

# Efeitos de polissacarídeos do jambo no modelo tumoral sólido de Ehrlich em camundongos

*Effects of polysaccharides from jambo fruit on solid Ehrlich tumor model in mice*

Recebido em: 20/11/2019

Aceito em: 17/01/2020

**Gabriele Harumi SEKO<sup>1</sup>; Kamila Stelly MENDONÇA<sup>1</sup>;  
Natalia Mulinari TURIN-OLIVEIRA<sup>1</sup>; Eliana Rezende ADAMI<sup>1</sup>;  
Maria Carolina STIPP<sup>1</sup>; Claudia Martins GALINDO<sup>1</sup>;  
Claudia Rita CORSO<sup>1</sup>; Letícia MILANI<sup>1</sup>; Camila Tamiello ROSA<sup>2</sup>;  
Lucimara Mach Cortês CORDEIRO<sup>2</sup>;  
José Ederaldo QUEIROZ-TELLES<sup>3</sup>; Alexandra ACCO<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Farmacologia, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Av. Francisco H. dos Santos, 100, Jardim das Américas, CEP 81531-980. Curitiba, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Av. Francisco H. dos Santos, 100, Jardim das Américas, CEP 81531-980. Curitiba, PR, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR. R. Padre Camargo, 285, Alto da Glória, CEP 80060-240. Curitiba, PR, Brasil. E-mail: aleacco@ufpr.br

## ABSTRACT

Cancer treatment often involves drugs with high toxicity. Therefore, there is a search for therapies with fewer side effects. Among the compounds studied, polysaccharides from plants stand out as antioxidants and antitumor agents. The aim of this study was to evaluate the *in vivo* antitumor effects of jambo polysaccharides (*Syzygium jambos* (L.) Alston) and their association with a standard treatment (methotrexate) using the solid Ehrlich tumour in mice. The groups of mice inoculated with tumor cells were: I) Negative control (distilled water), II) PJ100 (jambo polysaccharides, 100 mg/kg), III) PJ150, IV) MTX 1.5 mg/kg, VI) Positive control (MTX higher dose – 2.5 mg/kg) and VII) PJ250 + MTX 2.5 mg/kg. PJ treatment caused a reduction in tumour weight, mainly with PJ250 (-45%), similar to the inhibition caused by MTX (-43%), whereas PJ + MTX association did not potentiate this inhibition. In the tumour tissue, PJ reduced the levels of inflammatory parameters concerning the negative control, but the reduction was not dose-dependent. PJ increased the activity of tumour superoxide dismutase and did not cause haematological changes. PJ did not cause significant damage to the liver, the target organ of drug toxicity. In conclusion, PJ reduced the growth of Ehrlich tumour, probably by modulating the inflammatory process in the tumour microenvironment. This preliminary study evidenced the adjuvant potential of PJ in chemotherapies. Thus, its effects should be investigated in other tumour models and cells.

**Keywords:** cancer; polysaccharides; *Syzygium jambos*; Ehrlich's tumour; inflammation.

## RESUMO

O tratamento de câncer envolve fármacos que podem causar diversos efeitos colaterais. Assim, existe uma busca por tratamentos com menor toxicidade. Dentre os compostos estudados, os polissacarídeos de plantas superiores destacam-se como antioxidantes e antitumorais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antitumorais *in vivo* de polissacarídeos do jambo (*Syzygium jambos* (L.) Alston) e da associação destes com um tratamento padrão (metotrexato), utilizando como ferramenta o tumor sólido de Ehrlich em camundongos. Os grupos de camundongos inoculados com células tumorais foram: I) Controle negativo (água destilada), II) PJ 100 (polissacarídeos do jambo, 100 mg/kg), III) PJ 150, IV) PJ 250, V) Controle positivo (metotrexato dose menor – MTX 1,5 mg/kg), VI) Controle positivo (MTX dose maior – 2,5 mg/kg) e VII) PJ 250 + MTX 2,5 mg/kg. Houve redução no peso tumoral pelos PJ, principalmente com PJ 250 (-45%), semelhante à inibição causada pelo MTX 2,5 (-43%), enquanto a associação PJ+MTX não potencializou esta inibição. No tecido tumoral, os PJ reduziram os níveis de parâmetros inflamatórios em relação ao controle negativo, porém a redução não foi dose-dependente. Os PJ elevaram a atividade da superóxido dismutase tumoral e não causaram alterações hematológicas. Os PJ também não causaram danos relevantes ao fígado, órgão-alvo de toxicidade de fármacos. Conclui-se que os PJ reduziram o crescimento do tumor de Ehrlich, provavelmente por modulação do processo inflamatório no microambiente tumoral, evidenciando o potencial adjuvante dos PJ em quimioterapias. Assim, seus efeitos deverão ser ainda investigados em outros modelos tumorais e tipos celulares.

**Palavras-chave:** câncer; polissacarídeos; *Syzygium jambos*; tumor de Ehrlich; inflamação.

## INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças que ocorrem devido à divisão rápida e descontrolada de células, levando à formação de tumores e neoplasias malignas. Essas células, que podem ser muito agressivas, têm a capacidade de invadir os tecidos e órgãos, podendo criar metástase para diversas regiões do corpo (1).

Para controlar a multiplicação desenfreada das células tumorais, algumas modalidades terapêuticas são aplicadas, como cirurgia, quimioterapia, terapia hormonal e radioterapia. A quimioterapia envolve a administração de fármacos citotóxicos como cisplatina, vincristina, metotrexato e sorafenibe, isolados ou em combinação. Fármacos anti-neoplásicos desempenham um papel importante no tratamento do câncer, porém podem causar diversos efeitos colaterais (2). Para procurar novos agentes antitumorais eficazes com efeitos menos tóxicos, os produtos naturais ganham destaque (3). Neste contexto, estudos anteriores mostraram que diferentes polissacarídeos não tóxicos extraídos

de fontes naturais exibem promissoras atividades antitumorais e imunomoduladoras (4). Porém, por mais que se conheçam essas funções dos polissacarídeos, há uma diversidade enorme de polissacarídeos de frutas que ainda não foi estudada, dentre eles os polissacarídeos do jambo.

Jambo é o fruto do jamboeiro [*Syzygium jambos* (L.) Alston ou *Eugenia jambos*], uma árvore originária das Américas, que se aclimatou bem às regiões Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil, mas poucos estudos das propriedades biológicas dos componentes do jambo foram realizados até o momento. O extrato de *Syzygium jambos* e um de seus compostos isolados, análogo do ácido anacárdico, foram capazes de inibir o crescimento de *Propionibacterium acnes* em um estudo acerca de suas propriedades antibacteriana e anti-inflamatória (5). Outro estudo apontou que o extrato parece catalisar a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o consumo de glutatona (GSH), de forma similar às propriedades da glutatona peroxidase. Seu extrato também pode depurar significativamente o radical óxido nítrico (NO) (6). Recentemente, um estudo mostrou efeito

antitumoral de polissacarídeos do jambo em camundongos, sem, no entanto, explorar os mecanismos envolvidos (7). Assim, este trabalho teve como objetivo realizar uma análise biométrica, histológica e enzimática de tecido tumoral de Ehrlich em camundongos, além de análise hematológica, procurando encontrar evidências de que os polissacarídeos do jambo possam ter valor na terapia antitumoral sem efeitos tóxicos expressivos.

## MÉTODO

**Material botânico.** Frutos maduros e orgânicos do jambo (*S. jambos* (L.) Alston) foram adquiridos no centro de abastecimento (Ceasa) de Curitiba, Paraná, Brasil. O extrato de polissacarídeos foi obtido da seguinte forma: os frutos com casca foram cortados, liofilizados e moídos. O pó dos frutos desidratados foi desengordurado com clorofórmio-metanol (1:1) em um extrator Soxhlet. Pectinas presentes na porção solúvel dos polissacarídeos foram extraídas e caracterizadas como descrito em Tamiello e cols (2018), indicando a presença de homogalacturonana (HG), arabinogalactana tipo II e ramnogalacturonana tipo I (RG-I) (7).

Os polissacarídeos do *Syzygium jambos* tiveram seu potencial antioxidante avaliado *in vitro* frente ao 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), um radical livre estável, pelo protocolo adaptado de Chen e cols (2004). As amostras dos polissacarídeos, nas concentrações 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL, foram misturadas a uma solução metanólica contendo o DPPH (10 µg/mL). Ácido ascórbico (50 µg/mL) e água destilada foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente (8).

**Animais e tratamentos.** Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Experimentação Animal – CEUA/BIO – UFPR, número de aprovação 984. Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas pesando entre 25-30 g. Os animais foram mantidos em condições laboratoriais padrão, alojados em gaiolas plásticas coletivas com no máximo 8 camundongos por gaiola, forradas com cepilho de pinus, com acesso livre à água e alimentos (Nuvilab®, Brasil), sob um ciclo

claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C).

As células tumorais de Ehrlich foram armazenadas a -80°C. Para manter o tumor na forma ascítica, inicialmente foram inoculadas  $2 \times 10^6$  células/animal por via intraperitoneal em camundongos fêmeas. Após o crescimento na forma ascítica (7 dias), as células foram colhidas de forma asséptica, em aproximadamente 3 mL de tampão fosfato (PBS), e centrifugadas a  $1000 \times g$  por 3 min. O sobrenadante foi descartado e as células do pellet foram lavadas três vezes com PBS e inoculadas novamente em outro animal, e assim consecutivamente, utilizando um total de 5 animais, até atingir aproximadamente 90% de viabilidade celular. Para a obtenção do tumor sólido, foram inoculadas  $2,5 \times 10^6$  células/animal, em volume final de 0,2 mL, por via subcutânea, no membro pélvico direito dos animais (9).

No dia seguinte à inoculação das células tumorais, o tratamento foi iniciado e mantido durante 21 dias. As doses de polissacarídeos do jambo administradas basearam-se em estudos prévios que utilizaram os mesmos polissacarídeos (7). Os animais foram divididos em grupos experimentais, sendo que cada grupo teve  $n=7$ , exceto o grupo I com  $n=8$ : Grupo I: animais com tumor e tratados com veículo (água destilada) – controle negativo; Grupo II: animais com tumor e tratados com 100 mg/kg de polissacarídeos extraídos do jambo (PJ 100); Grupo III: animais com tumor e tratados com 150 mg/kg de polissacarídeos extraídos do jambo (PJ 150); Grupo IV: animais com tumor e tratados com 250 mg/kg de polissacarídeos extraídos do jambo (PJ 250); Grupo V: animais com tumor e tratados com o controle positivo metotrexato (MTX 1,5 mg/kg, via intraperitoneal, a cada 3 dias); Grupo VI: animais com tumor e tratados com o controle positivo metotrexato (MTX 2,5 mg/kg, via intraperitoneal, a cada 3 dias); Grupo VII: animais com tumor e tratados com metotrexato (MTX) 2,5 mg/kg + 250 mg/kg de polissacarídeos extraídos do jambo.

Os animais foram tratados diariamente por gavagem com veículo e extrato de polissacarídeos, ou a cada 3 dias intraperitonealmente (i.p.) com MTX, por 21 dias após a inoculação das células tumorais. O extrato foi diariamente dissolvido em água (veí-

culo) um pouco antes da administração nos animais. O peso corporal dos animais foi medido diariamente. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com combinação de cloridrato de quetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), por via i.p., sangue foi coletado da veia cava abdominal, e em seguida os animais foram submetidos à eutanásia. Foi coletado tecido hepático e tumoral, para análises posteriores, sendo armazenados em freezer -80°C. O tumor, sendo o principal alvo de pesquisa, foi coletado para avaliação de peso, parâmetros oxidativos, inflamatórios e alterações histológicas. O tecido hepático também foi coletado para avaliações, pois é um órgão secundário sensível às alterações induzidas pelo processo tumoral e por ser o principal órgão de metabolismo do organismo. No fígado, foi avaliado o processo oxidativo induzido pelo tumor. Ainda, rins, pulmões e baço foram coletados e apenas pesados.

**Hemograma e bioquímica plasmática.** O sangue coletado ao final do experimento foi utilizado para realização de hemograma e testes bioquímicos plasmáticos, por meio de sistema automatizado. As frações de plasma foram analisadas com kits comerciais (Kovalent®) para a determinação dos níveis de glicose, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA).

**Histopatologia tumoral e hepática.** Os fragmentos de tumor e fígado fixados em formalina tamponada 10% foram processados de acordo com procedimento de rotina para histologia e embebidos em parafina. Os cortes histológicos (4 mm no micrótomo) foram corados com hematoxilina e eosina (HE), e analisados em microscópio óptico quanto ao grau de necrose, infiltrado inflamatório e alterações celulares.

**Parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios em tumor e fígado.** O tecido tumoral congelado foi homogeneizado em tampão fosfato usando homogeneizador (Minilys Precellys®), e centrifugado a 10000× g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi usado para medida da atividade enzimática de N-acetilglicosaminidase (NAG, segundo Bailey e cols, 1988) (10), de mieloperoxidase (MPO, segun-

do Suzuki e cols, 1983) (11), de nitrito, como índice indireto da produção de óxido nítrico (NO, de acordo com Green e cols, 1982) (12), de glutatona reduzida (GSH, de acordo com Sedlak e Lindsay, 1968) (13) e de superóxido dismutase (SOD, de acordo com Gao e cols, 1998) (14). Os mesmos métodos descritos acima foram realizados para o tecido hepático para a medida de GSH e SOD. A atividade da SOD está expressa pela quantidade de proteína nas amostras de tumor e fígado, determinados pelo método de Bradford (1976) (15).

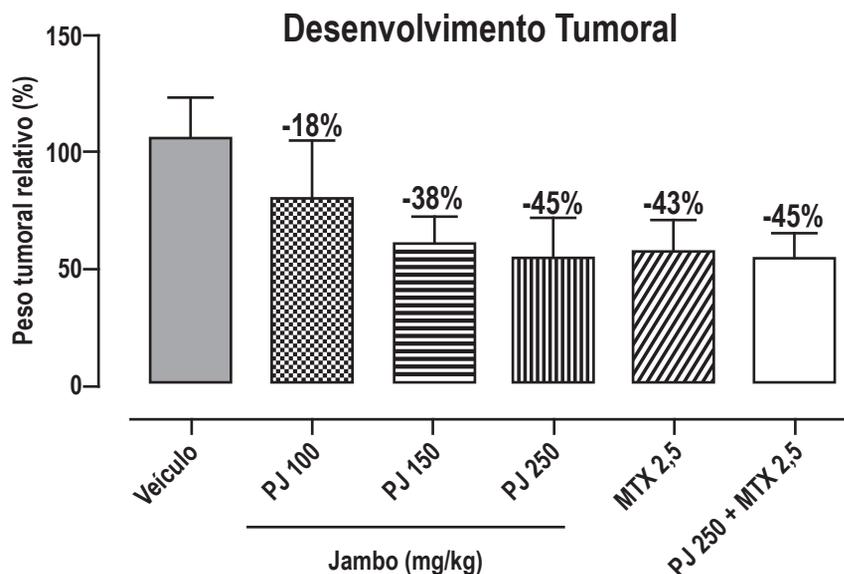
**Análise estatística.** Os dados estão representados como a média ± erro padrão das médias (EPM) de cada grupo. As diferenças entre as médias foram determinadas por meio de análise de variância de uma via ou duas vias, quando pertinente, seguidas por teste *post-hoc* de Bonferroni. As análises foram realizadas usando o Programa para Windows, GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os polissacarídeos do jambo, em todas as doses utilizadas no experimento, apresentaram efeito antitumoral, o que foi demonstrado pela redução do peso tumoral, especialmente na dose de 250 mg/kg (Figura 1), que impediu o crescimento do tumor em 45% em relação ao Grupo veículo, similarmente ao metotrexato (redução de 43%). A associação MTX + PJ 250 não potencializou a inibição do crescimento (redução de 45%).

Alguns polissacarídeos naturais farmacologicamente ativos têm recebido destaque devido à larga gama de estudos oncológicos e seu baixo teor de toxicidade para o ser humano (16). Quando combinados com a quimioterapia tradicional, ou mesmo sozinhos, os polissacarídeos podem inibir o crescimento tumoral. Por exemplo, polissacarídeos de algas marinhas *Monostroma* mostraram ter boa atividade antitumoral por meio da inibição *in vitro* do crescimento de células tumorais de carcinoma gástrico e carcinoma cervical humano (17). Uma pesquisa utilizando polissacarídeos das raízes de *Astragalus* spp. (ervilhaca de leite) mostrou que estes foram capazes de reduzir o peso do tumor só-

**Figura 1.** Peso do tumor sólido de Ehrlich em camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos do jambo (PJ 100, PJ 150, PJ 250), metotrexato (MTX 2,5) ou com a associação de polissacarídeos e metotrexato (PJ 250 + MTX 2,5). Valores expressos como a média  $\pm$  EPM (%) considerando como 100% o peso médio do tumor do grupo veículo (0,57 g).



lido de Ehrlich em camundongos (18), bem como uma pectina dos frutos de *Feronia limonia* (ou *F. elephantum*, maçã-de-lima) teve ação inibitória no crescimento de células tumorais no modelo tumoral ascítico de Ehrlich (19). Adicionalmente, estudos em nosso grupo de pesquisa evidenciaram efeitos antitumorais de polissacarídeos extraídos do pimentão verde (20), do vinho tinto cabernet franc (21) e do próprio jambo (7), tanto *in vitro* (células de tumor mamário) quanto *in vivo* (carcinoma de Ehrlich e Walker-256), corroborando com os dados da Figura 1.

Em relação à avaliação hematológica, na série vermelha houve apenas alteração da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) do grupo VII em relação ao grupo veículo (Tabela 1). Na série branca, houve diferença do grupo MTX 2,5 mg/kg em relação ao grupo veículo na contagem de glóbulos brancos (WBC) (Tabela 1). O aumento percentual dos glóbulos brancos no grupo tratado com MTX 2,5 mg/kg não era esperado, visto que este medicamento é também utilizado como imunossupressor, podendo inclusive causar pancitopenia (22).

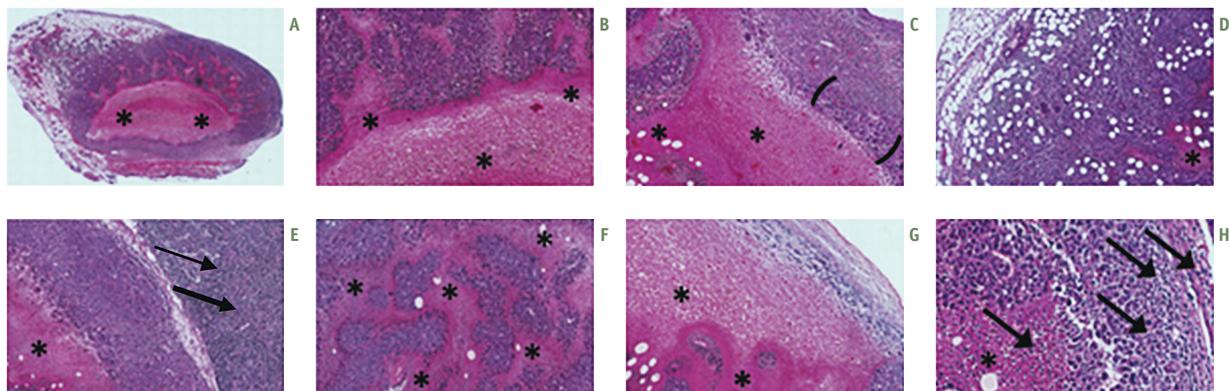
Dentre os parâmetros bioquímicos, a glicemia do grupo MTX 2,5 mg/kg reduziu em comparação ao controle (Tabela 1). Paralelamente, foram encontradas alterações nos seguintes parâmetros, segundo valores de referência (23) para camundongos Swiss: contagem de plaquetas do grupo tratado com MTX 2,5 mg/kg (de valor  $314 \times 10^3/\text{mm}^3$ ), cuja faixa de referência é  $315 - 758 \times 10^3/\text{mm}^3$ ; contagem de glóbulos brancos (WBC) do grupo tratado com MTX 2,5 mg/kg (valor 9,65%), cuja faixa de referência é 1,9 - 7,0%; glicose dos grupos MTX 2,5 mg/kg (78,54 mg/dL) e tratado com associação (219,27 mg/dL), cuja faixa de referência é 130 - 210 mg/dL; porcentagem de linfócitos dos grupos veículo (57,31%), PJ 100 mg/kg (64,96%), MTX 2,5 mg/kg (63,01%), e PJ 250 + MTX (60,22%), cuja faixa de referência é 74 - 90%; porcentagem de monócitos do grupo veículo (5,1%), com faixa de referência 0 - 5%. Nos demais parâmetros avaliados, não foram encontrados valores fora das faixas de referências para nenhum dos grupos. Em conjunto estes dados demonstram que os PJ, ao menos na dose de 100 mg/kg, não alteram de maneira expressiva parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos.

**Tabela 1.** Hemograma e análises plasmáticas de camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos do jambo (PJ 100), com metotrexato (MTX 2,5) e com a associação de polissacarídeos e metotrexato (PJ 250 + MTX 2,5).

Parâmetros	Veículo	PJ 100	MTX 2,5	PJ 250 + MTX
RBC x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	8,25 ± 0,23	8,58 ± 0,14	7,93 ± 0,29	8,19 ± 0,13
HGB g/dL	11,44 ± 0,34	11,91 ± 0,29	11,48 ± 0,33	11,38 ± 0,12
HCT %	32,58 ± 4,02	38,16 ± 0,49	35,13 ± 1,37	36,14 ± 0,51
MCV f/L	44,11 ± 0,62	44,55 ± 0,58	44,36 ± 0,50	44,21 ± 0,65
MCH pg	13,81 ± 0,16	13,83 ± 0,20	14,47 ± 0,35	13,86 ± 0,09
MCHC %	31,43 ± 0,34	31,18 ± 0,67	32,8 ± 1,12	31,49 ± 0,41
RDW %	14,34 ± 0,33	15,5 ± 0,24	15,08 ± 0,28	13,07 ± 0,36 *
PLT X10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	407 ± 52,4	462,33 ± 16,89	314 ± 26,62	413,57 ± 48,71
WBC /mm <sup>3</sup>	5,25 ± 0,60	5,05 ± 1,18	9,65 ± 0,65 *	4,97 ± 0,62
ALT U/L	51,24 ± 5,22	42,21 ± 4,53	32,13 ± 8,64	45,78 ± 4,57
AST U/L	344,5 ± 26,26	214,05 ± 35,28	233,8 ± 19,86	316,04 ± 56,55
FA U/L	119,6 ± 41,76	47,9 ± 5,29	60,36 ± 8,45	48,48 ± 2,62
Glicose mg/dL	179,7 ± 12,93	132,05 ± 26,15	78,54 ± 24,59 *	219,27 ± 26,20
Linfócitos %	57,31 ± 1,70	64,96 ± 2,32	63,01 ± 0,65	60,22 ± 3,68
Monócitos %	5,1 ± 0,75	4,96 ± 0,40	5,98 ± 1,32	4,68 ± 0,91
Granulócitos %	37,46 ± 1,33	30,06 ± 2,33	29,8 ± 2,72	35,08 ± 3,56

Os dados foram expressos como média ± EPM e foram analisados utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Símbolo: \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo. Legenda: RBC (glóbulos vermelhos); HGB (hemoglobina); HCT (hematócrito); MCV (volume corpuscular médio); MCH (hemoglobina corpuscular média); MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média); RDW (amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos); PLT (plaquetas); WBC (glóbulos brancos); ALT/TGP (alanina aminotransferase/ transaminase glutâmico-pirúvica); AST/TGO (aspartato aminotransferase/ transaminase glutâmico-oxalacética); FA (fosfatase alcalina).

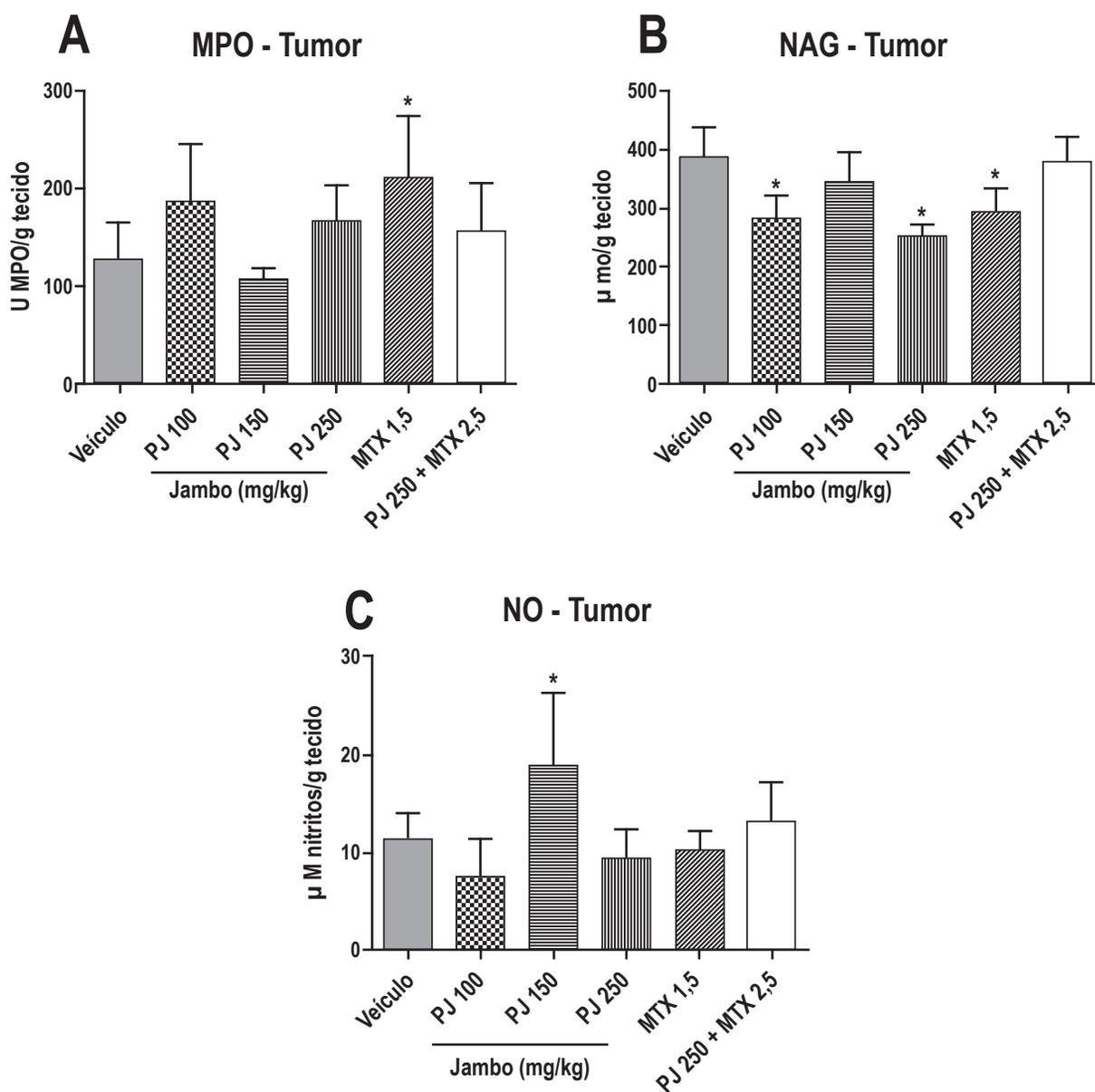
**Figura 2.** Características histológicas do tecido tumoral de Ehrlich em camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos do jambo (PJ 100, PJ 150, PJ 250), com metotrexato (MTX 2,5) ou com a associação de polissacarídeos e metotrexato (PJ 250 + MTX 2,5). A, B, C: Grupo veículo. D: Grupo PJ 150 mg/kg. E, F: Grupo PJ 250 mg/kg. G, H: Grupo PJ 250 mg/kg associado com MTX 2,5 mg/kg. Parênteses indicam células viáveis do tumor de Ehrlich, setas indicam infiltrado de células inflamatórias, enquanto asteriscos indicam áreas de necrose. As amostras foram observadas em microscópio óptico na ampliação de 20x.



Considerando que os PJ provocaram redução do volume tumoral, análises histológicas dos tumores foram realizadas. O padrão encontrado nos tumores foi de necrose coagulativa, típica de isquemia, com presença de debris celulares (Figura 2).

As menores taxas de necrose foram encontradas no grupo tratado com jambo na dose de 250 mg/kg (35%), enquanto nos grupos veículo, PJ 150 e no grupo de associação, as taxas foram de 65%, 55% e 60%, respectivamente.

**Figura 3.** Parâmetros inflamatórios no tumor sólido de Ehrlich em camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos do jambo (PJ 100, PJ 150, PJ 250), metotrexato (MTX 1,5) ou com a associação de polissacarídeos e metotrexato (PJ 250 + MTX 2,5). A: atividade de mieloperoxidase (MPO). B: atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG). C: nível de nitrito (NO). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM. Os dados foram analisados utilizando one-way ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , comparado com o grupo controle (veículo).



Foram observados também infiltrados inflamatórios do tipo linfoplasmocitário peritumoral. No grupo PJ 150, a resposta inflamatória encontrada foi de discreta intensidade, enquanto nos demais grupos foi de discreta à moderada intensidade (Figura 2). No grupo PJ 250 também foi possível visualizar a presença de um linfonodo hiperplásico (Figura 2E), com folículos linfáticos, cápsula visível, linfocitose e invasão tumoral por contiguidade no tecido do linfonodo, indicando que nesta dose a inflamação esteve mais presente no microambiente tumoral.

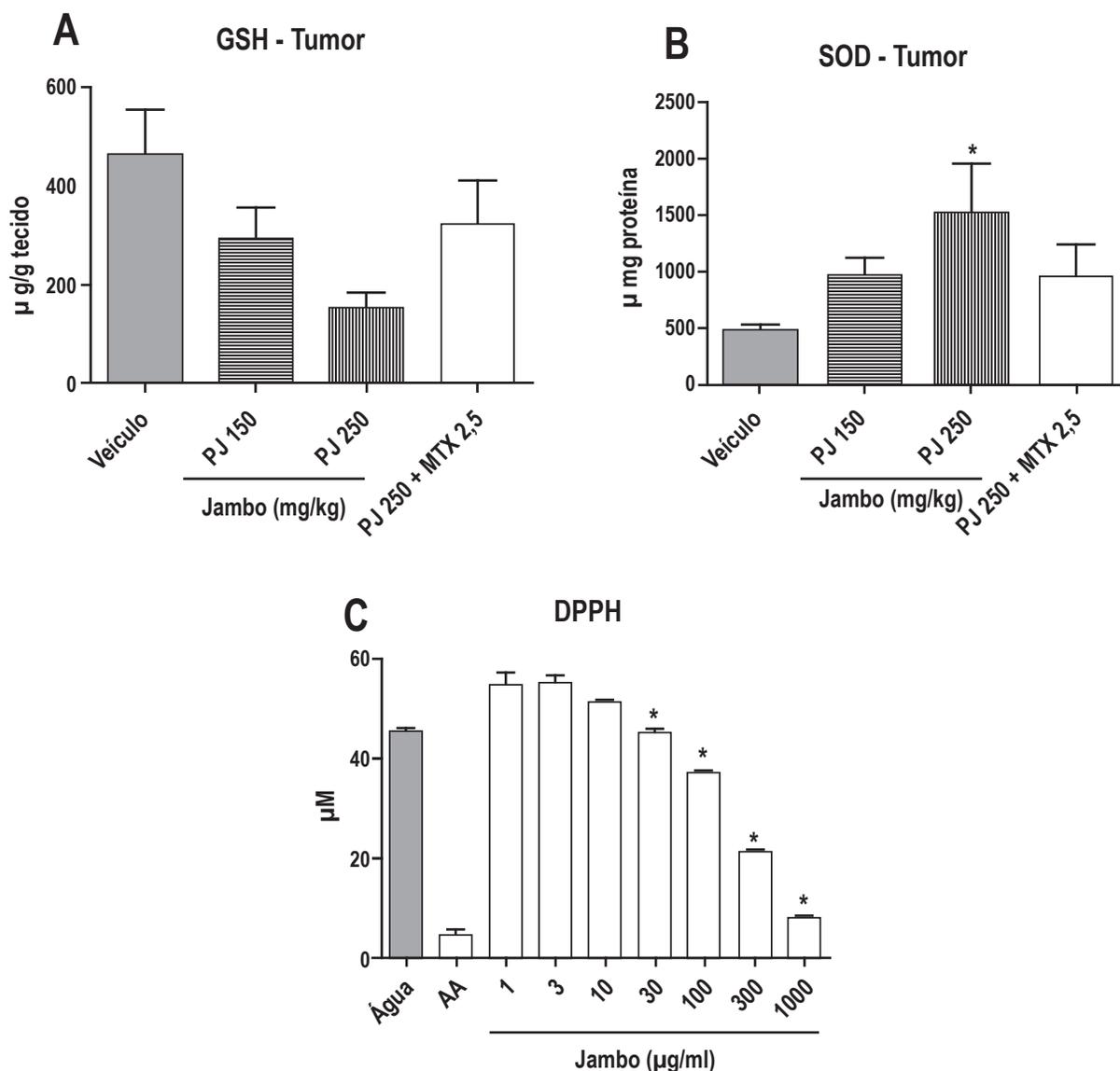
Nas últimas décadas, muitos polissacarídeos foram extraídos de plantas, algas e cogumelos, e estes compostos têm atraído atenção por sua atividade imunomoduladora e efeitos antitumorais. Por exemplo, alguns compostos botânicos aumentaram a atividade citotóxica de macrófagos, aumentaram a atividade antitumoral, aumentaram a produção de nitrito, citocinas e quimiocinas (24). Shin e cols (2006) relataram que um polissacarídeo isolado da raiz *Panax ginseng*, mostrou atividade na modulação do processo inflamatório e efeito antitumoral, principalmente mediada pelo aumento na produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, aumentando a atividade antitumoral dessas células (25). Considerando estes dados de literatura e os achados histológicos indicando infiltração de células inflamatórias no tecido tumoral de Ehrlich, alguns parâmetros associados à resposta inflamatória foram mensurados no tumor. As análises revelaram que os PJ têm capacidade de reduzir a atividade da NAG (grupos PJ 100 e PJ 250), relacionada à infiltração de macrófagos, bem como aumentar os níveis de NO (grupo PJ 150), relacionado à ativação de monócitos e macrófagos (26) (Figura 3). Esses resultados sugerem que o mecanismo pelo qual os PJ têm atividade antitumoral pode envolver a regulação do processo inflamatório no microambiente tumoral, porém sem apresentar relação dose-resposta.

Os dados de NO corroboram os previamente publicados por Shin e cols (2006) com outros polissacarídeos (25). Nos parâmetros referentes à inflamação tumoral, a associação entre o metotrexato e os polissacarídeos, na dose de 250 mg/kg, não se mostrou diferente dos tratamentos se-

parados, ou seja, não houve efeito de potenciação na mediação do processo inflamatório quando usados em combinação. No entanto, para conclusão acerca do efeito dos PJ no processo inflamatório, outros parâmetros precisariam ser avaliados, especialmente citocinas. A influência de polissacarídeos de outras fontes nos níveis tumorais e plasmáticos de citocinas já foi descrita: elevação do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em tumor Walker-256 de ratos tratados com polissacarídeos extraídos do vinho tinto cabernet franc (21) e elevação de interleucina (IL)-6 em tumor de Ehrlich (20). Adicionalmente, para testar os efeitos da combinação de PJ + MTX na inflamação e em outras vias de transdução celular, menores doses de ambos os compostos poderiam ser testadas, a fim de confirmar se suas ações são sinérgicas ou complementares.

O estresse oxidativo, e especialmente as espécies reativas de oxigênio (ERO), participam da iniciação, promoção e progressão do câncer, porém o excesso de EROs em células tumorais instaladas pode funcionar como um mecanismo de desencadeamento de morte celular, o que tem sido explorado como alvo para terapia antitumoral. Neste contexto, a atividade dos polissacarídeos do jambo no sistema redox foi mensurada *in vitro* e no tecido tumoral. Os PJ apresentaram atividade antioxidante *in vitro* no teste do DPPH nas maiores concentrações, especialmente a de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 4C). Estes resultados mostram que esses polissacarídeos têm capacidade *per se* de eliminar radicais reativos quando em concentrações elevadas. Sendo assim, os polissacarídeos do jambo também poderiam ter um papel na modulação do estresse oxidativo no ambiente tumoral *in vivo*, mediando parâmetros como SOD e GSH. Embora os níveis de GSH observados no tumor (Figura 4A) não tenham apresentado variações significativas estatisticamente, houve uma forte tendência a reduzir os níveis tumorais pelo tratamento com PJ (principalmente PJ 250, com redução de 62% em relação ao veículo), atingindo  $p = 0,07$ . Já em relação à SOD (Figura 4B), houve elevação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo tratado com PJ 250 mg/kg em relação ao controle. Portanto, a elevação de SOD pode ser compensatória aos baixos níveis de GSH tumoral.

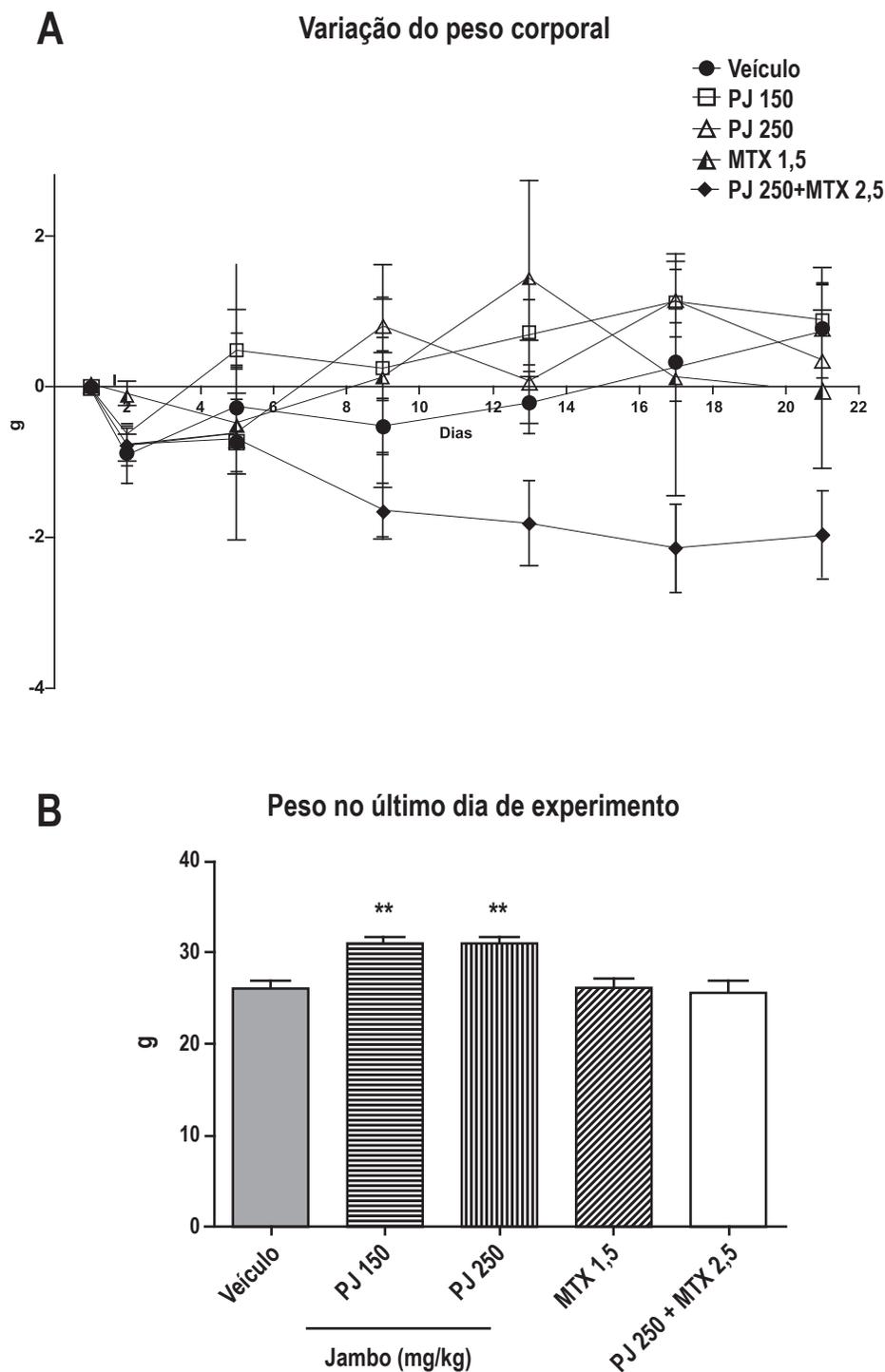
**Figura 4.** Efeito dos polissacarídeos do jambo nos parâmetros de estresse oxidativo no tumor sólido de Ehrlich em camundongos e ensaio *in vitro* do potencial antioxidante frente ao radical livre DPPH. A: nível de glutationa reduzida tumoral, B: atividade de superóxido dismutase tumoral, C: atividade antioxidante no teste do DPPH *in vitro*. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados utilizando one-way ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , comparado com o grupo controle (veículo ou água).



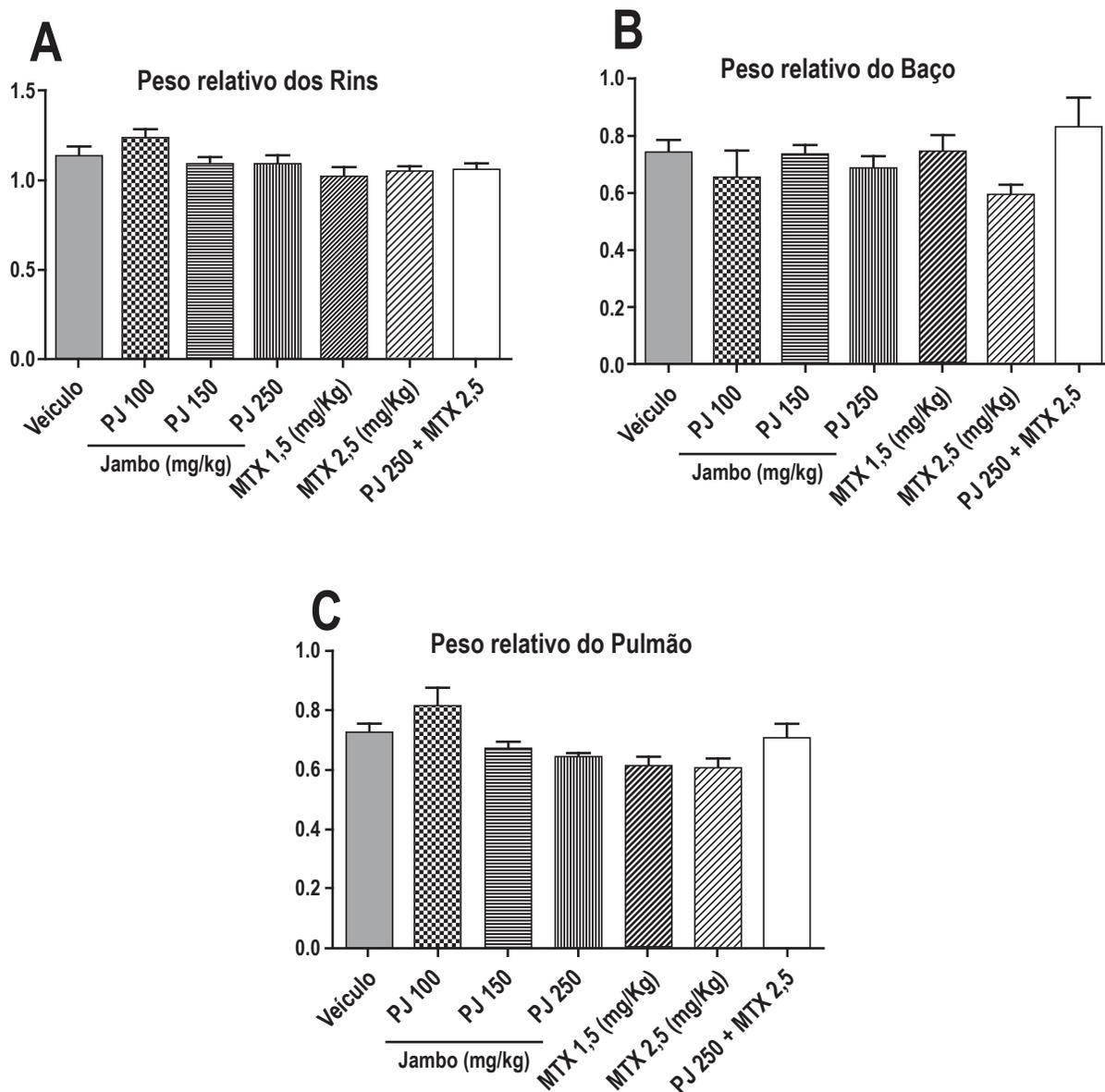
Dados da literatura mostram que polissacarídeos das raízes da planta chinesa *Cynanchum auriculatum* tem ação antioxidante, uma vez que aumentam significativamente os níveis da enzima SOD e do antioxidante não-enzimático GSH em células danificadas por estresse oxidativo (27). Estes resultados parcialmente corroboram com os nossos.

Com relação aos parâmetros de toxicidade sistêmica, os grupos PJ 150 e PJ 250 apresentaram pequenas variações de peso corporal, semelhantes ao grupo controle, durante os 21 dias de experimento, sem perdas de peso significativas (Figura 5A).

**Figura 5.** Variação do peso corporal (A) e peso no último dia de experimento (B) de camundongos tratados com veículo, polissacarídeos do jambo, metotrexato ou com a combinação PJ + MTX. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM. Os dados foram analisados utilizando two-way ANOVA (A) e one-way ANOVA (B), seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.



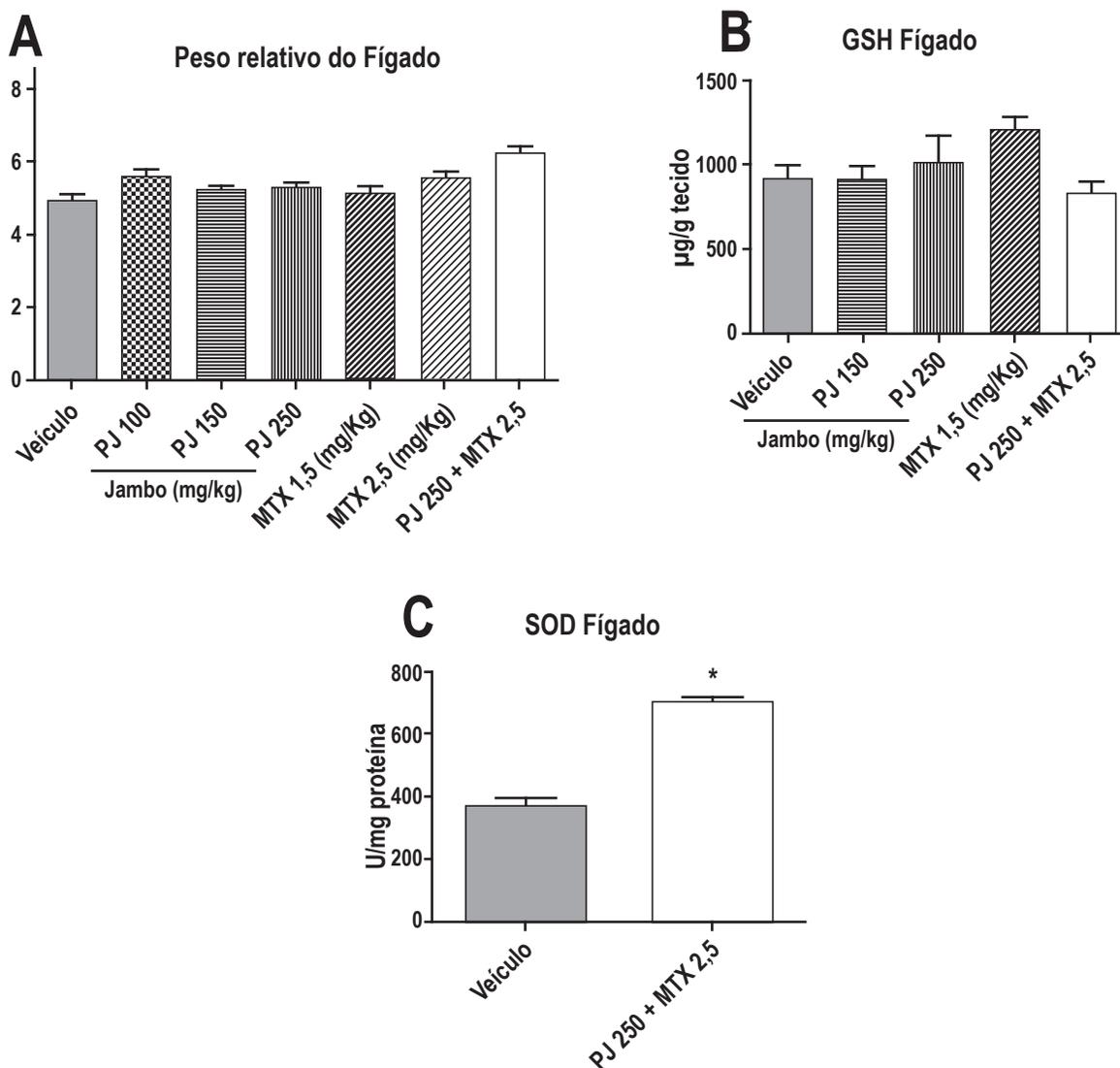
**Figura 6.** Peso relativo dos órgãos aferido em camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos do jambo (PJ 100, PJ 150, PJ 250), com metotrexato (MTX 2,5) ou com a associação de polissacarídeos e metotrexato (PJ 250 + MTX 2,5). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM. Os dados foram analisados utilizando o teste one-way ANOVA seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.



O grupo tratado com a associação PJ 250 + MTX mostrou uma curva de peso corporal destoante das demais, com valores de peso corporal sempre inferiores aos dos demais grupos e progressivamente em queda durante os 21 dias (Figura 5A), dado que possivelmente reflete a toxicidade sistêmica do MTX na dose mais elevada (2,5 mg/kg),

pois na dose menor de MTX (1,5 mg/kg), os animais mantiveram praticamente o mesmo peso ao longo do experimento, e os animais tratados somente com PJ 250 tiveram uma variação média positiva de peso no último dia de experimento (+ 2 ou + 3 g; Figura 5B).

**Figura 7.** Parâmetros hepáticos de camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos do jambo (PJ), metotrexato (MTX) ou com a associação de ambos. A: peso relativo do fígado. B: nível de GSH hepática. C: atividade de SOD hepática. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM. Os dados foram analisados utilizando o teste one-way ANOVA, seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni (A, B) e teste T de Student (C). \*  $p < 0,05$ .



Não houve alteração significativa entre os grupos no peso relativo dos órgãos (rins, baço e pulmões), quando normalizados pelo peso corporal (Figura 6) em comparação ao grupo controle (veículo). Sendo este um parâmetro indireto de toxicidade, os resultados indicam ausência de toxicidade sistêmica dos polissacarídeos do jambo.

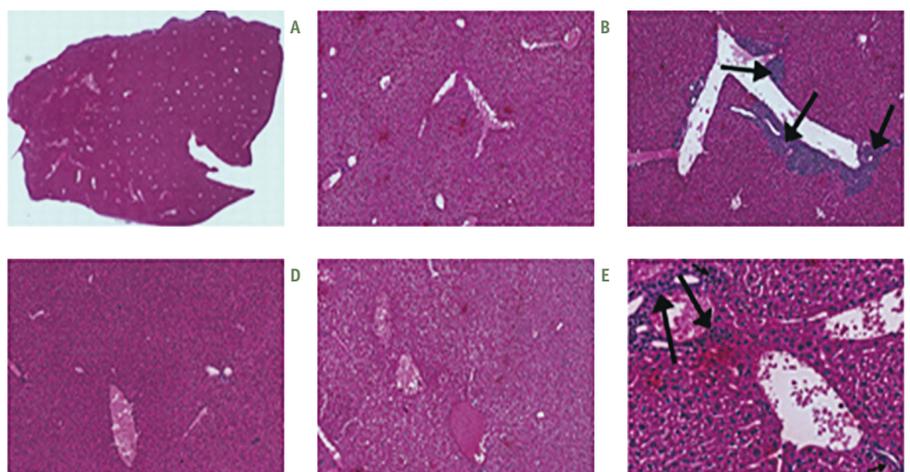
Considerando o fígado como um órgão importante para a metabolização de fármacos, inclu-

sive durante quimioterapia, alguns parâmetros de função hepática foram analisados a fim de checar se os polissacarídeos e o MTX afetariam este órgão. Não houve alteração significativa no peso do fígado entre os grupos tratados e o grupo veículo (Figura 7A). Sendo este um parâmetro indireto de toxicidade hepática, associado à normalidade das transaminases hepáticas ALT e AST (Tabela 1), os resultados sugerem ausência de toxicidade hepática

dos polissacarídeos do jambo. Além disso, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nos níveis de GSH do fígado (Figura 7B). Porém, diferenças significativas foram observadas nos níveis de SOD entre o grupo veículo e o grupo de associação (Figura 7C), mostrando que a associação de metotrexato com os polissacarídeos do

jambo induziu resposta antioxidante no fígado. O MTX pode alterar funções hepáticas, porém, tal toxicidade se manifesta após 30 dias de tratamento (28). Portanto, os grupos que receberam MTX neste trabalho não foram submetidos à terapia por tempo suficiente para apresentarem alterações significativas de hepatotoxicidade.

**Figura 8.** Características histológicas do tecido hepático de camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos do jambo (PJ), metotrexato (MTX) ou com a associação de ambos. A, B: Grupo veículo. C: Grupo PJ 150 mg/kg. D: Grupo PJ 250 mg/kg. E, F: Grupo PJ 250 mg/kg associado com MTX 2,5 mg/kg. Setas indicam infiltrado de células inflamatórias. As amostras foram observadas em microscópio óptico na ampliação de 20x.



A fosfatase alcalina, enzima que quando aumentada pode estar relacionada à colestase e danos hepatobiliares (29), também não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os demais avaliados (Tabela 1). Estes resultados podem indicar que os polissacarídeos do jambo também não exercem efeito danoso sobre as vias biliares.

Em todos os grupos experimentais a arquitetura lobular do fígado, visualizada na análise histológica, se manteve preservada e sem fibrose (Figura 8). Porém, os grupos PJ 150 e PJ 250 apresentaram infiltrado inflamatório de intensidade moderada, enquanto no grupo da associação PJ + MTX foram encontrados níveis de inflamação de discreta à moderada intensidade, e ausência de infiltrado no grupo veículo. O infiltrado encontrado foi do tipo linfocitário, com lo-

calização predominantemente portal no grupo PJ 150 (Figura 8C), e perivenular e periportal no grupo PJ 250 (Figura 8D) e grupo associação (Figura 8E e 8F). Esta resposta inflamatória pode estar relacionada à regulação imune-inflamatória descrita na literatura para os polissacarídeos, bem como à resposta do fígado à administração oral dos polissacarídeos (30), pois este órgão é alcançado rapidamente por compostos administrados por via oral, devido ao efeito de primeira passagem (31).

Uma limitação deste estudo é a ausência da mensuração de alguns parâmetros em determinados grupos de tratamentos. Isto decorreu da necessidade de utilizar o mesmo material coletado para diferentes análises. Por esta razão, em alguns resultados descritos há ausência de certos tratamentos, a exemplo da Figura 7C.

## CONCLUSÃO

Os polissacarídeos do jambo apresentaram efeito antitumoral contra o tumor de Ehrlich em camundongos, provavelmente por regulação do processo inflamatório no microambiente tumoral. Adicionalmente, estes polissacarídeos modularam alguns parâmetros de estresse oxidativo no tumor e não causaram alterações hematológicas, diferentemente do MTX, que reduziu glicemia e aumentou WBC. Interessantemente, não ocorreu efeito de potenciação na associação entre os PJ e MTX. Este

estudo preliminar evidenciou o potencial adjuvante dos PJ em quimioterapias, assim seus efeitos e mecanismos deverão ser também investigados em outros modelos tumorais e tipos celulares.

## AGRADECIMENTOS

Ao Hospital Veterinário da UFPR pelas análises de hemograma e bioquímica. Ao CNPq pela concessão de bolsa de Iniciação Científica e de Produtividade em Pesquisa à primeira e última autoras, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

1. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. 2017.
2. Vantard N, et al. EPICC study: Evaluation of pharmaceutical intervention in cancer care. *J Clin Pharm Ther.* 2015;40(2):196–203. DOI: 10.1111/jcpt.12242.
3. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res.* 2009;59(6):365–378. DOI: 10.1016/j.phrs.2009.01.017.
4. Xiao JB, Jiang H. A review on the structure-function relationship aspect of polysaccharides from tea materials. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;55(7):930–938. DOI: 10.1080/10408398.2012.678423.
5. Sharma R, Kishore N, Hussein A, Lall N. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L. (Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:1–10. DOI: 10.1186/1472-6882-13-292.
6. Bonfanti G, Bitencourt PR, de Bona KS, da Silva PS, Jantsch LB, Pigatto AS, Boligon A, Althayde ML, Gonçalves TL, Moretto MB. *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* show similar antioxidant properties but induce different enzymatic activities in the brain of rats. *Molecules.* 2013;18(8):9179–9194. DOI: 10.3390/molecules18089179.
7. Tamiello CS, Adami ER, de Oliveira NMT, Acco A, Iacomini M, Cordeiro LMC. Structural features of polysaccharides from edible jambo (*Syzygium jambos*) fruits and antitumor activity of extracted pectins. *Int J Biol Macromol.* 2018;118:1414–1421. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.164.
8. Chen FA, Wu AB, Chen CY. The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chem.* 2004;86(4):479–484. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.09.020.
9. Bailey PJ. Sponge implants as models. *Methods Enzym.* 1988;162:327–334. DOI: 10.1016/0076-6879(88)62087-8.
10. Suzuki, K, Ota, H, Sasagawa, S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.* 1983;132(2):345–352. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90019-2.
11. Green, LC, Wagner, DA, Glogowski, J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982;126(1):131–138. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-x.
12. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25:192–205. DOI: 10.1016/0003-2697(68)90092-4.
13. Gao R, Yuan Z, Zhao Z, Gao X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Biochem Bioenerg.* 1998;45:41–45. DOI: 10.1016/S0302-4598(98)00072-5.
14. Pereira A, Costa VM, Santos M, Pinto F, Rodrigues G. Evaluation of the effects of methotrexate released from polymeric implants in solid Ehrlich tumor. *Biomed Pharmacother.* 2014;68(3):365–368. DOI: 10.1016/j.biopha.2013.12.012.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254.
16. Zhang T, Miller MC, Zheng Y, Zhang Z, Xue H, Zhao D, Su J, Mayo K, Zhou Y, Tai G. Macromolecular assemblies of complex polysaccharides with galectin-3 and their synergistic effects on function. *Biochem J.* 2017;474(22):3849–3868. DOI: 10.1042/beck20170143.

17. Karnjanapratum S, You SG. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. *Int J Biol Macromol.* 2011;48(2):311–318. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.12.002.
18. Jin L, Yixi B, Waikai L, Wenwen L, Fang L, Xuan Z, Jing L, Hongping W. Immunoregulatory and anti-tumor effects of polysaccharopeptide and *Astragalus* polysaccharides on tumor-bearing mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2008;30(4):771–782. DOI: 10.1080/08923970802279183.
19. Saima Y, Das AK, Sarkar KK, Sen AK, Sur P. An antitumor pectic polysaccharide from *Feronia limonia*. *Int J Biol Macromol.* 2000;27(5):333–335. DOI: 10.1016/S0141-8130(00)00134-3.
20. Adami ER, et al. Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from green sweet pepper (*Capsicum annuum*) on mammary tumor cells in vivo and in vitro. *Carbohydr Polym.* 2018;201(May):280–292. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.08.071.
21. Stipp MC, et al. Necroptosis mediates the antineoplastic effects of the soluble fraction of polysaccharide from red wine in Walker-256 tumor-bearing rats. *Carbohydr Polym.* 2017;160:123–133. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.12.047.
22. Bressan A, Silva R, Fontenelle E, Gripp AC. Imunossupressores na dermatologia. *An Bras Dermatol.* 2010;85(1):9–22.
23. Santos EW, Oliveira DC, Hastreiter A, Silva GB, Beltran JS, Tsujita M, Crisma AR, Neves SM, Fock RA, Borelli P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Brazilian J Vet Res Anim Sci.* 2016;53(2):138. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145.
24. Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol.* 2006;6(3):317–333. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.
25. Shin H, et al. The effect of *Panax ginseng* on forced immobility time & immune function in mice. *Indian J Med Res.* 2006;124(2):199-206.
26. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 2002;15(1):323–350 DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323.
27. Liu J, Wang X, Yong H, Kan J, Zhang N, Jin C. Preparation, characterization, digestibility and antioxidant activity of quercetin grafted *Cynanchum auriculatum* starch. *Int J Biol Macromol.* 2018;114:130–136. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.101.
28. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology.* 2008;245(3):194–205. DOI: 10.1016/j.tox.2007.11.021.
29. Moghadam AR, Tutunchi S, Namvaran-Abbas-Abad A, Yazdi M, Bonyadi F, Mohajeri D, Mazani M, Marzban H, Los MJ, Ghavami S. Pre-administration of turmeric prevents methotrexate-induced liver toxicity and oxidative stress. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15(1):1–13. DOI: 10.1186/s12906-015-0773-6.
30. Miao Y, Ying Z, Hua L. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. *Front Immunol.* 2019;10:145. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00145.
31. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome p450 3A4 inhibition. *Clin. Pharmacokinet.* 2000;38(1):41–57. DOI: 10.2165/00003088-200038010-00003.