natural extraído de *Undaria pinnatifida*, contra células de câncer de mama (MCF-7), o mesmo apresentou significativa atividade de inibição da proliferação celular, além de diminuir a viabilidade celular e a eficiência da formação de colônias. Além disso, observou-se também que este polímero induziu a parada do ciclo celular em fase S e G2/M, além de demonstrar morfologia celular característica de apoptose. Assim, esta molécula mostrou-se promissora para futuras pesquisas acerca de sua atividade antitumoral (WU et al., 2018).

Alguns tipos de polissacarídeos, podem ser ainda denominados de polissacarídeos modificadores de resposta biológica (BRM), e possuem diversas atividades a nível celular ou fisiológico. As fontes de BRM são muito diversas, podendo em geral, ser originados de bactérias, fungos, algas marrons e plantas fotossintéticas (LEUNG et al., 2006). A resposta biológica que os BRM podem desencadear é determinada pelo padrão de expressão e pelos eventos celulares/moleculares que podem ser desencadeados pelos receptores correspondentes e proteínas de ligação. Muitas células de defesa possuem receptores específicos que os BRM reconhecem e assim recrutam aquelas células para o sítio de ação (PEISER; MUKHOPADHYAY; GORDON, 2002).

O Fucoïdan, polissacarídeo sulfatado extraído da alga marrom *Sargassum thunbergii*, demonstrou atividade antitumoral contra tumores transplantados de Sarcoma 180 e carcinoma sólido de Ehrlich. Este polissacarídeo reconhece os receptores SR expressos em macrófagos, células dendríticas (DCs), células endoteliais e células musculares lisas, promovendo o recrutamento destas células com atividade citotóxica (ZHUANG et al., 1995).

Além desses, outros receptores expressos por células do sistema imune também são reconhecidos por BRM. O receptor de glicano é amplamente expresso em monócitos, macrófagos, DC, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos B e T. O receptor de manose é expresso em macrófagos, DCs, células endoteliais hepáticas, células do miocárdio, células traqueais e pigmento retinal. É o BRM do tipo manano que se liga ao receptor de manose (LINEHAN et al., 1999; SHEPHERD; TARNOWSKI; MCLAUGHLIN, 1991)

De forma geral, os polissacarídeos oriundos de diversas fontes, podem ter atividade contra células tumorais a partir da ativação e modulação do sistema imunológico, através da ligação com receptores específicos. Em resumos esta atividade está relacionada principalmente com a ativação de macrófagos, linfócitos T e B e células Natural Killers.

Visto que a goma do cajueiro possui extremidades ricas em grupos carboxila, a sua atividade antitumoral pode estar relacionada à presença destes grupamentos e sua interação com leucócitos, além do possível recrutamento de macrófagos a ser elucidado. Em pesquisas sobre a atividade da goma do caju contra sarcoma 180, pesquisadores demonstraram que este polímero pode ser utilizado para o tratamento deste tipo de câncer além de poder ser utilizado como adjuvante no tratamento com quimioterápicos (MOTHÉ; DE SOUZA; CALAZANS, 2008).

## **6. PERSPECTIVAS**

Visto que o polissacarídeo estudado demonstrou efeito antitumoral interessante, além de não provocar toxicidade, acredita-se que este polímero possa ser utilizado de forma coadjuvante no tratamento do câncer.

Assim, espera-se ainda avaliar a forma de atuação deste polissacarídeo a nível fisiológico, além de estudar sua interação com as células do sistema imunológico como macrófagos e células dendríticas, através de receptores específicos como o receptor de manose. Além disso, pretende-se determinar seu efeito antitumoral sinérgico e protetivo contra efeitos tóxicos, quando utilizado em conjunto com fármacos antineoplásicos atuais.



## 7. CONCLUSÃO

A utilização de polissacarídeos naturais oriundos de plantas é de grande interesse para a medicina, visto que essas substâncias podem ser encontradas facilmente e em grande quantidade. Identificou-se com o presente trabalho uma possível atividade anticâncer contra melanoma murino, frente à utilização de polissacarídeo extraído de *Anacardium occidentale* L.

Observou-se que este polímero não causa toxicidade celular a células normais promovendo ainda a redução tumoral em cerca de 40 a 50%, não promovendo redução de peso dos animais. Em relação aos tecidos tumorais e órgãos analisados, observou-se que o polissacarídeo analisado não provoca toxicidade à tecidos normais como observado no controle positivo.

Assim, demonstrou-se com este estudo, que o polissacarídeo extraído do exsudato de *Anacardium occidentale* (goma do cajueiro), mostra-se promissor para futuras pesquisas acerca de sua atividade antitumoral, podendo assim, possivelmente, ser utilizado em colaboração com quimioterápicos já utilizados na atualidade.

## REFERÊNCIAS

- ABOTALEB, M. et al. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, n. February, p. 458–477, 2018.
- AHMAD, R. et al. Malondialdehyde and Protein Carbonyl as Biomarkers for Oxidative Stress and Disease Progression in Patients with Chronic Myeloid Leukemia. **In vivo**, v. 22, p. 525–528, 2008.
- AI, L. et al. Carrageenan polysaccharides and oligosaccharides with distinct immunomodulatory activities in murine microglia BV-2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 633–640, 2018.
- ARAÚJO, T. S. L. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299–307, 2015.
- BALLATORI, N. et al. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: Role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 238–255, 2005.
- BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological Chemistry**, v. 390, n. March, p. 191–214, 2009.
- BAO, X.-L. et al. Polysaccharides from *Cymbopogon citratus* with antitumor and immunomodulatory activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 1, p. 117–124, 2015.
- BARBARINO, J. M. et al. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. **Pharmacogenetic Genomics**, v. 23, n. 10, p. 563–585, 2013.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BATIST, G. et al. Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-Encapsulated Doxorubicin and Cyclophosphamide Compared With Conventional Doxorubicin and Cyclophosphamide in a Randomized, Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 19, n. 5, p. 1444–1454, 2016.
- BATISTA, J. A. et al. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 59–67, 2014.
- BIN-HAFEEZ, B. et al. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 1, p. 13–18, 2001.

- BUXERAUD, J.; FAURE, S. Les nouveaux médicaments en cancérologie. **Actualités Pharmaceutiques**, v. 56, n. 567, p. 1–5, 2017.
- CAMPO, V. L. et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167–180, 2009.
- CAMPOS, D. A. et al. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 270–274, 2012.
- CARR, C.; NG, J.; WIGMORE, T. The side effects of chemotherapeutic agents. **Current Anaesthesia and Critical Care**, v. 19, n. 2, p. 70–79, 2008.
- CARVALHO, C. et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3267–3285, 2009.
- CARVALHO, N. S. et al. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, v. 76, n. 3, p. 143–151, 2015.
- CERQUEIRA, M. A. et al. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 179–185, 2011.
- CHANDRAN, S. P.; NATARAJAN, S. B.; SHAHIMI, M. S. B. M. Nano drug delivery strategy of 5-fluorouracil for the treatment of colorectal cancer. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 2, p. 45–48, 2017.
- CHEN, Y. et al. Collateral damage in Cancer chemotherapy. **Molecular interventions**, v. 7, n. 3, p. 147–156, 2007.
- CHIA, J.-S. et al. Inhibition of metastasis, angiogenesis, and tumor growth by Chinese herbal cocktail Tien-Hsien Liquid. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 175, 2010.
- COCHRAN, T. R. et al. **Anthracycline, Trastuzumab, and Cardiovascular Toxicity**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 13–15
- CORSO, C. R.; ACCO, A. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 128, n. May, p. 43–57, 2018.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. NATURAL PRODUCTS: A CONTINUING SOURCE OF NOVEL. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.
- DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 177–181, 1995.
- DI GIAMBATTISTA, L. et al. New marker of tumor cell death revealed by ATR-FTIR

- spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 8, p. 2771–2778, 2011.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.
- DIVVELA, H. N. D.; DUPPALA, L.; KOLAPALLI, V. R. M. Isolation and acute oral toxicity studies of *Araucaria heterophylla* novel natural polysaccharide gum in albino mice. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 10, p. 702–711, 2016.
- DOVBESHKO, G. I. et al. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. **Talanta**, v. 53, p. 233–246, 2000.
- DROZD, E. et al. Intracellular glutathione level and efflux in human melanoma and cervical cancer cells differing in doxorubicin resistance. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej**, v. 70, n. April, p. 319–328, 2016.
- FERDINANDI, D. M.; FERREIRA, A. A. Agentes alquilantes: reações adversas e complicações hematológicas. **AC & T Científica**, n. 44, p. 1–12, 2009.
- FERRANS, V. J. et al. Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy. **Tsitologiya**, v. 39, n. 10, p. 928–936, 1997.
- FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, n. 118, p. 148–149, 1973.
- FLORÊNCIO, A. P. D. S. et al. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-TUMORAL DO POLISSACARÍDEO ( PJU ) EXTRAÍDO DE *Anacardium occidentale* FRENTE A UM MODELO EXPERIMENTAL DO SARCOMA 180. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 61–65, 2007.
- FLOYD, J. D. et al. Cardiotoxicity of cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p. 7685–7696, 2005.
- FUJIOKA, N. et al. Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, n. 1, p. 32–36, 2004.
- GAL, K. LE et al. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 308, p. 1–8, 2015.
- GARCEZ, F. R. et al. Chemical constituents from *Terminalia glabrescens*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 461–465, 2003.
- GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **ACS Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, 2012.
- GIRI, S. N. et al. Amelioration of doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity by pirfenidone

- in rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 141–150, 2004.
- GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v. 9, n. 12, p. 767–776, 2007.
- GOTTDIENER JS et al. Cardiotoxicity associated with high-dose cyclophosphamide therapy. **Archives of Internal Medicine**, v. 141, n. 0003–9926 (Print), p. 758–763, 1981.
- GOUVEIA, D. N. et al. Natural products as a perspective for cancer pain management: a systematic review. **Phytomedicine**, 2018.
- HAN, S. B. et al. Acidic polysaccharide from *Phellinus linteus* inhibits melanoma cell metastasis by blocking cell adhesion and invasion. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 4, p. 697–702, 2006.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HARTMANN, J. T.; LIPP, H.-P. Toxicity of platinum compounds. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 4, n. 6, p. 889–901, 2003.
- HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 12, p. 810–816, 2000.
- HERMAWAN, A.; PUTRI, H. Current report of natural product development against breast cancer stem cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 104, p. 114–132, 2018.
- HORTOBDGYI, G. N. Anthracyclines in the Treatment of Cancer An Overview. **Drugs**, v. 54, n. 4, p. 1–7, 1997.
- INCA. **ABC do Câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. [s.l.: s.n.].
- INCA. **ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. [s.l.: s.n.].
- INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.].
- JEFF, I. B. et al. In vivo anticancer and immunomodulating activities of mannogalactoglucan-type polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berkeley) singer. **Central European Journal of Immunology**, v. 41, n. 1, p. 47–53, 2016.
- JESWANI, G.; PAUL, S. D. Recent Advances in the Delivery of Chemotherapeutic Agents. In: **Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 281–298.

- JI, X.; PENG, Q.; WANG, M. Anti-colon-cancer effects of polysaccharides: A mini-review of the mechanisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, n. 2017, p. 1127–1133, 2018.
- KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN CARCINOGENESIS. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 239–267, 2004.
- KUMAR, M. S.; ADKI, K. M. Marine natural products for multi-targeted cancer treatment: A future insight. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, n. May, p. 233–245, 2018.
- LEUNG, M. Y. K. et al. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, n. 2, p. 101–114, 2006.
- LI-WEBER, M. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. **Cancer Letters**, v. 332, n. 2, p. 304–312, 2013.
- LI, J. et al. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1900–1909, 2010.
- LINEHAN, S. A. et al. Mannose Receptor and Its Putative Ligands in Normal Murine Lymphoid and Nonlymphoid Organs: In Situ Expression of Mannose Receptor by Selected Macrophages, Endothelial Cells, Perivascular Microglia, and Mesangial Cells, but not Dendritic Cells. **J. Exp. Med**, v. 189, n. 12, p. 1961–1972, 1999.
- LIU, L. et al. Natural polysaccharides exhibit anti-tumor activity by targeting gut microbiota. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 743–751, 2018.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews - Cancer**, v. 2, n. February, p. 1–31, 2002.
- MENZINGER, S.; LAFFITTE, E. Talidomida. **EMC - Dermatología**, v. 49, n. 4, p. 1–9, 2015.
- MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, 2016.
- MISHIMA, T. et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. **Clinical & experimental metastasis**, v. 16, n. 6, p. 541–50, 1998.
- MOHAMADI YARIJANI, Z. et al. Reduction of cisplatin-induced renal and hepatic side effects in rat through antioxidative and anti-inflammatory properties of *Malva sylvestris* L. extract. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. July, p. 1767–1774, 2018.
- MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell**

**and Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 2018.

MONSUEZ, J. J. et al. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. **International Journal of Cardiology**, v. 144, n. 1, p. 3–15, 2010.

MOREIRA, B. R. et al. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 69–76, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOTHÉ, C. G.; DE SOUZA, I. A.; CALAZANS, G. M. T. Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium occidentale* L. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 19, n. 6, p. 50–52, 2008.

MOTOYOSHI, Y. et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. **Oncology Reports**, v. 16, n. 1, p. 141–146, 2006.

MOURA, M. J. Aplicações Do Quitosano Em Libertação Controlada De Fármacos: Algumas Considerações. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 14, p. 1489–1509, 2012.

MULLINS, G. M.; ANDERSON, P. N.; SANTOS, G. W. High dose cyclophosphamide therapy in solid tumors. Therapeutic, toxic, and immunosuppressive effects. **Cancer**, v. 36, n. 6, p. 1950–1958, 1975.

NAKAMURA, K. et al. Clinical Evidence of Pharmacokinetic Changes in Thalidomide Therapy. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 28, n. 1, p. 38–43, 2013.

NEWMAN, D. J. Developing natural product drugs: Supply problems and how they have been overcome. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 162, p. 1–9, 2016.

OUN, R.; ROWAN, E. Cisplatin induced arrhythmia; electrolyte imbalance or disturbance of the SA node? **European Journal of Pharmacology**, v. 811, n. March, p. 125–128, 2017.

PAIVA, M. DAS G. **UTILIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L) em cicatrização cutânea experimental**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

PANG, G.; WANG, F.; ZHANG, L. W. Dose matters: Direct killing or immunoregulatory effects of natural polysaccharides in cancer treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, n. February, p. 243–256, 2018.

PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 1, p. 123–128, 2002.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 45–61, 2002.

- PITOMBEIRA, N. A. O. et al. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610–615, 2015.
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, n. 12, p. 1016–1027, 2008.
- PONTICELLI, C.; ESCOLI, R.; MORONI, G. Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases? **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 10, p. 1022–1027, 2018.
- PRYOR, W. W. A. et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology**, v. 291, n. 3, p. R491–511, 2006.
- QIAN, X. et al. Reactive oxygen species in cancer stem cells of head and neck squamous cancer. **Seminars in Cancer Biology**, 2018.
- QUELEMES, P. V. et al. Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 567–575, 2017.
- RIBEIRO, A. J. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 188–200, 2016.
- RUIZ-MORI, E. et al. Chemotherapy-induced bradycardia in oncology patients. **Revista Colombiana de Cardiologia**, n. xx, p. 1–7, 2018.
- SANDERS, K. et al. Natural Products for Cancer Prevention: Clinical Update 2016. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 32, n. 3, p. 215–240, 2016.
- SARIKA, P. R. et al. Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 167–174, dez. 2015.
- SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317–333, 2006.
- SCHIRATO, G. V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 149–154, 2006.
- SELVAKUMAR, E. et al. Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 115–119, 2006.
- SENTHILKUMAR, K. et al. Brown seaweed fucoïdan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 366–374, 2013.



- SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 6, p. 246–253, 2018.
- SHEPHERD, V. L.; TARNOWSKI, B. I.; MCLAUGHLIN, B. J. Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 32, n. 6, p. 1779–1784, 1991.
- SHETTY, G. et al. Raman spectroscopy: Elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 10, p. 1460–1464, 2006.
- SHEWACH, D. S.; KUCHTA, R. D. Introduction to Cancer Chemotherapeutics. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 2859–2861, 2009.
- SILVA, A. G. DA; RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. DE. Composição e propriedades reológicas da goma do Angico (*Anadenanthera Macrocarpa* Benth). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 34–40, 1998.
- SILVA, R. O. et al. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p. 2618–2633, 2012.
- SOFIAS, A. M. et al. The battle of “nano” paclitaxel. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 122, p. 20–30, 2017.
- SOUZA FILHO, M. D. et al. Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.
- STATHOPOULOS, G. P. Cisplatin: Process and Future. **Journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 18, n. 3, p. 564–569, 2013.
- STUART, B. H. Book Reviews. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 15, p. 3621–3622, 2001.
- SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2015.
- SUGANYA, A. M. et al. Pharmacological importance of sulphated polysaccharide carrageenan from red seaweed *Kappaphycus alvarezii* in comparison with commercial carrageenan. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1300–1312, 2016.
- TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 523–533, 2000.
- VANHAMME, L. et al. The other myeloperoxidase: Emerging functions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 649, p. 1–14, 2018.
- VEAL, G. J. et al. Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with

- B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **European Journal of Cancer**, v. 55, p. 56–64, 2016.
- VIVANCOS, P. D. et al. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. **Biochemical Society**, v. 178, p. 169–178, 2010.
- WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 2014.
- WEINER, R.; LANGILLE, S.; QUINTERO, E. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 339–346, 1995.
- WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 352–364, 2012.
- WU, J. et al. Effect of polysaccharide from *Undaria pinnatifida* on proliferation, migration and apoptosis of breast cancer cell MCF7. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.
- YAMASSAKI, F. T. et al. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 241–248, 2015.
- YANG, C. et al. Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula*. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 886–895, out. 2013.
- YANG, J.; DU, Y. Chemical modification, characterization and bioactivity of Chinese lacquer polysaccharides from lac tree *Rhus vernicifera* against leukemia induced by cyclophosphamide. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 4, p. 405–410, 2003.
- YOSHIDA, S. et al. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of rat brain microsomal membranes modified by dietary fatty acids: Possible correlation with altered learning behavior. **Biospectroscopy**, v. 3, n. 4, p. 281–290, 1997.
- ZEHNDER, A.; GRAHAM, J.; ANTONISSEN, G. Update on Cancer Treatment in Exotics. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 21, n. 2, p. 465–509, 2018.
- ZHOU, M. et al. Isolation, characterization and in vitro anticancer activity of an aqueous galactomannan from the seed of *Sesbania cannabina*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, n. 2017, p. 1241–1247, 2018.
- ZHOU, S. et al. Thalidomide—A Notorious Sedative to a Wonder Anticancer Drug. **Curr Med Chem.**, v. 29, n. 33, p. 4102–4108, 2013.
- ZHU, F. et al. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 31, p. 12943–12948, 2011.

ZHUANG, C. et al. Antitumor Active Fucoidan from the Brown Seaweed, *Umitoranoo* ( *Sargassum thunbergii* ). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 563–567, 1995.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395–1410, 2012.

# Anexo

## Anexo 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética no uso animal - CEUA



Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430970 Fortaleza – CE

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E ANTIMETASTÁTICO DE UM HETEROPOLISSACARÍDEO COMPLEXO EXTRAÍDO DO EXSUDADO DE ANACARDIUM OCCIDENTALE L.”**, protocolo 22/17, sob responsabilidade de Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 27 de junho de 2017.

Vigência do projeto	01/07/2017 à 28/12/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo Swiss e C57BL/6
Nº de Animais	4 Swiss e 112 C57BL/6
Peso	Swiss – 18 a 20 g / C57BL/6 – 19 a 22 g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da UFC e Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Fortaleza, 29 de junho de 2017

Alexandre Sant Buidá