



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DE EXTRATOS DE *JODINA RHOMBIFOLIA* HOOK. ET ARN. E DE *CARAPA GUIANENSIS* AUBL. EM CULTIVO “IN VITRO” DA LINHAGEM CELULAR MCF-7 DE ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANO

Milene Conceição Lima

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Campus Universitário s/n°
Caixa-postal 354 CEP 96010-900
Pelotas – RS – Brasil

2005

Milene Conceição Lima

Efeitos Antiproliferativos de extratos de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. e de *Carapa guianensis* Aubl. em cultivo “in vitro” da linhagem celular MCF-7 de Adenocarcinoma de mama humano

Monografia apresentada como um dos requisitos ao grau de Bacharel em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia do Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas / RS.

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Tereza Alves Beira.

Pelotas
Estado do Rio Grande do Sul – Brasil
2005/1

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do Curso

Aos meus pais, pelo carinho, incentivo e esforço, na qual sempre me apoiaram em todas as etapas de minha formação.

Aos meus irmãos e sobrinhos que de uma forma ou de outra sempre estiveram ao meu lado oferecendo alegria e descontração.

A minha avó materna, que neste momento não está mais aqui presente, mas sei que onde ela estiver está muito feliz pela minha conquista.

Ao meu namorado, por todo amor e companheirismo nos momentos de conquistas e perdas.

A minha querida orientadora, Profa. Dra. Fátima Tereza Alves Beira, pela valiosa orientação, experiência, ensinamento e confiança, dispensadas na execução deste trabalho, o qual foi fundamental para minha formação profissional.

A amiga Profa. Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha, pelo carinho, incentivo e dedicação, o qual contribuiu para meu amadurecimento.

Ao Prof. Dr. Francisco Augusto Burket Del Pino, pelo ensinamento, amizade e atenção.

A Médica Gilca Costa Nachtigal pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag, pela preparação dos extratos, o qual contribuiu para a execução deste trabalho.

A Profa. Maria Regina Alves Rodrigues, pelo fornecimento do óleo da Andiroba, na qual foi essencial para a realização e complementação da minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Antônio Guimarães Aleixo, pelo apoio e auxílio, na qual foi fundamental para a realização dos resultados da minha pesquisa.

Um agradecimento especial a Profa. Vera Lúcia Bobrowski pela amizade.

Agradeço a professora e amiga Gladis Aver Ribeiro, pela dedicação e apoio.

Ao Técnico de Laboratório José Carlos Rosler Sandrini - Zeca, pela atenção, auxílio, amizade e interesse, o qual foi essencial para a realização deste trabalho.

Aos funcionários Luiz e Ademir, pelo apoio e convívio no decorrer do desenvolvimento da minha pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Cultivo Celular Danyelle, Vanessa Galli, André Grassmann, Ana Paula e Ana Fick pelo carinho, força e atenção, o qual contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho.

A amiga Viviane Maciel da Silva, pela dedicação e ajuda no decorrer dos meus experimentos.

Ao amigo Fabrício Souza Campos, pela amizade e apoio.

Aos professores, pelos ensinamentos e experiências transmitidas ao longo destes anos.

A Deus, pela vida, o qual neste momento estou trilhando meu caminho em busca de sabedoria.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. O que é Câncer	16
2.2. Características das Células Cancerosas	16
2.3. Fatores relacionados ao Câncer	17
2.4. Genética do Câncer	17
2.5. Sistema de Defesa do Organismo Humano	19
2.6. Classificação do Câncer	19
2.7. Processo de Carcinogênese	20
2.8. Estrutura Normal da Mama	21
2.8.1. Glândulas Mamárias	21
2.9. O que é Carcinoma de Mama	22
2.10. Comportamento do Carcinoma de Mama	23
2.11. Genética do Carcinoma de Mama	23
2.12. Patologia Mamária	24
2.13. Epidemiologia de Carcinoma de Mama	28
2.14. Fatores relacionados ao Carcinoma de Mama	29
2.15. Sintomas do Carcinoma de Mama	30
2.16. Prevenção do Carcinoma de Mama	31
2.17. Estágios do Carcinoma de Mama	34
2.18. Carcinoma de Mama Recorrente	35
2.19. Tratamentos do Carcinoma de Mama	35

2.20. Fármacos Antitumorais derivados de Planta	38
2.21. Plantas utilizadas na medicina popular	39
2.21.1. Planta <i>Jodina rhombifolia</i> Hook. et Arn.	39
2.21.2. Planta <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. MATERIAL	46
3.1.1. Meio de Cultivo	46
3.1.2. Soro	46
3.1.3. Linhagem Celular	47
3.1.4. Soluções	47
3.1.5. Equipamentos	48
3.1.6. Materiais Vegetais	48
3.1.7. Extratos e Frações	49
.....	
3.2. MÉTODOS	50
3.2.1. Técnicas de Cultivo Celular	50
3.2.2. Técnicas de Contagem de Viabilidade Celular	50
3.2.3. Preparação dos Extratos e Frações	51
3.2.4. Avaliação da Atividade Citotóxica dos Extratos e Frações em cultivos celulares	55
3.2.5. Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos e Frações de <i>Jodina rhombifolia</i> Hook. et Arn. e extratos de <i>Carapa guianensis</i> Aubl. em cultivos de monocamada	55
3.2.6. Análise Estatística	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. Estudo da atividade citotóxica dos extratos aquoso, metanólico e <i>Jodina rhombifolia</i> Hook. et Arn. sobre a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano	59
4.2. Estudo da atividade citotóxica das frações metanólica e hexânica de <i>Jodina rhombifolia</i> Hook. et Arn. sobre a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano	62

4.3. Estudo da atividade citotóxica dos extratos de éter de petróleo e <i>Carapa guianensis</i> Aubl. sobre a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano	64
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Glândula Mamária	22
FIGURA 2. Carcinoma de Mama	22
FIGURA 3. Localização dos genes BRCA1 e BRCA2 nos cromossomos 13 e 17 ..	24
FIGURA 4. Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2005, na população brasileira	29
FIGURA 5. Espécie vegetal <i>Jodina rhombifolia</i> Hook et Arn.	40
FIGURA 6. Detalhes dos ramos da espécie <i>Jodina rhombifolia</i> Hook et Arn.	40
FIGURA 7. Distribuição Geográfica da Família Santalaceae	41
FIGURA 8. Espécie vegetal <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	43
FIGURA 9. Detalhes das cascas e sementes da espécie <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	44
FIGURA 10. Esquema de preparação dos extratos aquoso, metanólico e clorofórmico	52
FIGURA 11. Esquema de fracionamento do extrato metanólico (JRM)	53
FIGURA 12. Esquema de preparação dos extratos de éter de petróleo e metanólico utilizado pelo Laboratório de Oleoquímica (DQO UFPel)	54
FIGURA 13. Atividade do extrato aquoso (JRA) sobre a linhagem MCF-7	60
FIGURA 14. Atividade do extrato metanólico (JRM) sobre a linhagem MCF-7	60
FIGURA 15. Fotos de células da linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, expostas durante 48 horas nas seguintes concentrações do extrato metanólico JRM: A) controle B) 0,6 mg/mL C) 0,15 mg/mL D) 0,06 mg/mL E) 0,015 mg/mL e F) 0,006 mg/mL	61
FIGURA 16. Atividade do extrato clorofórmico (JRC) sobre a linhagem MCF-7	62
FIGURA 17. Atividade da fração metanólica (JRMFM) sobre a linhagem MCF-7 ...	63
FIGURA 18. Atividade da fração hexânica (JRMFH) sobre a linhagem MCF-7	64
FIGURA 19. Atividade do extrato de éter de petróleo (CGEP) sobre a linhagem	

MCF-7	65
FIGURA 20. Atividade do extrato metanólico (CGEM) sobre a linhagem MCF-7	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais Genes Supressores de Tumor	18
TABELA 2. Oncogenes representativos dos Tumores Humanos	18
TABELA 3. Parâmetros de citotoxicidade do extrato metanólico (JRM) em MCF-7	61

LISTA DE ABREVIATURAS

BRCA: “breast cancer”

CGEM: Extrato Metanólico da *Carapa guianensis* Aubl.

CGEP: Extrato de Éter de Petróleo da *Carapa guianensis* Aubl.

CL₅₀: concentração do produto inibitória capaz de reduzir 50% o crescimento celular nos cultivos controle durante o período de incubação com o fármaco

CIT: concentração do produto que causa uma inibição total do crescimento celular, quando a quantidade de proteína presente na cavidade ao final do tempo de incubação é igual a presente no tempo de adição do produto

CL₅₀: concentração do produto que causa 50% de redução da quantidade de proteína medida a tempo zero

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetracético

GST: Genes Supressores de Tumor

JRA: Extrato Aquoso da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn.

JRC: Extrato Clorofórmico da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn.

JRM: Extrato Metanólico da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn.

JRM1: Filtrado 1

JRM2: Filtrado 2

JRM3: Filtrado 3

JRMFH: Fração hexânica da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn.

JRMFM: Fração metanólica da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn.

MCF-7: Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano

mL: mililitro

PBS: Solução Tampão de Fosfato

RNA: Ácido Ribonucléico

rpm: rotações por minuto

RPMI 1640: Meio de Cultivo

SBF: Soro Bovino Fetal

SRB: Sulforodamina B

TCA: Ácido Tricloroacético

μl: microlitro

RESUMO

LIMA, MILENE CONCEIÇÃO, Universidade Federal de Pelotas, Julho de 2005. **Efeitos Antiproliferativos de extratos de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. e de *Carapa guianensis* Aubl. em cultivo “in vitro” da linhagem celular MCF-7 de Adenocarcinoma de mama humano.** Orientadora: Profa. Dra. Fátima T. Alves Beira.

Jodina rhombifolia Hook. et Arn. também conhecida como “cancorosa de três pontas”, é uma espécie da família Santalaceae, nativa do Sul do Brasil, largamente empregada na medicina caseira do sul do país sobre úlceras crônicas, carcinomas e outros ferimentos infectados. Já a *Carapa guianensis* Aubl. conhecida como “andiroba”, é uma espécie da família Meliaceae, nativa de toda região Amazônica, apresentando uma larga aplicação na medicina popular como antiinflamatória, antibacteriana, antiartrítico, antitumoral e antifúngico. O presente estudo investigou os efeitos antiproliferativos de extratos e frações das folhas da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. e extratos do óleo da semente da *Carapa guianensis* Aubl. em cultivo “in vitro” da linhagem celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano. Esta linhagem celular foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com SBF a 10% e mantida a 37°C. Os extratos de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. foram preparados por decocção e liofilização, originando o extrato aquoso, o qual foi diluído em água pura para uso. A planta residual I resultante deste procedimento foi macerada originando filtrados e a planta residual II. Estes filtrados foram reunidos e liofilizados originando o extrato metanólico, o qual foi diluído em DMSO. A planta residual II foi macerada e liofilizada originando o extrato clorofórmico, também diluído em DMSO. O fracionamento do extrato metanólico foi realizado através de uma partição (L/L), originando as frações metanólica e hexânica, diluídas em DMSO. Os extratos de *Carapa guianensis* Aubl. foram preparados por maceração, destilação simples e extração no Soxhlet, originando r de petróleo, diluído em DMSO. Amostras foram submetidas à extração sob refluxo e decantação, obtendo-se o extrato metanólico, diluído em água pura. Extratos destas plantas revelaram atividade antiproliferativa frente à linhagem celular MCF-7. O extrato metanólico de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. apresentou atividade antiproliferativa e provocou morte celular, sendo mais ativo que o extrato aquoso e o clorofórmico. As frações metanólica e hexânica desta mesma planta apresentaram resultados irregulares sobre a proliferação celular. O extrato de éter de petróleo de *Carapa guianensis* Aubl. apresentou atividade antiproliferativa, sendo mais efetivo que o metanólico que não inibiu a proliferação celular, mas sim aumentou o crescimento. Com isso, o valor dos produtos naturais e seus componentes derivados são de extrema

(RIVERA-FILLAT & GRAU-OLIETE, 1995).

A via de aproximação utilizada na identificação de fármacos antineoplásicos derivados de plantas é basicamente “screening” ao acaso, nome quando se desconhece o mecanismo e os alvos celulares de ação dos produtos ensaiados. Quando algum dos extratos derivados dos produtos naturais demonstra atividade frente aos modelos tumorais experimentais adequados, fraciona-se até identificar o princípio ativo pelo efeito e obtenção de derivados semi-sintéticos ou sintéticos, que melhorem sua ação e/ou reduzam sua toxicidade e os custos de produção. O fracionamento dos extratos e a purificação das frações obtidas devem ser orientados em itumoral demonstrado nos modelos experimentais, que sejam representativos da possível atividade biológica que finalmente se quer obter. Ainda que, qualquer planta possa ser objeto de identificação ao acaso dos componentes com potenciais de atividade antitumoral, uma seleção prévia das plantas a serem estudadas pode estar baseado nos conhecimentos adquiridos através da medicina popular (BEIRA, 2000).

Jodina rhombifolia Hook. et Arn., conhecida popularmente no Brasil por “cancorosa”, “cancorosa de três pontas”, “erva cancorosa”, está entre as plantas utilizadas na medicina popular no tratamento de distintas enfermidades. Suas folhas e ramos são empregados na medicina caseira do sul do país contra resfriados, disenteria, problemas estomacais, úlceras crônicas, carcinomas e outros ferimentos infectados. Esta planta da família Santalaceae é nativa do Sul do Brasil, principalmente da mata de pinhais de SC e da Depressão Central do RS, mas também é encontrada no Paraguai, Argentina e Uruguai. Atualmente, ela está em perigo de extinção devido ao extrativismo indiscriminado (BACKES & IRGANG, 2002; LORENZI & MATOS, 2002; NORVETO, 2004).

Já a planta *Carapa guianensis* Aubl., conhecida popularmente no Brasil por “andiroba”, “carapa”, “carapinha”, apresenta uma larga aplicação na medicina popular da região Norte do Brasil como anti-reumática, antiinflamatória, antibacteriana, anti-helmíntica, repelente para insetos, ferimentos, úlceras, antiartrítico, antitumoral e antifúngico. Esta planta pertencente à família Meliaceae, é Amazônica, em várzeas secas e alagadiças, beira de rios e igarapés. É encontrada

também por todo o Norte da América do Sul, incluindo a Bacia Amazônica, a América Central, as Antilhas e a África Tropical (GRAHAM *et al*, 2000; LORENZI & MATOS, 2002; MITSUGUI *et al*, 2002; NEVES *et al*, 2004).

Portanto, é de suma importância identificar, avaliar e buscar novos e mais efetivos extratos derivados de produtos naturais para o tratamento de diversos tipos de cânceres. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos antiproliferativos de extratos e frações das folhas da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. e extratos do óleo da semente da *Carapa guianensis* Aubl. em cultivo “in vitro” da linhagem celular MCF-7 de Adenocarcinoma de mama humano, bem como desenvolver técnicas de cultivo de células humanas no Laboratório de Cultivo Celular (DFF-UFPE), visando alcançar os melhores níveis possíveis de qualidade para o laboratório através do acompanhamento e observação: das condições das soluções e solventes utilizados, dos materiais e equipamentos de uso corrente recentemente adquiridos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O que é Câncer

As células que constituem o corpo dos organismos multicelulares formam um conjunto de tecidos altamente organizados e regulados. Na sua formação, os órgãos só crescem até atingirem certo tamanho, pois suas células obedecem aos sinais recebidos para entrar em fase G – zero do ciclo celular e interromper a proliferação (BORGES & ROBINSON, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

As células cancerosas, no entanto, não se submetem a esse esquema de cooperação. São células com o DNA danificado, cujos fatores responsáveis são a atuação de vírus, fatores ambientais, radiações, alimentares, físicas, e que, por isso, escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular (AZEVEDO & MENDONÇA, 1993; BORGES & ROBINSON, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000; SEGATTO, 2004).

Dessa forma, o câncer pode surgir de uma única célula que sofreu mutações em genes que controlam a multiplicação celular (BORGES & ROBINSON, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

Essas células que escapam desse processo de regulação e passam a crescer e a se dividir descontroladamente recebem a denominação de neoplasia, e o conjunto de células resultantes que não possui função específica é denominado neoplasma ou tumor (BORGES & ROBINSON, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

O Tumor chamado Benigno é aquele que apresenta um crescimento lento, é se dissemina entre tecidos adjacentes e não forma metástases. Já o tumor maligno mostra um crescimento ilimitado, pode se disseminar tanto para os tecidos vizinhos, quanto por metástases, isto é, quando algumas células neoplásicas se descolam de adesão, entram na corrente sanguínea ou linfática e atingem outros órgãos, nos quais podem formar um novo foco tumoral (BORGES & ROBINSON, 2001; BRASIL, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

2.2. Características das Células Cancerosas

As células cancerosas apresentam várias características que as distinguem das normais como, crescimento e multiplicação descontrolados através da perda do controle do ciclo celular, alterações morfológicas, perda de inibição por contato, propriedades de habilidade em induzir a formação local de vasos sanguíneos (angiogênese), perda da afinidade celular específica, aumento da taxa de mutação, desdiferenciação, poder de invasão e citoplasma indiferenciado (BORGES & ROBINSON, 2001; COOPER, 2001; LEWIS, 2004).

2.3. Fatores relacionados ao Câncer

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer são: vírus (polioma vírus, simian vírus 40 - SV40, adenovírus e vírus herpético), radiações, substâncias químicas, tabagismo, hormônios (particularmente estrogênios), consumo exagerado de álcool, obesidade, agentes ambientais, tipo de dieta e hereditariedade (ALVES, 2001; BORGES & ROBINSON, 2001; COOPER, 2001; NAOUM, 2004).

2.4. Genética do Câncer

Os genes que estão implicados na carcinogênese (formação de câncer) estão divididos em duas grandes categorias: genes supressores de tumores (GST) e oncogenes (NAOUM, 2004).

❖ Genes Supressores de Tumores (GST)

O primeiro gene supressor de tumor identificado foi o gene *Rb*, descoberto por Alfred Knudson, em 1971, através de estudos sobre o retinoblastoma, um raro tumor de olho em crianças. Elas possuíam um alelo mutante para esse gene, encontrado na região do braço longo do cromossomo 13 (LEWIS, 2004).

Outro gene supressor de tumor identificado foi o *p53* que freqüentemente está inativado em uma grande variedade de cânceres humanos, incluindo carcinomas de mama, cólon, reto e tumores cerebrais (Tabela 1) (COOPER, 2001; PINTO *et al*, 2002).

Em 1990, foi descoberto o gene supressor de tumor *BRCA1* localizado no cromossomo 17 e em 1995, o gene *BRCA2* encontrado no cromossomo 13. Mutações nesses genes são responsáveis por metade de todos os casos familiares de carcinoma de mama (MACHNIEWICZ & FAUCZ, 2003).

Os genes supressores de tumor são genes capazes de suprimir a formação de um tumor, são responsáveis pela função regulatória do crescimento celular, na qual o efeito cancerígeno só vai aparecer quando eles estão ausentes ou são defeituosos nos dois cromossomos do genoma, ou seja, para eles perderem sua função, ambos os alelos têm que estar afetados (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000; RIBEIRO, *et al*, 2003; SILVA & HENRIQUES, 2003).

Os principais mecanismos que inativam a função desses genes supressores são a perda de heterozigidade, metilação, alterações cromossômicas, mutação de ponto, ganho de função auto-inibitória e polimorfismo. Dessa forma, quando esses genes perdem sua função eles não param o ciclo celular, não estimulam o sistema de reparo ptose (morte celular programada), provocando o efeito cancerígeno (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000; RIBEIRO, *et al*, 2003; SILVA & HENRIQUES, 2003).

Tabela 1. Principais Genes Supressores de Tumor

Gene	Tipo de Câncer
<i>APC</i>	Carcinoma de Cólon e Reto
<i>BRCA1</i>	Carcinoma de Mama e Ovário
<i>BRCA2</i>	Carcinoma de Mama
<i>DPC4</i>	Carcinoma Pancreático
<i>INK4</i>	Melanoma e Carcinoma de Pulmão
<i>p53</i>	Tumores Cerebrais, Carcinoma de Mama, Cólon e Reto
<i>PTC</i>	Carcinoma de células basais
<i>PTEN</i>	Tumores de cérebro e Carcinoma de Próstata
<i>Rb</i>	Retinoblastoma, Carcinoma de mama e Bexiga
<i>WT1</i>	Tumor de Wilms

Fonte: COOPER, 2001.

❖ Oncogenes

Os oncogenes foram descobertos em retrovírus que possuíam a capacidade de iniciar o processo neoplásico em animais. Estudos posteriores demonstraram que este processo ocorria devido à presença de um gene mutante incorporado no genoma viral, cuja origem teria sido a partir de um genoma eucariótico (SILVA & HENRIQUES, 2003). Os genes chamados oncogenes são aqueles capazes de produzir um fenótipo maligno quando introduzidos em células normais. Eles são genes dominantes na qual em estado normal, controlam o ciclo celular e quando são ativados, são denominados proto-oncogenes (RIBEIRO *et al*, 2003; SILVA & HENRIQUES, 2003).

A ativação de proto-oncogenes a oncogenes pode ocorrer por mutações, em somente um alelo, do tipo amplificação gênica, mutação de ponto e rearranjo estrutural. Estes processos levam à superprodução ou a um ganho de função de proteínas regulatórias envolvidas em vias de transdução de sinal, cont ciclo celular e, ainda, processo de apoptose (RIBEIRO *et al*, 2003; SILVA & HENRIQUES, 2003).

Tanto ensaios de transferência gênica como abordagens experimentais alternativas têm levado desde então à detecção de oncogenes celulares ativos em diversos tumores humanos (Tabela 2) (COOPER, 2001).

Tabela 2. Oncogenes representativos dos Tumores Humanos

Oncogene	Tipo de Câncer	Mecanismo de Ativação
<i>Abl</i>	Leucemia mielogênica crônica	Translocação
<i>Ret</i>	Carcinoma de Tireóide	Rearranjo de DNA
<i>D1</i>	Carcinoma de Mama	Amplificação
<i>ErbB-2</i>	Carcinoma de Mama e Ovário	Amplificação
<i>c-myc</i>	Carcinoma de Mama e Pulmão	Amplificação
<i>bcl-2</i>	Linfoma Folicular	Translocação
<i>RasK</i>	Carcinoma de Pâncreas	Mutação de Ponto
<i>Gip</i>	Carcinoma de Ovário	Mutação de Ponto

Fonte: COOPER, 2001.

2.5. Sistema de Defesa do Organismo Humano

Existem, no organismo humano, diversos sistemas de defesa para evitar a divisão celular descontrolada, como a apoptose e o sistema imunológico íntegro (BORGES & ROBINSON, 2001).

❖ Apoptose

Quando algum componente essencial da célula está danificado ou algum de seus sítios de controle está desregulado, a célula entra em apoptose ou morte celular programada. Por exemplo, dano ao DNA, ativação de um oncogene ou inativação de um gene supressor de tumor, são fatores que podem desencadear a apoptose (BORGES & ROBINSON, 2001).

❖ Sistema Imunológico Íntegro

A integridade do sistema imunológico é outro mecanismo de defesa do organismo contra células cancerosas, já que por intermédio de anticorpos e citocinas combatem as células danificadas, muitas das quais possuem antígenos específicos, estranhos à bagagem antigênica normal do organismo (BORGES & ROBINSON, 2001).

As células T auxiliares (TCD4) produzem citocinas, como interferons e fatores de necrose tumoral, que atacam as células cancerosas e fazem cessar o crescimento do tumor (BORGES & ROBINSON, 2001; BRASIL, 2002).

As células T citotóxicas (TCD8) atacam as células cancerosas, ligando-se a elas fisicamente, mediante união de dois peptídeos de superfície que formam os receptores das células T, pelos quais se ligam a antígenos estranhos. Quando uma célula T citotóxica encontra uma célula cancerosa, esses receptores colocam as duas células em contato físico e a célula T citotóxica libera uma proteína chamada perforina, que perfura a membrana da célula cancerosa. Essa perfuração desequilibra o fluxo de -a a morte (BORGES & ROBINSON, 2001; BRASIL, 2002).

2.6. Classificação do Câncer

Segundo REES (2001) “o câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou”.

❖ Carcinomas

Os carcinomas se originam de células que revestem as superfícies do corpo, incluindo a pele e vários revestimentos internos. Entre esses brônquios, estômago, bexiga, útero, ovários, próstata, pâncreas e os revestimentos dos ductos mamários. Há tipos diferentes de carcinomas, nomeados de acordo com a aparência das células normais das quais foram originados. Carcinomas escamosos originam-se na pele e pulmões, adenocarcinomas se originam no estômago, ovário e mamas e carcinomas de transição originam-se na bexiga (ALBERTS *et al*, 1997; REES, 2001).

tumor (INCA, 2004b).

Estágio de Iniciação: as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que provocam modificações em alguns de seus genes. Nesta fase as células se encontram, geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente (BELIZÁRIO, 2002; INCA, 2004b).

Estágio de Promoção: as células geneticamente alteradas, ou seja, "iniciadas", sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas (INCA, 2004b).

Estágio de Progressão: caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese - aceleradores ou carcinógenos (BELIZÁRIO, 2002; INCA, 2004b).

2.8. Estrutura Normal da Mama

A mama passa por diversas alterações ao longo da vida, assim a amamentação, a época do ciclo menstrual e a idade da mulher são re tamanho, consistência e formato do seio. Além disso, a comparação das mamas pode mostrar uma pequena diferença entre elas, pois geralmente não são simétricas

As alterações nas mamas são decorrentes de influências hormonais (níveis de estrogênio e progesterona que ocorrem desde a fase intra-útero até a menopausa). Além desses, outros hormônios também estão envolvidos no desenvolvimento e alterações variáveis do tecido mamário

2.8.1. Glândulas Mamárias

As mamas são glândulas exócrino-túbulo-alveolares, com 15 a 20 unidades lactíferas formadas por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. Essas unidades são compostas de alvéolos formados por pequenas glândulas secretoras envolvidas por células mioepiteliais, que se comunicam com a superfície através de um sistema de drenagem formado por canalículos e canais. Esses canais vão confluindo e à medida que se aproximam da superfície, se dilatam formando os seios lactíferos, que por sua vez vão abrir-se ao mamilo, através dos poros mamilares, exatamente por debaixo da aréola (Figura 1) (As variações da mama normal, 2004; DIÓGENES *et al*, 2001).

A glândula mamária é um órgão dinâmico, que se desenvolve a partir de anexos peitoral e que se altera continuamente de acordo com as flutuações dos níveis hormonais, principalmente dos hormônios que regem no ciclo menstrual, como o estrógeno e a progesterona. Isso explica várias modificações que notamos nas mamas no decorrer do ciclo menstrual, durante a gravidez, na amamentação e no climatério (menopausa) (As variações da mama normal, 2004; DIÓGENES *et al*, 2001).

Cada pessoa responde de forma diferente aos estímulos hormonais. Por isso encontramos mulheres que têm as mamas mais densas do que outras, que têm maior -menstrual, e que têm maior tendência à formação de áreas de volume aumentado (semelhantes a nódulos), que diminuem após a (As variações da mama normal, 2004; DIÓGENES *et al*, 2001).

Com o avançar da idade, o tecido glandular mamário vai sendo substituído por tecido gorduroso, em maior ou menor grau de acordo com algumas variáveis, como a resposta individual à ação hormonal interna, a existência ou não de gravidez, o uso de hormônios externos como anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal (As variações da mama normal, 2004; DIÓGENES *et al*, 2001).

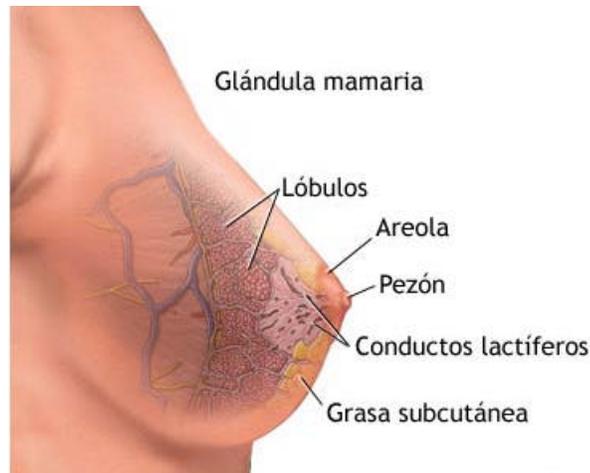


Figura 1. Glândula Mamária.

Ampliado: 400 x 320.

Fonte: <www.nlm.nih.gov/.../esp_imagepages/17084.htm>

2.9. O que é Carcinoma de Mama

O desenvolvimento de um carcinoma de mama é um processo que evolui em etapas sucessivas. O início do processo neoplásico, ou seja, a primeira transformação de uma célula normal em uma célula tumoral, parece prescindir pela ação de hormônios. Este carcinoma é originado por uma multiplicação anormal, exagerada e desordenada das células do seio (células epiteliais). Essas células dividem-se e formam mais células com uma velocidade maior que as normais, desencadeando o aparecimento de massas celulares denominadas neoplasias ou tumores (Figura 2). O carcinoma geralmente começa com um pequeno nódulo (tumor benigno), que com o tempo pode crescer e espalhar-se para áreas próximas (tumor maligno). As primeiras metástases comumente aparecem nos gânglios linfáticos das axilas (2004b; MACHNIEWICZ & FAUCA, 2003; O que é câncer de mama, 2004; VERONESI *et al*, 2002).

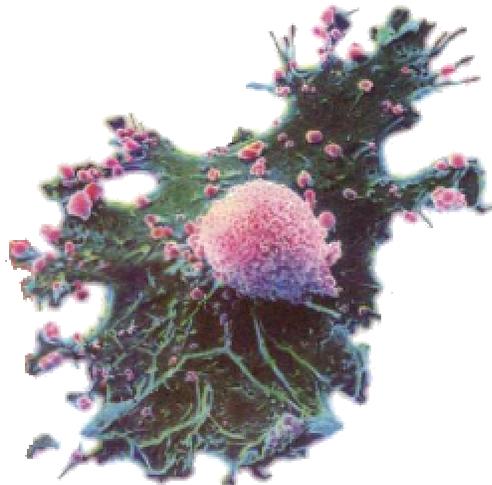


Figura 2. Carcinoma de Mama.

Fonte: Revista Super Interessante . Ano 15. n.1.
Editora Abril, Janeiro de 2001.

(Câncer de mama, 2004a).

2.11. Genética do Carcinoma de Mama

Os genes supressores de tumor, como o BRCA1 e BRCA2 (“**breast cancer**”) apresentam função regulatória do crescimento celular e capacidade de suprimir a formação de um tumor. Mutações nestes genes são responsáveis, respectivamente, por 50% e 35% dos casos familiares de carcinoma de mama, por não permitir um reparo correto de quebras bifilamentares do DNA (LECORRE *et al*, 2004; MACHNIEWICZ & FAUCZ, 2003; RICKI, 2004; SILVA & HENRIQUES, 2003; VERNETTI, 2004).

Em 1990, foi identificado no braço longo do cromossomo 17 o gene BRCA1, composto de 24 exons, em 89 Kb de DNA genômico e que codifica uma proteína de 1863 aminoácidos. Já em 1995, identificaram o BRCA2 localizado no braço longo do cromossomo 13, apresentando 10.443 nucleotídeos genômico, com 27 exons e codificando uma proteína de 3.350 aminoácidos (Figura 3) (MACHNIEWICZ & FAUCZ, 2003).

Atualmente, mais de 700 mutações distintas já foram identificadas em cada um destes genes. No BRCA1, a mutação mais comum é a deleção de duas bases adjacentes, sendo as outras duas a inserção e a deleção de uma base. No BRCA2, foi encontrada uma deleção de 3 nucleotídeos que altera a armação de leitura e conduz a (GALLARDO *et al*, 2004; LOURENÇO, 2004; MACHNIEWICZ & FAUCZ, 2003; RICKI, 2004).

O método de diagnóstico de mutações considerado como padrão é o seqüenciamento completo de ambos os genes, entretanto, nos dias de hoje, a reação em cadeia da polimerase (PCR) que amplifica o DNA genômico é a mais utilizada para fornecer um diagnóstico precoce, pois dependendo do tipo de mutação e do gene mutado, mulheres portadoras apresentam um maior risco de carcinoma de mama (até 85% ao longo da vida) (GALLARDO *et al*, 2004; MACHNIEWICZ & FAUCZ, 2003; NAROD & DUBE, 2002; RICKI, 2004).

Dessa forma, o indivíduo que herda uma cópia mutada de um gene BRCA não possui uma importante barreira celular para o crescimento descontrolado (CONTANT *et al*, 2002; GALLARDO *et al*, 2004).

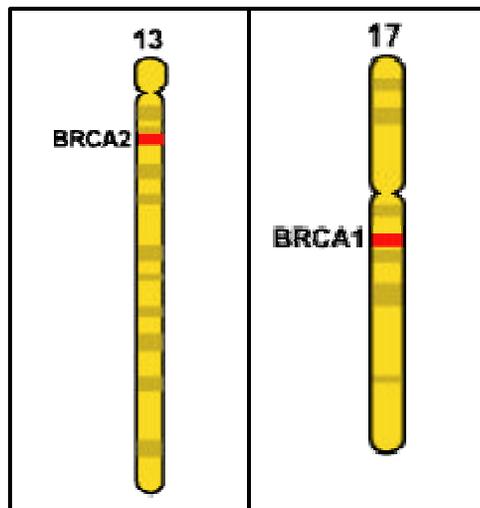


Figura 3. Localização dos genes BRCA1 e BRCA2 nos cromossomos 13 e 17.

Ampliado: 166 x 225.

Fonte: <gslc.genetics.utah.edu/.../images/BRCA12.gif>

❖ Anomalias do Desenvolvimento

Esta patologia pode ser subdividida nos seguintes itens: Amastia, Hipotrofia, Hiper mastia, Assimetria, Atrofia mamária e Mama acessória.

→ Amastia

Ausência de mamas que pode ser unilateral ou bilateral. Neste caso, o tratamento mais utilizado é por hormonioterapia, ou seja, através de hormônios.

→ Hipotrofia

São mamas muito pequenas ou pouco desenvolvidas. Mulheres com essa anomalia podem apresentar uma pequena ação hormonal estrogênica.

→ Hiper mastia

Crescimento exagerado das mamas, devido ao aumento da sensibilidade do tecido mamário aos estímulos hormonais. O tratamento mais adequado é através de cirurgia reparadora.

→ Assimetria

Desenvolvimento desigual das mamas. É muito comum na adolescência, atribuído a diferenças de receptividade das mamas ao estímulo hormonal. A assimetria pode corrigir-se espontaneamente ao fim da puberdade.

→ Atrofia mamária

Pode ser encontrada em mulheres que emagrecem rapidamente, uma vez que o tecido mamário é formado juntamente por tecido gorduroso. Observa-se uma diminuição do volume da mama, flacidez e várias pregas cutâneas.

→ Mama acessória

Significa crescimento do parênquima mamário, geralmente sem aréola e papila, . Encontra-se na axila ou em ambos os lados. A mama acessória ou supranumérica causa transtornos na gravidez.

❖ Processos Inflamatórios

Segundo BASTOS (1998) os processos inflamatórios apresentam-se divididos em: dor mamária, mastite aguda e mastite crônica.

→ Dor mamária

A dor mamária é um dos problemas mais freqüentes em relação às mamas. As causas da dor mamária podem ser por alterações funcionais benignas da mama, traumas e infecções nas articulações dos arcos costais e neurites. As alterações funcionais benignas da mama, chamadas de displasia mamária apresentam como sinais dor e espessamento mamário que geralmente aumenta no período pré-menstrual. O fator determinante para essas alterações é hormonal, ligado aos estrogênios que a mulher produz nos ciclos menstruais.

→ Mastite Aguda

Caracteriza-se pelo aparecimento de uma área endurecida dolorosa, de extensão variável. A dor aumenta de intensidade progressivamente e a área torna-se sensível à palpação. Os primeiros sintomas são edema, devido a linfangite da mama, abatimento físico, taquicardia, cefaléia, hipertemia e calafrios.

→ Mastite Crônica

A mais freqüente é o abscesso mamário subareolar crônico. Os principais sintomas são dor, calor, aumento do volume da mama, febre e abscesso e os principais tratamentos são com antibioticoterapia, antitérmicos e analgésicos.

conteúdo líquido, na maioria das vezes, é amarelado e sua análise revela poucas células ou evidência de células degeneradas.

- Tumor Filodes (Phyllodes)

Esse tumor, muitas vezes é benigno, mas pode ser maligno em 7 a 10% dos casos. Ele assemelha-se ao fibroadenoma, sendo que o tecido conjuntivo é firme, denso e não encapsulado.

- Galactocele

É uma lesão pouco comum que ocorre nas mulheres que estão amamentando ou que deixaram de amamentar a pouco tempo. Ocorre devido a obstrução canalicular, por causa do acúmulo de secreção láctea. Geralmente apresenta tumoração de consistência cística ou amolecida e não possui características inflamatórias.

- Lipoma

É um tumor benigno caracterizado por multiplicação das células adiposas benignas. Normalmente, apresenta-se como uma massa isolada, amolecida, bem delimitada e encapsulada.

→ Tumores Suspeitos

Os tumores suspeitos subdividem-se em: alterações fibrocísticas, necrose gordurosa, ectasia ductal tumoral e papiloma intraductal.

- Alterações Fibrocísticas

Neste caso há uma proliferação do tecido epitelial e/ou conjuntivo, causada por estímulos hormonais. São tumores palpáveis, encontrados durante a menacme (fase mais intensa do período menstrual) e que regredem após a menopausa.

- Necrose Gordurosa

Consiste em necrose de células adiposas da mama, devido ao trauma ao ato cirúrgico. É geralmente encontrado em mamas volumosas, pendentes com circulação venosa prejudicada, principalmente por mamas substituídas por tecido adiposo.

- Ectasia Ductal Tumoral

É a dilatação dos ductos terminais com acúmulo de restos epiteliais, podendo apresentar estrangulamento dos ductos, inflamação e fibrose. Ocorre alteração do contorno mamário pela retração, por conduta fibrosa reati

- Papiloma Intraductal

É quando ocorre uma multiplicação do epitélio ductal e o tumor normalmente é fixado a parede do ducto por um pedículo.

→ Tumores Malignos

Apresentam como características nódulos não definidos, escoamento sanguinolento pela papila, pele da mama infiltrada por edema e retração papilar, devido ao tecido fibroso adjacente. Esses tumores apresentam-se de duas formas: carcinoma e sarcoma.

- Carcinoma

Esse tumor tem origem nas células dos ductos ou ácinos, podendo infiltrar-se ao estroma mamário adjacente. Normalmente é palpável quando atinge 1cm de diâmetro, apresenta uma consistência firme, endurecida e com limites irregulares.

O carcinoma é dividido em carcinoma não invasivo, na qual está o carcinoma ductal e carcinoma lobular, e o carcinoma invasivo, na qual enquadra-se o carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular invasivo, carcinoma medular, carcinoma colóide, carcinoma tubular e carcinoma papilar.

- Sarcoma

Forma-se nos tecidos conjuntivos, onde é mais comum o tumor se dissipar para outras partes do corpo da mulher.

2.13. Epidemiologia de Carcinoma de Mama

O carcinoma de mama é considerado a mais freqüente neoplasia que acomete diversas mulheres em todo o mundo, com mais de 1.000.000 novos casos e aproximadamente 373.000 mortes a cada ano, representando um grave problema de saúde pública. No Brasil, representa a primeira neoplasia em incidência na mulher, sendo que a maioria dos casos relatados encontra-se na região Sul (67%) (GUAENERI & CONTE, 2004; MELO *et al*, 2002; PAULINELLI *et al*, 2003; SICHIERI, 1992).

Mais de 8 mil mortes já foram registrados em 1999. Somente no estado de São Paulo, por ano, estima-se a ocorrência de 11 mil casos novos (Câncer de mama, 2004a; HADDAD & SILVA, 2001).

São esperados 229.610 casos novos para o sexo masculino e 237.830 para sexo feminino. Estima-se que no ano de 2005, o câncer de pele não melanoma (113 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), pulmão (26 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (21 mil) (Figura 4) (INCA, 2005a).

A incidência por carcinoma de mama feminina apresentou um crescimento contínuo na última década, o que pode ser resultado de mudanças sócio-demográficas e acessibilidade aos serviços de saúde (INCA, 2005a).

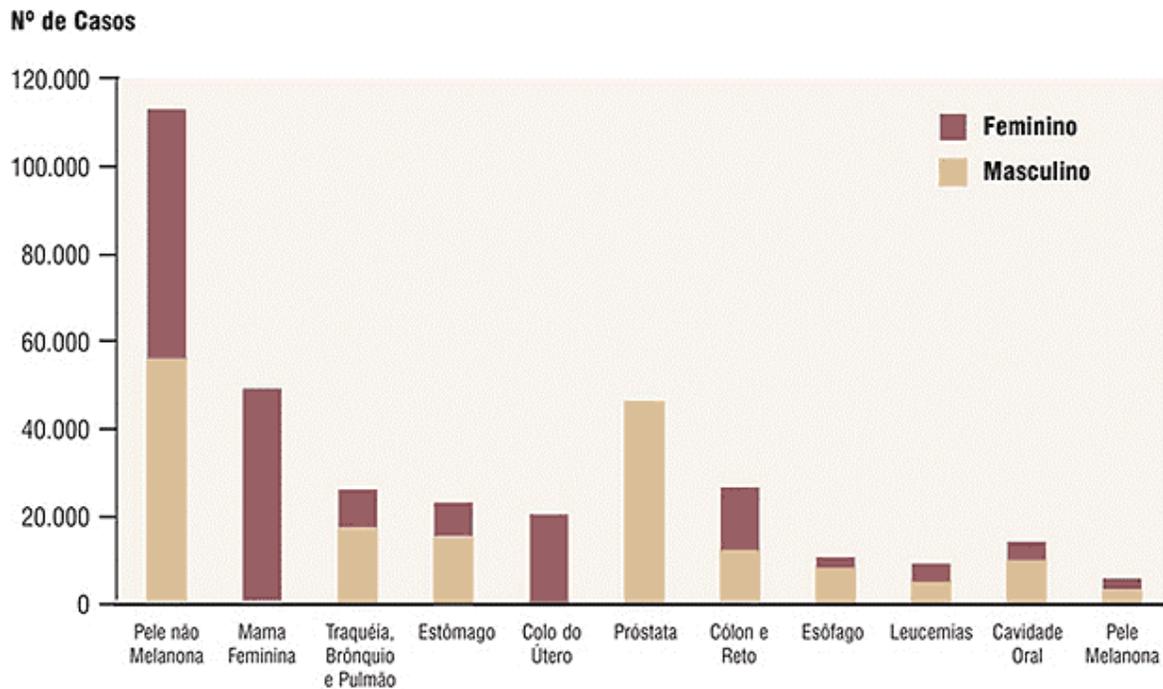


Figura 4. Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2005, na população brasileira.

Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/index.asp?link=conteudo_view.asp>

2.14. Fatores relacionados ao Carcinoma de Mama

O carcinoma de mama necessita de vários anos para se desenvolver e se multiplicar. O processo geralmente se inicia com uma alteração das células, que pode ser causada por diversos fatores (Câncer de mama, 2004a).

- ❖ Idade: o risco aumenta conforme a mulher envelhece. A maioria dos carcinomas de mama aparecem em mulheres a partir dos 40 anos (Câncer de mama, 2004a).
- ❖ Nível sócio-econômico baixo: mulheres de nível socioeconômico baixo não apresentam condições de realizar exames anuais de detecção (mamografia) ao carcinoma de mama (DIÓGENES *et al*, 2001).
- ❖ História pessoal ou familiar de carcinoma de mama: mulheres que já tiverem carcinoma de mama têm mais chances de desenvolver carcinoma no outro seio também. Mulheres que tenham parentes de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) diagnosticadas com carcinoma de mama têm o risco aumentado. Este risco se eleva ainda mais se tiver mais de um parente com carcinoma (Câncer de mama, 2004a; PORTUGAL, 2004).
- ❖ Longa história menstrual: mulheres que iniciaram a menstruação antes dos 12 anos ou tiveram menopausa após os 55 possuem o maior risco (Câncer de mama, 2004a; PORTUGAL, 2004).

s que crescem lentamente ou rapidamente, sobretudo quando não desaparece durante o ciclo menstrual e não muda de local quando apalpado. É bom lembrar que a maioria dos nódulos que aparecem na região mamária são tumores benignos, como por exemplo, os cistos e os fibroadenomas (GONZALES, 1994; Prevenindo o câncer de mama, 2004).

A grande preocupação, portanto, é com os tumores malignos, que se desenvolvem sem provocar dor, por isso devem ser diagnosticado o mais

cintura e com os braços pendentes ao lado do corpo. A autopalpação deve ser feita em cada mama (aréola, mamilo e região axilar) usando a polpa dos dedos da mão do lado oposto em movimentos circulares. Ela deve ser realizada em pé (durante o banho) e deitada, tendo a mão do lado a ser palpado embaixo da cabeça (GONZALES, 1994; LIS, 2004).

→ Mamografia

É um tipo especial de radiografia, realizada em um aparelho de alta resolução, que permite visualizar nódulos, densidades anormais nos tecidos. As microcalcificações são pequenos depósitos de cálcio que as células podem produzir,

e de acordo com o seu tipo e sua distribuição na mama, pode levar a suspeita da presença de um carcinoma na fase inicial, quando ainda não é palpável nenhum sintoma. Nesta fase, só através da mamografia é possível visualizar este tumor. Porém, para isso é necessário que o exame seja feito dentro de rigoroso padrão de qualidade e que o profissional que o analisa seja capacitado nessa área (As variações da mama normal, 2004).

A mulher deve fazer a primeira mamografia por volta dos 35 anos, para saber como estão as mamas. Até os 40 anos, ela só deve repetir o exame se houver uma indicação médica. Dos 40 aos 49 anos, é conveniente realizar o exame de dois em dois anos e a partir dos 50 anos, anualmente (As variações da mama normal, 2004; PORTUGAL, 2004).

→ Ultrassonografia

Não é um exame preventivo para o carcinoma de mama, já que não é eficaz na detecção de microcalcificações. Em alguns casos pode ser indicado como um exame complementar a mamografia, para esclarecer, por exemplo, se um nódulo é líquido ou sólido. É realizado através da emissão de ondas de ultra-som, que produzem imagens de ecos variáveis de acordo com a reflexão sonora de cada estrutura (As variações da mama normal, 2004).

É o exame mais indicado para o início da investigação de nódulos palpáveis em mulheres muito jovens. Isso porque quando a mulher é jovem, as mamas são ricas em tecido glandular e pobres em tecido gorduroso, o que as deixa muito densas na mamografia, sendo melhor visualizadas no ultra-som. Além disso, adolescentes podem ter nódulos benignos ou cistos, que podem ser bem diagnosticados através do ultra-som, evitando assim a exposição precoce aos Raios-X (As variações da mama normal, 2004).

→ Ductografia

É um exame radiográfico parecido com a mamografia, no qual é usado um contraste para visualizar o interior dos ductos. É indicado quando há suspeita de papiloma ou de carcinoma intra ductal, geralmente quando aparece secreção papilar suspeita, através de um só orifício (As variações da mama normal, 2004).

O exame começa com a identificação do orifício por onde sai a secreção. Nele é introduzida uma fina cânula de metal, na qual é injetado um líquido que contrasta o interior do ducto acometido (As variações da mama normal, 2004).

→ Ressonância Nuclear Magnética

É um exame sofisticado, que vem sendo utilizado como complementar para o diagnóstico de nódulos e de densidades assimétricas nas mamas, junto a mamografia e a ultra-sonografia. Permite uma avaliação detalhada de nódulos, sem a utilização de raios-X. Proporciona uma visão mais abrangente da região profunda do tecido mamário (próxima aos arcos costais). É um método muito eficiente para o estudo de nódulos situados nesse local, e também para o controle de próteses mamárias. Também tem

indicação para complementar a mamografia de pacientes com mamas muito densas (em geral pacientes jovens ou com displasia) (As variações da mama normal, 2004).

→ Biópsias

O diagnóstico definitivo de algumas doenças da mama, entre elas o carcinoma, é feito através da biópsia. A biópsia consiste na retirada de parte ou de todo o tecido alterado, para que o patologista possa examiná-lo e classificá-lo. Atualmente, há vários meios de se obter esse material, sendo que cada um desses métodos tem suas características (As variações da mama normal, 2004).

- Punção aspirativa por agulha fina

Consiste na aspiração de células do lugar suspeito, através de uma agulha muito fina e seringa, guiada através de ultra-som ou de mamografia. É um método rápido e indolor, que visa obter algumas células com as quais são feitas lâminas para exame patológico. A limitação desse método é a quantidade de material que é retirada, às vezes insuficiente para fornecer um diagnóstico preciso (As variações da mama normal, 2004).

- Biópsia de fragmento

Consiste na retirada de fragmentos de tecido alterado. O procedimento pode ser orientado por ultra-som, mamografia ou ressonância, dependendo de alguns fatores como: a densidade radiográfica da lesão a ser analisada, a sua localização e as dimensões, tanto da lesão como da mama a ser examinada. O tecido é obtido através de uma agulha conectada a uma pistola especial; A agulha é um pouco mais grossa que a utilizada na punção aspirativa. É feita uma anestesia local antes da coleta do material. Esse tipo de biópsia não requer internação hospitalar e não deixa cicatrizes. Como permite a retirada de quantidades maiores de tecido mamário, possibilita o diagnóstico preciso da lesão na grande maioria dos casos (As variações da mama normal, 2004).

→ Testes genéticos

Pesquisas demonstraram a existência de dois genes supressores de tumor (BRCA1 e BRCA2) relacionados ao carcinoma de mama. Atualmente já existem testes genéticos laboratoriais que identificam, através de uma amostra de sangue, se temos algum defeito ou mutação nesses genes. Um estudo feito pela Clínica Mayo concluiu que as pessoas que têm indicação de realizar esses testes genéticos são aquelas que apresentam dados familiares típicos de transmissão hereditária de carcinoma de mama. Para detectar mutações em genes relacionados ao carcinoma de mama utiliza-se a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) e a técnica de Eletroforese em gel de agarose a 2% (AMPUERO, 2002; GALLARDO *et al*, 2004; HADJISAVVASA *et al*, 2003).

A cenoura e abóbora possuem carotenóides que são potentes antioxidantes, estimuladores do sistema imunológico e inibidores de mutações celulares i enquanto que alimentos ricos em vitamina A, C, E ou betacaroteno protegem as células, mantendo o sistema imunológico saudável (BONUMÁ, 2004; CHAVES, 1985; GEORGE, 2004; MAHAN & STUMP, 1998).

2.17. Estágios do Carcinoma de Mama

Com informações do tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos (avaliado na cirurgia) e metástases à distância, a doença é classificada em: mama, 2004a).

Estágio 0: é o chamado carcinoma in situ que não se infiltrou pelos dutos ou

Estágio I: o tumor é pequeno e não se espalhou pelos linfonodos.

Estágio IIa: qualquer das condições abaixo:

- O tumor tem menos que 2cm e infiltrou-se nos linfonodos axilares.
- O tumor tem entre 2 e 5cm , mas não atinge linfonodos axilares.
- Não há evidência de tumor na mama, mas existe tumor nos linfonodos axilares.

Estágio IIb: qualquer das condições abaixo:

- O tumor tem de 2 a 5cm e atinge linfonodos axilares.
- O tumor é maior que 5cm, mas não atinge linfonodos axilares.

Estágio IIIa: qualquer das condições abaixo:

- O tumor é menor que 5cm, se espalhou pelos linfonodos axilares que estão aderidos uns aos outros ou a outras estruturas vizinhas.
- O tumor é maior que 5cm, atinge linfonodos axilares os quais podem ou aos outros ou a outras estruturas vizinhas.

Estágio IIIb: o tumor infiltra a parede torácica, causa inchaço, ulceração da mama ou é diagnosticado como carcinoma de mama inflamatório. Pode ou não ter se espalhado para os linfonodos axilares, mas não atinge

Estágio IIIc: qualquer tamanho de tumor que não se espalhou para partes distantes, mas que atinge linfonodos acima e abaixo da clavícula ou para linfonodos dentro da mama ou abaixo do braço.

Estágio IV: qualquer tamanho de tumor que tenha se espalhado para outros locais do corpo como ossos, pulmões, fígado ou cérebro.

2.18. Carcinoma de Mama Recorrente

O carcinoma de mama é denominado recorrente se ele volta após já ter sido diagnosticado e tratado. Ele pode retornar na mama (chamada de recorrência local) na parede torácica ou em qualquer parte do corpo como ossos ou outros linfonodos (chamados de metástases à distância)

2.19. Tratamentos do Carcinoma de Mama

O carcinoma de mama deve ser abordado por uma equipe multidisciplinar visando o tratamento integral da paciente. As modalidades terapêuticas disponíveis atualmente são a cirúrgica e a radioterápica para o tratamento loco-regional e a hormonioterapia e a quimioterapia para o tratamento sistêmico (BRASIL, 2004).

❖ Cirurgia

A indicação de diferentes tipos de cirurgia depende do estadiamento clínico e do tipo histológico, podendo ser conservadora ressecção de um segmento da mama (engloba a setorectomia, a tumorectomia alargada e a quadrantectomia), com retirada dos gânglios axilares ou linfonodo sentinela, ou não-conservadora (mastectomia). São modalidades de mastectomia: Simples ou Total (retirada da mama com pele e complexo aréolo papilar), com reconstrução imediata ou poupadora de pele (BRASIL, 2004; QUEIROZ & TEDDE, 2000).

❖ Radioterapia

As indicações da radioterapia no tratamento do carcinoma de mama metastático variam em relação às diferentes apresentações da doença a ser tratada (VERONESI *et al*, 2002).

A radioterapia é realizada usando feixes de raios-x de alta energia e de penetração profunda, na qual miram o DNA no núcleo da célula, pois se for suficientemente danificado, as células perderão sua habilidade de se replicar. Células normais também são, de certa forma, afetadas pelos raios (MIZUNO, 1997; REES, 2001).

O objetivo deste tratamento é destruir as células remanescentes após a cirurgia ou para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia. Após cirurgias conservadoras deve ser aplicado em toda a mama da paciente, independente do tipo histológico, idade, uso de quimioterapia ou hormonioterapia ou mesmo com as margens cirúrgicas livres de comprometimento neoplásico (BRASIL, 2004).

A radioterapia é usualmente administrada em dosagem alta (radioterapia radical) quando o objetivo é destruir completamente o tumor. Uma dose mais baixa é dada quando a radioterapia é feita como um tratamento adjuvante (auxiliar) para prevenir o retorno do câncer após remoção cirúrgica (REES, 2001).

❖ Hormonioterapia

A hormonioterapia é um tratamento que previne as células cancerosas de obter ou utilizar os hormônios que necessitam para seu crescimento (CARRENO *et al*, 1999; REES, 2001).

Tamoxifeno, que funciona bloqueando o mecanismo pelo qual o hormônio estrógeno estimula o crescimento das células cancerosas, é a droga mais prescrita para mulheres com carcinoma de mama. A maioria das mulheres tolera bem o tamoxifeno, mas às vezes causa certos efeitos colaterais, tais como calores, ganho de peso e REES, 2001; VERONESI *et al*, 2002).

❖ Terapia Biológica

O desenvolvimento de um anticorpo humanizado anti-HER2/Neu parece ter ampliado sobremaneira os horizontes do tratamento do carcinoma de mama. O HER2/Neu constituiu um oncogene com grande atividade no estímulo e na manutenção da proliferação celular tumoral. O mesmo encontra-se amplificado ou hiperexpressado em 30% dos tumores de mama metastáticos. Seu uso isolado na doença metastática de pacientes cujo tumor apresenta hiperexpressão do HER2, proporciona uma taxa de resposta de 21% e uma duração mediana de resposta de 8 meses, com excelente tolerabilidade. Entretanto, os resultados mais promissores parecem ocorrer quando a droga é associada a quimioterápicos (MURAD, 2000).

❖ Quimioterapia

A quimioterapia citotóxica é ativa contra células cancerosas e células normais que estão na fase de divisão celular (mitose). Este tratamento consiste no emprego de substâncias químicas isoladas ou combinadas, como a combinação CMF

ritrócitos e de plaquetas, contagem baixa de espermatozóides (possível esterilidade permanente) e um aumento do risco de leucemia (BARROS, 2005; INCA, 2005c; MERCK, 2005).

→ Agentes Antimetabólitos

Os agentes antimetabólitos afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA. Deste modo, impedem a multiplicação e funções normais da célula. Estes agentes são particularmente ativos contra células que se encontram na fase de síntese do ciclo celular. A duração da vida das tumorais suscetíveis determina a média de destruição destas células, as quais são impedidas de entrar em mitose pela ação dos agentes metabólicos que atuam na fase S do ciclo celular. Os principais antimetabólitos são antifolato, análogos da purina e análogos da pirimidina. Além de causar os mesmos efeitos colaterais que os agentes alquilantes, certos antimetabólitos causam erupção cutânea, escurecimento da pele (aumento da pigmentação) e insuficiência renal (BARROS, 2005; INCA, 2005c; MERCK, 2005).

→ Antibióticos Antitumorais

São um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora interajam com o DNA, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular. Apesar de apresentarem tal variação, possuem em comuns a que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a conseqüente produção de radicais livres reativos. Como todos os quimioterápicos, esses antibióticos atuam tanto sobre as células normais como sobre as malignas. Por isso, também apresentam efeitos colaterais indesejáveis, como reações alérgicas potencialmente letais, perda de apetite, náusea, vômito e febre. Os principais antibióticos incluem a epirubicina, a actinomicina e a bleomicina (BARROS, 2005; INCA, 2005c; MERCK, 2005).

→ Inibidores Mitóticos

Os inibidores mitóticos podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos. Deste modo, os cromossomos ficam impedidos de migrar, ocorrendo à interrupção da divisão celular. Devido ao seu modo de ação específico, os inibidores mitóticos devem ser associados a outros agentes para maior efetividade da quimioterapia. Neste grupo de drogas estão incluídos os alcalóides da vinca rósea (vincristina, vimblastina e vindesina) e os derivados da podofilotoxina (VP-16 e VM-26) (INCA, 2005c; VERONESI *et al*, 2002).

Segundo VERONESI (2002) “VP-16 demonstra excelente biodisponibilidade quando administrado pela via oral e a sua atividade no carcinoma de mama encontra-se entre 20 e 30%”.

2.20. Fármacos Antitumorais derivados de Plantas

A importância das plantas medicinais deve-se por sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas. No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (NOLDIN, *et al*, 2003).

Os fármacos permitem a identificação de novos alvos de ação farmacológica, tais como moléculas fundamentais na mitose celular (inibidores de microtúbulos) ou as implicadas na replicação do DNA (inibidores de topoisomerases) (BEIRA, 2000).

Há uma necessidade de identificar, avaliar e buscar novos e mais efetivos fármacos para o tratamento de vários tipos de câncer. A obtenção de fármacos para o tratamento de tumores malignos começa pela identificação de novos princípios ativos obtidos de diversas fontes (BEIRA, 2000).

A extração de produtos de plantas com supostas propriedades terapêuticas tem conduzindo a obtenção de numerosos compostos purifi bem definida. Estes fármacos podem classificar-se basicamente em dois tipos, os esteróides e os alcalóides, e mostram uma grande diversidade de atividades terapêuticas, analgésicas e antitumorais (BEIRA, 2000).

Quando algum dos extratos derivados de produtos naturais se mostra ativo frente a modelos tumorais experimentais adequados, se procede seu fracionamento e purificação até identificar o princípio ativo responsável pelo efeito e se necessário obter a melhorar sua ação e reduzir sua toxicidade (BEIRA, 2000).

2.21. Plantas utilizadas na medicina popular

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (NOLDIN *et al*, 2003).

A medicina popular de diferentes culturas tem proporcionado valiosas indicações de plantas com propriedades medicinais, utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades tais como resfriados, bronquites, úlceras, diarreias e tumores (BEIRA, 2000).

Os produtos naturais têm sido uma importante fonte benéfica clinicamente de componentes anticâncer. Existem, no mínimo, 250.000 espécies de plantas no mundo, sendo que mais de 1.000 plantas apresentam propriedades anticâncer significantes. Entretanto, pelo mundo inteiro tem sido uma tentativa para descobrir novos agentes anticâncer através de plantas (FERRAZ *et al*, 2005; MUKHERJEE *et al*, 2001).

2.21.1. Planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

Entre as plantas utilizadas na medicina popular, a *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn., conhecida popularmente no Brasil por “cancorosa”, “cancrosa”, “erva cancorosa”, “cancrosa”, “cancerosa” e “sombra de touro”, se aplica no tratamento de distintas enfermidades. A madeira branca, pesada, de 708Kg/m³ é de escassa aplicação. Já as folhas e os ramos são empregados na medicina caseira do Na forma de infusão a 5% é empregada contra resfriado e o cozimento (decoção) da casca a 5% tem efeito adstringente contra disenteria. O pó torrado das folhas é aplicado sobre úlceras crônicas, carcinomas e outros ferimentos infectados e, in empregado contra problemas estomacais e resfriado (BACKES & IRGANG, 2002; BEIRA, 2000; LORENZI & MATOS, 2002; SCHULTZ, 1990).

A *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. (Figuras 5 e 6) da família Santalaceae é nativa do Sul do Brasil, principalmente da mata de pinhais de SC e da Depressão Central do RS e também se encontra no Paraguai, Argentina, Bolívia e Uruguai. Atualmente, ela está em perigo de extinção, problema agravado pelo efeito de que a parte utilizada popularmente, as folhas, está muito comercializada, o que aumenta seu consumo indiscriminado (BEIRA, 2000; LORENZI & MATOS, 2002; NORVERTO, 2004; SOBOTTKA, 1992).



Figura 5. Espécie vegetal *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.
Ampliado: 600 x 403
Fonte: <www.science.siu.edu/.../images/Jodina.habit.JPG>.



Figura 6. Detalhes dos ramos da espécie *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.
Ampliado: 600 x 404
Fonte: <www.science.siu.edu/.../images/Jodina.flws1.JPG>.

❖ Aspectos Botânicos

A família Santalaceae compreende 37 gêneros e aproximadamente 450 espécies distribuídas nos trópicos e zonas temperadas, principalmente nos lugares secos (Figura 7). São árvores, arbustos ou subarbustos, com folhas alternas e simples. Podem ou não apresentar ramos e caule providos de espinhos. As flores podem ser de tamanho reduzido, dispostas em racemos ou em panículas. Perigônio monoclamídeo, corolínico, com tépalas de floração valvar e com tufo de pêlos, dispostos abaixo da inserção dos estames. Ovário ínfero, unilocular, com 1 ou 3 ovúlos centrais. Apresenta drupa carnosa, com mesocarpo adocicado e sementes com endosperma oleaginoso (BARROSO, 1991; NORVERTO, 2004).

A *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. é a única espécie de seu gênero conhecida até o momento. Foi classificada como pertencente à Divisão: Magnoliophyta, Classe: Magnoliopsida, Subclasse: Rosidae, Ordem: Santales, Família: Santalaceae, Gênero: *Jodina* e Espécie: *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn (BARROSO, 1991).

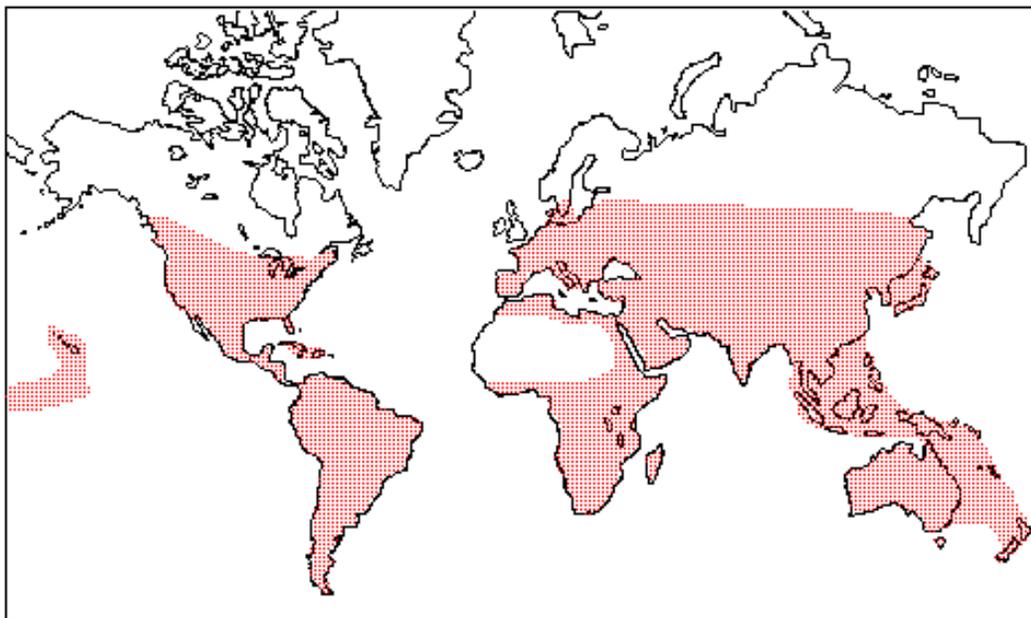


Figura 7. Distribuição Geográfica da Família Santalaceae.
Fonte: <<http://www.science.siu.edu/parasitic-plants/Santalaceae>>.

❖ Aspectos Morfológicos

Esta planta é uma arvoreta espinhenta de copa densa e muito ramificada, de 2-4cm de altura. Ela apresenta folhas simples, alternas, curto pecioladas, grossas e coriáceas, sem pêlos, de forma romboédricas com um espinho em cada um dos 3 ângulos. Suas inflorescências são aglomeradas e curtas nas axilas das folhas, com brácteas carnosas na base, as flores são hermafroditas,

pequenas e discretas, de cor rósea e o fruto, de cor amarelo-rosado, é uma cápsula drupácea, rugosa, dividida em 5 partes e cada uma contendo uma semente (BACKES & IRGANG, 2002; LORENZI & MATOS, 2002; SCHULTZ, 1990).

A reprodução desta planta é por sementes ou brotação de raízes e seu crescimento é lento. No Uruguai se encontra no Monte Serrano, onde cresce muito bem associada com outras árvores. Ela floresce no outono e frutifica na primavera. No inverno apresenta a copa coberta de folhas de cor verde brilhante, na primavera aparecem os frutos de cor roxa, no verão predomina a copa e a folhagem de cor verde lúcido e no outono as flores não se destacam muito, mas o seu perfume é muito (BACKES & IRGANG, 2002; MUÑOZ *et al*, 1993).

❖ Componentes Químicos

Os principais componentes químicos identificados nas folhas de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn., são: ácidos orgânicos, compostos fenólicos, al taninos, flavonóides, grupos amino, esteróides, gomas e mucilágenos (BEIRA, 2000).

Os flavonóides são componentes que têm sido bem investigados por suas propriedades anticâncer. Experimentos realizados em laboratórios tem mostrado que os ides inibem a proliferação e o crescimento da linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano (GUTHRIE *et al*, 1997).

Experimentos realizados comprovam a presença de ácido hidroxílico nas sementes da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn (HOPKINS *et al*, 1968).

Estudos evidenciam a presença de esteróides e/ou triterpenos em grande quantidade na planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn., sendo também encontrado, em menor proporção, alcalóides, cumarinas e saponinas em extrato etanólico (GLEYE, 1991).

❖ Aspectos Farmacológicos e Toxicológicos

Em ratas tratadas com extratos liofilizados de folhas e troncos desta planta, se observou uma inibição da formação de úlceras induzidas por *stress* (BEIRA, 2000).

Em estudos realizados com plantas na medicina popular Argentina para tratar diarreias, catarros e infecções do trato urinário, a *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. não mostrou atividade antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (BEIRA, 2000).

Estudos realizados com extratos aquosos da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. mostrou que estes extratos não apresentam atividade mutagênica frente a *Salmonella* (VARGAS *et al*, 1991).

A toxicidade subcrônica de extratos de folhas e troncos de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. foi avaliada em ratas tratadas com doses de 800mg/Kg destes extratos durante 30 dias consecutivos. O estudo dos órgãos dos animais tratados não indicou nenhuma alteração nos aspectos morfológicos nem dos tecidos. Esta planta também (BEIRA, 2000).

América do Sul, incluindo a Bacia Amazônica, a América Central, as Antilhas e a África Tropical (LORENZI, 1998; LORENZI & MATOS, 2002; NEVES *et al*, 2004).



Figura 8. Espécie vegetal *Carapa guianensis* Aubl.
Ampliado: 275 x 302
Fonte: <[www.rain-tree.com/ Plant Images/Carapa guianensis.jpg](http://www.rain-tree.com/Plant%20Images/Carapa_guianensis.jpg)>.

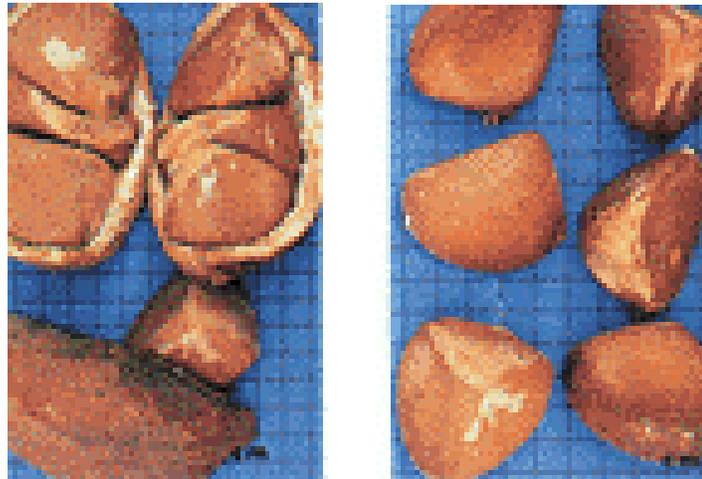


Figura 9. Detalhes das cascas e sementes da espécie *Carapa guianensis* Aubl.

Ampliado: 275 x 302

Fonte: <[www.rain-tree.com/ Plant Images/Carapa guianensis.jpg](http://www.rain-tree.com/Plant%20Images/Carapa_guianensis.jpg)>.

❖ Aspectos Botânicos

A família Meliaceae compreende cerca de 51 gêneros que abrangem aproximadamente 1.400 espécies pantropicais em grande parte, sendo poucas as subtropicais e de regiões temperadas. Na flora do Brasil estão representadas espécies *Melioideae* e *Swietenioideae* – a primeira subordinada os gêneros *Trichilia*, *Cabralea* e *Guarea*, e a segunda, *Cedrela*, *Swietenia* e *Carapa*. São árvores de grande porte, com folhas pinadas, bipinadas ou unifolioladas. As pinadas podem ser imparipinadas ou paripinadas, pela redução do folíolo terminal a uma cicatriz vestigial, como em *Cabralea*, *Cedrela* e *Carapa*. Quando os folíolos novos desenvolvem-se no ápice foliar, os folíolos velhos da porção basal da raque desarticulam-se e, por fim, a própria raque liberta-se da folha nova. A folha, nesses casos, tem comportamento e estruturas anatômicas semelhantes a um ramo. A inflorescência é um tirso ou uma panícula axilar, raramente terminal. As flores são geralmente pequenas, unidas numa panícula vistosa. As plantas podem ser andróginas, dióicas, monóicas ou polígamas. Apresentam frutos secos ou carnosos, deiscentes ou indeiscentes, podendo ser as sementes aladas ou não aladas (BARROSO, 1991; SCHULTZ, 1990).

A planta *Carapa guianensis* Aubl. foi classificada como pertencente à Divisão: Magnoliophyta, Classe: Magnoliopsida, Subclasse: Rosidae, Ordem: Sapindales, Família: Meliaceae, Gênero: *Carapa* e Espécie: *Carapa guianensis* Aubl (BARROSO, 1991).

❖ Aspectos Morfológicos

Esta planta é uma árvore grande, de até 30m de altura, de copa globosa densa e com tronco de 50-120cm de diâmetro. Folhas verde-escuras, compostas pinadas e alternas. Apresenta inflorescência em panículas axilares, com flores glabras, discretas, pequenas, perfumadas e de cor creme. Os frutos são cápsulas lenhosas, globoso-anguladas, deiscentes, contendo de 5 a 10 sementes com casca coriácea, polpa

branca, tenra, amarga e com 70% de um óleo espesso, de cor amarelo-escuro. A reprodução desta planta é por sementes, de fácil propagação e de crescimento rápido. Ela floresce de setembro a dezembro e frutifica de fevereiro a julho (LORENZI & MATOS, 2002; LOUREIRO & SILVA, 1968).

❖ Componentes Químicos

A identificação dos principais componentes do óleo da semente da andiroba é realizada através de técnicas espectroscópicas como UV-visível e por cromatografia gasosa e líquida (DAMASCENO *et al*, 2003).

Os componentes do óleo das sementes da andiroba são representados por estearinas, ácidos graxos oléicos e ácido mirístico, e em menor quantidade pelos ácidos (LORENZI & MATOS, 2002).

O extrato hexânico do óleo das sementes de andiroba revelou a presença de taninos (atividade antifúngica e antibacteriana), carboidratos, alcalóides e glicosídeos (MATTHIAS & JOHNS, 1993).

Estudos realizados mostram que nas folhas da *Carapa guianensis* Aubl. estão presentes os ésteres graxos saturados (ésteres de ácidos e álcoois de cadeias longas) que formam uma das principais classes na composição das ceras epicuticulares, na qual é composta principalmente por derivados do ácido palmítico e os terpenóides que constituem uma das mais diversificadas classes de compostos químicos caracterizadas em extratos vegetais e apresentam a mesma origem biossintética a partir do ácido (SIQUEIRA *et al*, 2003).

O extrato metanólico do óleo das sementes de andiroba extraído por cromatografia revelou a presença de limonóides, na qual são substâncias também conhecidas como meliacinas ou tetranortriterpenóides, apresentam atividades fagoinibitórias e propriedades inseticidas (CONNOLLY *et al*, 1966; OLLIS *et al*, 1970).

Experimentos realizados com flores de *Carapa guianensis* Aubl. que foram submetidas a hidrodestilação revelaram a presença bicyclogermacrene (23%) e germacrene B (14,3%) (ANDRADE *et al*, 2001).

Na literatura, existem alguns componentes ativos encontrados na andiroba como, carapinas e epoxiazadiradionas (ALBUQUERQUE, 1989).

❖ Aspectos Farmacológicos e Toxicológicos

Estudos mostraram que o tratamento oral com óleo de andiroba produziu efeito analgésico e inibiu a resposta inflamatória em camundongos e o extrato aquoso da casca de andiroba reduziu o número de contorções abdominais induzidas com ácido (MITSUGUI *et al*, 2002).

Uma variedade de limonóides apresentou uma atividade citotóxica em culturas “in vitro” de neuroblastoma (rato) e osteosarcoma humano (COHEN *et al*, 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Meio de Cultivo

❖ Meio RPMI 1640

O meio de cultivo celular RPMI 1640 foi utilizado para o cultivo “in vitro” das células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e para a realização dos ensaios biológicos de citotoxicidade dos extratos e frações da planta *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. e dos extratos da *Carapa guianensis* Aubl. com a linhagem celular MCF-7.

O meio RPMI 1640 comercial (frasco de 100mL, Cultilab) é líquido, estéril, de cor rosa forte e contém bicarbonato de sódio, glutamina e antibiótico.

Este meio foi conservado em alíquotas de 100mL a 4°C. Para sua utilização, as alíquotas foram distribuídas em volumes menores, segundo as necessidades do trabalho e para evitar uma possível conta

O meio foi suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) a 10% e foi colocado em banho-maria a 37°C.

3.1.2. Soro

❖ Soro Bovino Fetal (SBF)

O SBF foi utilizado como suplemento do meio de cultivo RPMI 1640, para o crescimento em monocamada da linhagem tumoral MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano e para a realização dos ensaios biológicos de citotoxicidade dos *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. e dos extratos da *Carapa guianensis* Aubl.

O soro bovino fetal comercial (frasco de 100mL, Cultilab) é líquido, estéril, de cor amarelo claro e contém albumina, globulina α 1 e 2, globulina β , glicose, uréia, creatina e lemo globulina. Segundo BARKER (2002) ele é indicado para cultivos celulares, com composição nutricional para os meios de cultivo em geral, fornecendo os fatores de crescimento e os nutrientes necessários.

O SBF foi conservado em alíquotas de 100mL a 20°C. Para sua utilização, as alíquotas foram descongeladas em banho-maria a 37°C e distribuídas em volumes menores, segundo as necessidades do trabalho e para evitar uma possível

3.1.3. Linhagem Celular

❖ Adenocarcinoma de Mama Humano (MCF-7)

Esta linhagem celular foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro/RJ. A linhagem MCF-7 prolifera em monocamada aderida à superfície do frasco de cultivo (25cm², poliestireno, Corning), formando pequenos grumos celulares. O cultivo foi mantido em estufa de cultura a temperatura de 37°C, em meio RPMI 1640 suplementado com SBF a 10%.

A linhagem foi mantida mediante a transferência do cultivo de duas a três vezes por semana.

3.1.4. Soluções

❖ Solução Tampão de Fosfato (PBS)

Foi utilizada como meio de lavagem no cultivo de células que crescem em monocamada em cultivo “in vitro”. Esta solução é livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, contém NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ e água MilliQ e o pH desta solução foi ajustado em 7,4. A solução foi esterilizada em autoclave e conservada a 4°C.

❖ Solução de Tripsina – EDTA

A solução tripsina – EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético) foi utilizada para permitir o deslocamento das células dos frascos de cultivo e/ou desagregação de grumos celulares, através da sua propriedade proteolítica sobre as proteínas intercelulares.

Esta solução contém PBS, Tripsina (Imlab) e EDTA (Synth). O pH foi ajustado em 7,2, a esterilização foi realizada por filtração com membranas de 0,45µm de diâmetro (Millipore) e a conservação das alíquotas foi a 20°C. Somente a alíquota de uso no trabalho é conservada a 4°C.

❖ Solução de Sulforodamina B (SRB)

A solução a 0,4% p/v de sulforodamina B (Sigma), utilizada para a determinação colorimétrica da citotoxicidade “in vitro”, foi preparada dissolvendo SRB em ácido acético a 1%. A solução deve ser preparada no momento de sua utilização.

❖ Solução Tampão Tris base

Para preparar a solução a 10mM, foi dissolvido 1,21g de Tris base comercial (Vetec) em 1 litro de água MilliQ. O pH foi ajustado a 10,5 com NaOH. Esta solução foi utilizada para resolubilizar a solução de SRB e foi conservada em temperatura ambiente, sem luz e calor.

- ❖ Ácido Tricloroacético 50% (p/v) TCA

Para preparar esta solução, foi pesado 50g de ácido tricloroacético comercial (Vetec) e foi dissolvido em 100mL de água MilliQ. Esta solução foi utilizada para romper as células e fixar as proteínas celulares.

- ❖ Ácido Acético 1%

Para preparar esta solução, foi dissolvido 10mL de ácido acético comercial (Synth) em 990mL de água MilliQ. Esta solução foi utilizada para remover o excesso da solução de SRB e foi conservada em temperatura ambiente, sem luz e calor.

- ❖ Corante Azul de Trypan 0,4%

Esta solução foi preparada utilizando NaCl 0,81%, K_2HPO_4 0,06% e azul de trypan comercial (Carlo Erba). Estas substâncias foram dissolvidas em 100mL de água MilliQ, foram filtradas com membranas de 28 μ m de diâmetro (Prolab) e a conservação das alíquotas foi a 4°C. Este corante foi utilizado para corar as células mortas, diferenciando-as das células vivas, para possível contagem da viabilidade celular em

3.1.5. Equipamentos

- ❖ Capela de fluxo laminar
- ❖ Incubador
- ❖ Autoclave
- ❖ Microscópio invertido
- ❖ Banho-maria
- ❖ Centrífuga refrigerada
- ❖ Bomba de aspiração
- ❖ Refrigerador
- ❖ Estufa de secagem
- ❖ Equipamento de filtração
- ❖ Lavador de pipetas automático
- ❖ Destilador

3.1.6. Materiais Vegetais

- ❖ Planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

O material utilizado no estudo foi as folhas da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. A coleta da planta foi realizada no município de Pelotas, RS, Brasil, no mês de novembro de 2004. A planta foi levada para o Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pelotas, UFPel onde foi colocada sobre uma bancada limpa para secar a temperatura ambiente durante dois meses. Após o tempo de secagem, a planta já seca foi fragmentada separando-se as folhas dos trocos. Foram feitos envelopes de papel pardo para colocar os distintos materiais, os quais

foram identificados. As folhas secas foram pulverizadas em moinho (Fritsch) de malha 0,5mm, em 10 rpm e o pó obtido foi enviado ao Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de Pelotas, para ser realizada a preparação dos extratos e

❖ Planta *Carapa guianensis* Aubl.

O material utilizado no estudo foi o óleo das sementes da planta *Carapa guianensis* Aubl. Os extratos obtidos deste óleo foram preparados e fornecidos pelo Laboratório de Oleoquímica do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de Pelotas – UFPel.

3.1.7. Extratos e Frações

❖ Planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

Para serem aplicados nos cultivos celulares, os extratos e frações foram diluídos em água para injeção estéril apirogênica (Basa) ou Dimetilsulfóxido-DMSO (Vetec) e foram esterilizados por filtração com membranas de 0,45µm de diâmetro (Millipore).

❖ Planta *Carapa guianensis* Aubl.

Para serem aplicados nos cultivos celulares, os extratos foram diluídos em água para injeção estéril apirogênica (Basa) ou Dimetilsulfóxido-DMSO (Vetec) e foram esterilizados em UV por 15 minutos.

EDTA. As células foram incubadas por 7 minutos a temperatura ambiente e por 1 minuto na incubadora a 37°C. Passado o tempo, foi acrescentado 5mL de meio de cultivo suplementado com 10% de SBF, para neutralizar o efeito da enzima. Estes 6mL presentes na garrafa foram colocados em um tubo falcon, para serem centrifugados a 1500 rpm, por 10 minutos. Após foi descartado o sobrenadante

do falcon e foi acrescentado 5mL de meio de cultivo suplementado com 10% de SBF sobre o pellet. Retirou-se 1mL desta solução celular e colocou em um eppendorf. Em um outro eppendorf, foi colocado 10 μ l desta suspensão e 10 μ l de Corante Azul de Trypan 0,4%, totalizando 20 μ l. Estes 20 μ l foram colocados em uma câmara de Neubauer, levada ao microscópio invertido (Quimis) para ser realizada a contagem da viabilidade celular, segundo FRESHNEY (2000). Foram contados cinco quadrantes da câmara. A seguinte fórmula foi utilizada:

$$NC = NCV \times 2 \times 5 \times 20 \times 10^4$$

NC – número de células presentes na garrafa de cultivo

NCV – número de células vivas contadas em 5 quadrantes

2 – diluição do corante

5 – quadrantes contados

20 – diluição

10⁴ – conversão para 1mL.

3.2.3. Preparação dos Extratos e Frações

- ❖ Preparação dos extratos da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

Como mostra o esquema de extração na figura 10, baseado em BEIRA (2000), os extratos foram preparados por decocção de 30g de folhas secas e moídas da planta, durante 25 minutos em 900mL água destilada. Transcorrido este tempo, o filtrado foi seco em liofilizador, originando o Extrato Aquoso (JRA). Na planta residual I foi adicionado 300mL de MeOH 80% e macerou-se 3 vezes por 12 horas, originando os filtrados (JRM1, JRM2 e JRM3). Estes foram reunidos e secos primeiramente em evaporador rotatório para eliminar a metanol e após em liofilizador. O precipitado assim obtido foi o Extrato Metanólico denominado (JRM). A planta residual II foi macerada com 300mL de clorofórmio durante 48 horas e o filtrado foi seco por evaporador rotatório e em liofilizador, originando o Extrato Clorofórmico denominado (JRC).

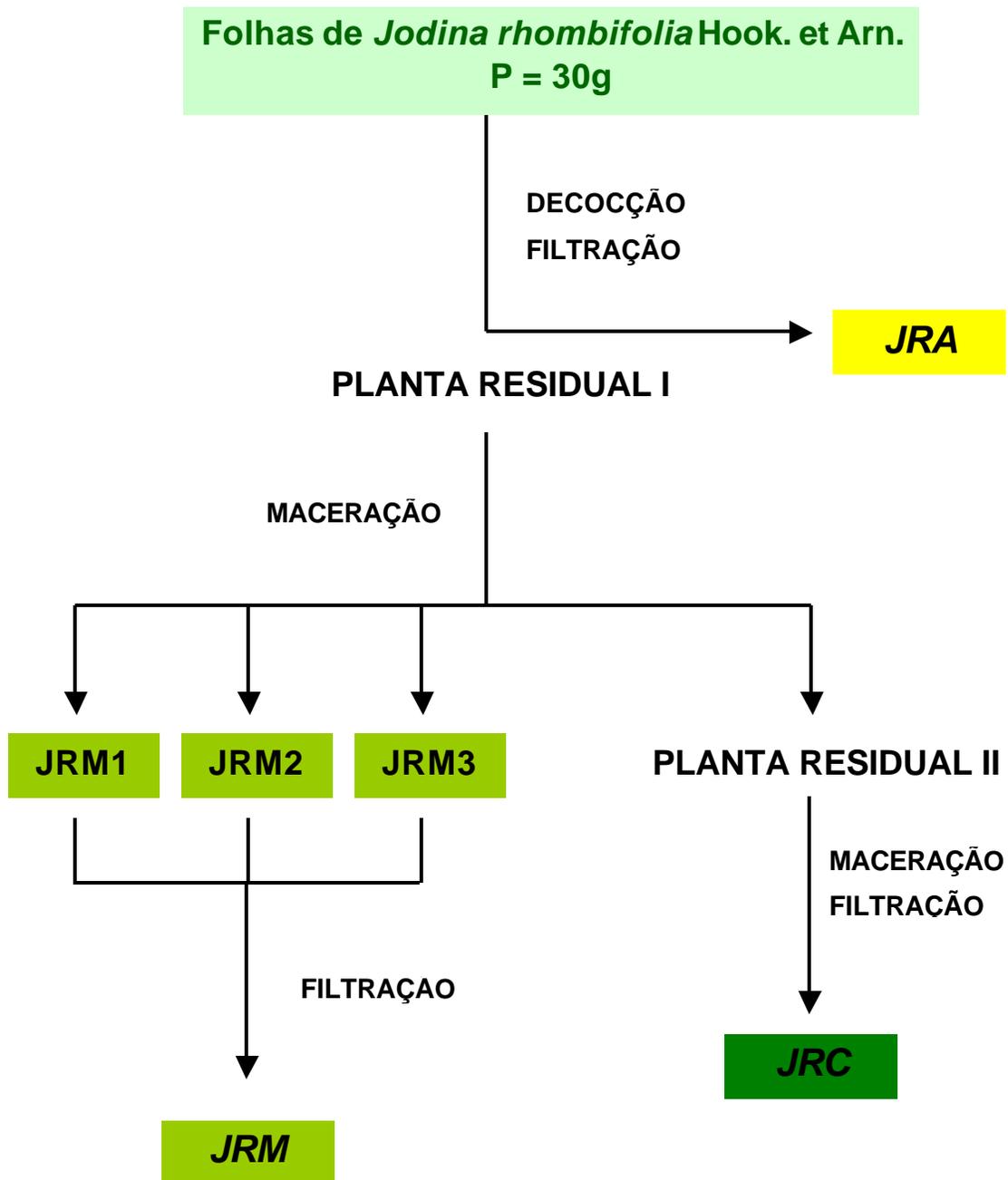


Figura 10. Esquema de preparação dos extratos aquoso, metanólico e clorofórmico

- ❖ Preparação das frações da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

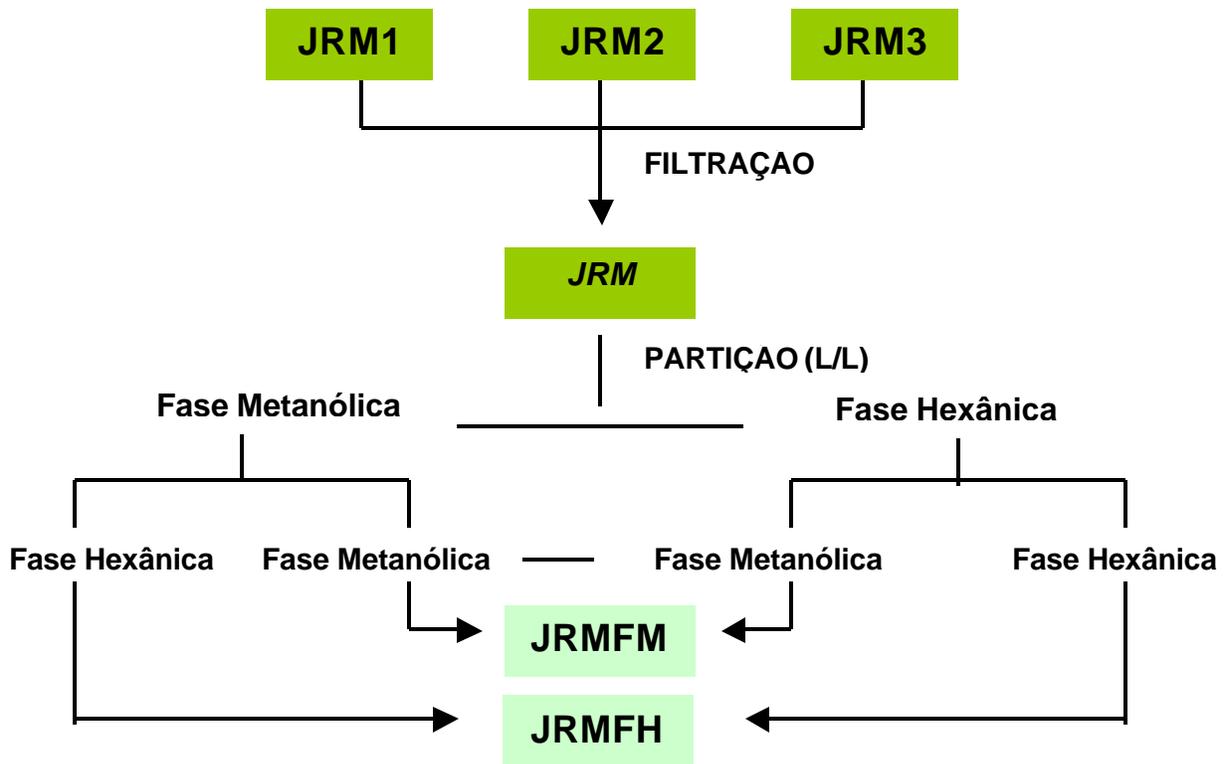


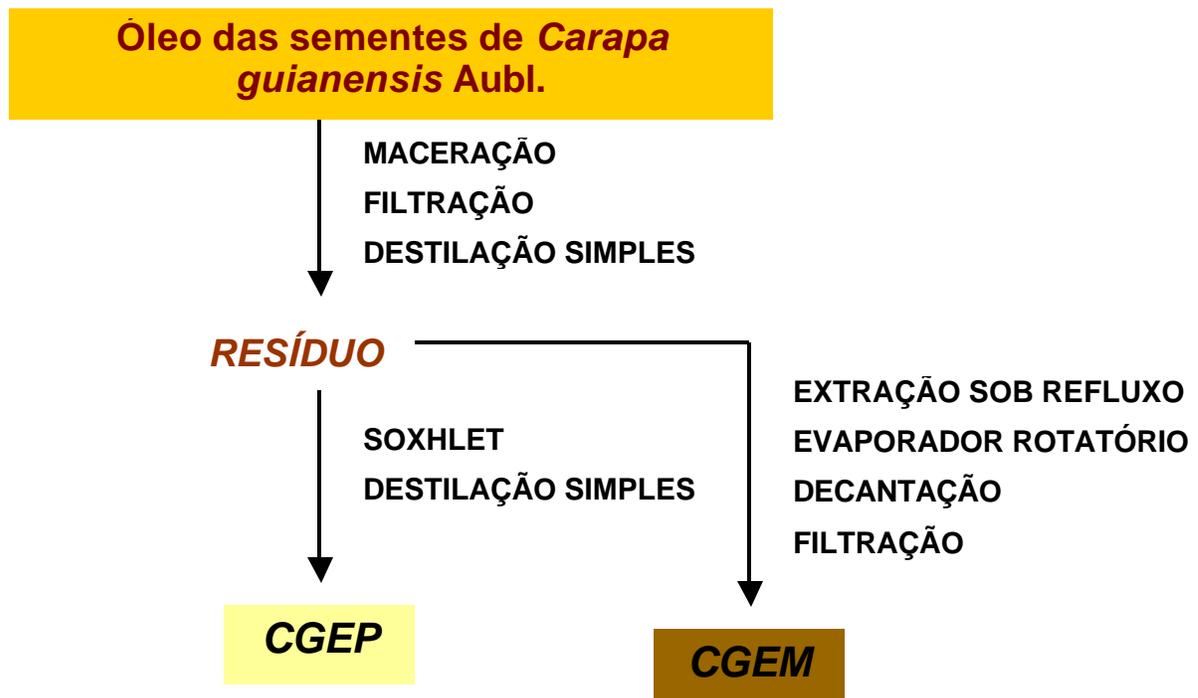
Figura 11. Esquema de fracionamento do extrato metanólico (JRM)

❖ Preparação dos extratos da planta *Carapa guianensis* Aubl.

Conforme mencionado no item 3.1.6, os extratos obtidos do óleo das sementes desta planta foram preparados, segundo OLLIS (1970) e fornecidos pelo Laboratório de Oleoquímica do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de Pelotas – UFPel.

Como mostra o esquema de extração na figura 12, as amostras foram moídas no liquidificador e após foram submetidas à maceração por 2 dias em éter de petróleo e feita a filtração a vácuo e o extrato obtido foi concentrado por destilação simples, obtendo-se assim o óleo. Após esta etapa de maceração, as amostras foram submetidas à extração no Soxhlet com éter de petróleo, para remover as gorduras residuais. Para isso, cerca de 120g de andiroba foram submetidas a extrações sucessivas de 4 horas (5X) e os extratos concentrados, usando destilação simples. Desta forma foi obtido o Extrato de Éter de Petróleo (CGEP).

Algumas amostras retiradas dos extratores de Soxhlet foram secas, pesadas e submetidas à extração com solvente metanol sob refluxo por 4 horas (5X). O solvente foi concentrado no evaporador rotatório e o resíduo concentrado a temperatura ambiente. Por decantação foi obtido um precipitado, que foi recuperado a vácuo e, após seco, resultou em um pó levemente amarelado. O extrato resultante que teve um aspecto oleoso escuro foi denominado de óleo-resina. Este, após um período de cerca de 3 dias, formou uma película que após se precipitou, formando uma massa sólida compacta, resultando no Extrato Metanólico (CGEM).



UFPel)

3.2.4. Avaliação da Atividade Citotóxica dos Extratos e Frações em cultivos celulares

❖ Preparação dos extratos e frações da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

De cada um dos extratos e frações a utilizar foi preparado soluções em água para injeção estéril apirogênica (Basa) ou Dimetilsulfóxido-DMSO (Vetec) cuja concentração foi a máxima alcançada segundo a solubilidade do produto. Após a esterilização por filtração, utilizando filtros de membrana adequados a cada solvente e com 0,45µm de diâmetro (Millipore), foram preparadas em condições de esterilidade, as diluições adequadas com o solvente correspondente. Segundo ITHARAT (2004) o extrato aquoso (JRA) foi diluindo com água para injeção estéril apirogênica e o extrato metanólico (JRM) e o clorofórmio (JRC) foram diluídos em Dimetilsulfóxido-DMSO. Já as frações metanólica (JRMFM) e hexânica (JRMFH) foram diluídas ambas em -DMSO.

Foi observada a concentração final de DMSO nos meios de cultivos, que não deve superar a 0,05% (v/v), concentração que previamente se havia comprovado não modificar nem a viabilidade nem a proliferação celular. As soluções foram conservadas a -20°C até o momento de sua utilização.

❖ Preparação dos extratos da planta *Carapa guianensis* Aubl.

De cada um dos extratos a utilizar foi preparado soluções em água para injeção estéril apirogênica (Basa) ou Dimetilsulfóxido-DMSO (Vetec) cuja concentração foi a máxima alcançada segundo a solubilidade do produto. Após a esterilização em UV por 15 minutos, foi preparado em condições de esterilidade, as diluições adequadas com o solvente correspondente. O Extrato Metanólico (CGEM) foi diluído com água para estéril apirogênica e o Extrato de Éter de Petróleo (CGEP) foi diluído em -DMSO.

Foi observada a concentração final de DMSO nos meios de cultivos, que não deve superar a 0,05% (v/v), concentração que previamente se havia comprovado não modificar nem a viabilidade nem a proliferação celular. As soluções foram conservadas a -20°C até o momento de sua utilização.

3.2.5. Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos e Frações de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. e extratos de *Carapa guianensis* Aubl. em cultivos de monocamada

A ação citotóxica e/ou inibidora da proliferação celular exercida pelos extratos e/ou frações purificadas das plantas, foi avaliada sobre a linhagem celular derivada de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).

Este estudo foi realizado mediante cultivos celulares em monocamada que se mantiveram durante 48 horas na presença de concentrações crescentes dos produtos. Transcorrido este tempo, a quantidade de proteína presente nos cultivos foi determinada mediante uma técnica colorimétrica, por coloração das proteínas celulares com sulforodamina B (SRB) que se fixa nos aminoácidos básicos das macromoléculas.

Os cultivos em crescimento exponencial da linhagem celular foram tripsinizados e se preparou suspensões celulares em meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, de forma que contivesse o número de células necessárias para manter o crescimento exponencial, nos cultivos controles, durante as 48 horas previstas de duração do experimento. O número de células foi calculado em função do tempo de

duplicação de cada linhagem celular. Nestas condições experimentais foi necessário cultivar $1-2 \times 10^4$ células/cavidade para a linhagem MCF-7, para manter o crescimento exponencial no tempo estabelecido.

As células foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo plano, suspendidas em 198 μ l de meio de cultivo com 10% de SBF e foram incubadas durante 24 horas a 37°C, para permitir a aderência das células à superfície da placa de cultivo. O tempo de aderência pode variar segundo a linhagem celular.

Passado este tempo, foi adicionado aos cultivos concentrações crescentes do μ l. Foram realizadas de 3 a 5 réplicas para cada concentração de produto (T) e cultivos controles paralelos que continham excipiente do produto (C). Também foram preparadas réplicas das cavidades sem células (brancos), que continham 198 μ l de meio de cultivo e 2 μ l das concentrações do produto.

Em todos os casos e da mesma suspensão celular, foram distribuídas em uma placa separada, distintas cavidades que serviram para medir, uma vez corada, a densidade óptica correspondente ao número de células de partida (T_0), ou seja, as células aderidas na placa após 24 horas de incubação. Esta placa chamada de placa ao tempo zero contém também várias réplicas de cavidades com 200 μ l de meio de cultivo que serviram de reativo branco para os valores de T_0 .

Após a incubação do cultivo no tempo desejado para o teste de citotoxicidade, a RUBINSTEIN (1990) e SKEHAN (1990), as células foram fixadas mediante a adição de 50 μ l de TCA frio (50% p/v) sobre os 200 μ l de cultivo de cada cavidade (concentração final de TCA na cavidade 10%) e incubadas a 4°C durante 60 minutos. Seguidamente, foi descartado o sobrenadante e foram realizadas 5 lavagens com água MilliQ. Uma vez seca a placa, pode-se conservar tampada a 4°C até o momento da coloração. A placa ao tempo zero que continha os cultivos T_0 foi fixada com TCA 50% após as 24 horas de cultivo, e é neste tempo em que adicionou o produto nas placas problema. Uma vez secas, foram conservadas a 4°C até o momento

Segundo RUBINSTEIN (1990) e SKEHAN (1990), a coloração colorimétrica foi realizada mediante a adição de 100 μ l de uma solução de SRB (0,4 p/v em ácido acético a 1%) em cada cavidade dos controles e dos testes. As placas foram incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente e foi eliminada a solução não fixada mediante 5 lavagens com ácido acético a 1%. O sobrenadante de cada lavagem foi eliminado mediante a inversão brusca das placas e uma vez vazias, foram deixadas secar em temperatura ambiente. Seguidamente foi resolubilizado o corante fixado nas proteínas celulares com 100 μ l de tampão Tris e as placas foram incubadas em um agitador de placas a 50 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Segundo ITHARAT (2004) a leitura da densidade óptica foi procedida de cada cavidade em um espectrofotômetro adequado para a leitura de placas de cultivo, na qual foi realizada a 492 nm.

Cálculo dos parâmetros de citotoxicidade:

Foram calculadas as médias dos testes, dos controles e da placa ao tempo zero das distintas réplicas realizadas em cada condição experimental. Desta forma, foram obtidos 3 valores para cada caso:

- * T_0 , refere-se à densidade óptica correspondente ao número de células em cultivo a tempo zero.
- * C , refere-se à densidade óptica correspondente aos cultivos controle que cresceram na presença do excipiente, mas sem o produto.
- * T , refere-se à densidade óptica correspondente às cavidades que con tinham as distintas concentrações dos produtos cuja ação se queria avaliar neste experimento.

Segundo MONKS (1991), a medida da viabilidade e sobrevivência celular após o cultivo na presença dos produtos a avaliar foi expressa como %T/C [(densidade óptica de células tratadas)/(densidade óptica do controle celular) x 100]. Utilizando estas medidas, a resposta celular foi calculada nos términos de: estimulação do crescimento, ausência do efeito do produto, inibição do crescimento e morte celular.

Se $T \geq T_0$, os resultados foram calculados segundo a seguinte fórmula:

$$[(T-T_0)/(C-T_0)] \times 100$$

Se $T < T_0$, o qual significa que o produto causa morte celular, os resultados foram calculados com a fórmula:

$$[(T-T_0)/T_0] \times 100$$

Desta forma, foram originadas curvas doses/resposta para cada produto e a partir delas foram calculados 3 níveis de efeito:

- * CI_{50} , concentração do produto inibitória capaz de reduzir 50% o crescimento celular nos cultivos controle durante o período de incubação com o fármaco.
- * CIT, concentração do produto que causa uma inibição total do crescimento celular, quando a quantidade de proteína presente na cavidade ao final do tempo de incubação foi igual a presente no tempo de adição do produto.
- * CL_{50} , concentração do produto que causa 50% de redução da quantidade de proteína medida a tempo zero. Este valor indica que se tem reduzido o número de células presentes nas cavidades correspondentes.

Quando os valores calculados do efeito não alcançarem ou excederem os níveis correspondentes ao efeito produzido devem ser expressas com maior ou menor que a concentração máxima ou mínima ensaiada.

3.2.6. Análise Estatística

Os resultados obtidos através da leitura do espectrofotômetro foram calculados e analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism 4.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da atividade citotóxica dos extratos aquoso, metanólico e clorofórmico de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. sobre a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano

Os extratos testados foram obtidos segundo metodologia descrita no item 3.2.3. e a atividade citotóxica e/ou inibidora da proliferação celular exercida pelos extratos, foi determinada mediante ensaio colorimétrico com SRB e cultivos em monocamada da linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano, descrita no item 3.2.5. Desta forma, foram construídas curvas doses/resposta para cada produto e a partir delas foram calculados três níveis de efeito: A concentração inibitória 50 (C_{50}), a concentração inibitória total (CIT) e a concentração letal 50 (CL_{50}).

❖ Atividade citotóxica do extrato aquoso sobre a linhagem MCF-7

Na figura 13, foi representado o efeito de concentrações crescentes do extrato aquoso (0,006 mg/mL; 0,015 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,15 mg/mL e 0,6 mg/mL) sobre a proliferação da linhagem MCF-7, expressada como porcentagem de crescimento respectivo aos cultivos controles crescidos na ausência do extrato e presença de DMSO. Como pode ser observado, o extrato aquoso apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem estudada, com uma inibição de 75% do crescimento celular, comparado ao controle.

Segundo BEIRA (2000) este extrato não apresentou atividade antiproliferativa sobre as linhagens Bx-PC3, PANC-1, HT-29 e 3T3, não sendo possível calcular a C_{50} . No entanto, como se observa nesta figura, este extrato apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem MCF-7, sendo a C_{50} igual a 0.030 mg/mL.

É possível que a diferença obtida nos resultados seja atribuída a metodologia de preparação do extrato, pois neste trabalho se utilizou maior quantidade de planta e maior volume do solvente, resultando em maior extração do(s) composto(s) ativo(s).

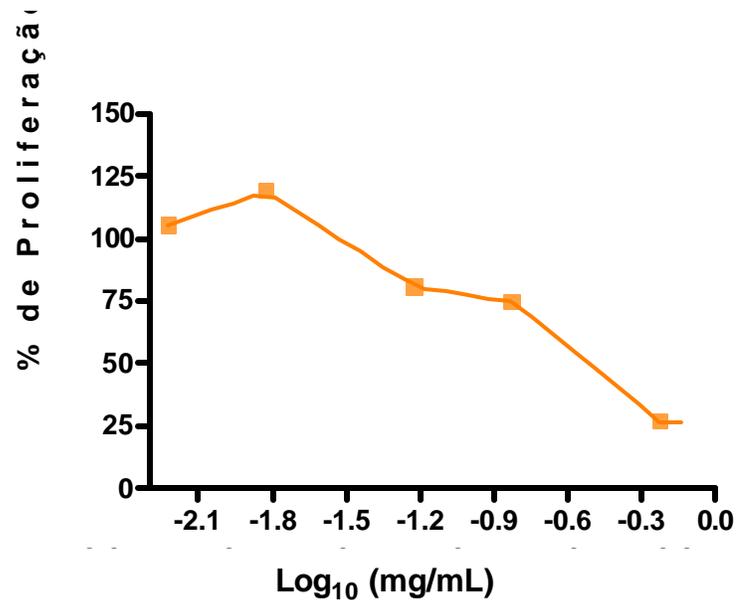


Figura 13. Atividade do extrato aquoso (JRA) sobre a linhagem MCF-7

❖ Atividade citotóxica do extrato metanólico sobre a linhagem MCF-7

O extrato metanólico apresentou atividade antiproliferativa e citotóxica sobre a linhagem celular MCF-7, causando morte celular, conforme ilustrado na figura 14.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos de BEIRA (2000), sendo os valores da CI_{50} , CIT e CL_{50} destacados na tabela 3.

Os resultados sugerem que este extrato apresenta a mesma concentração do(s) composto(s) ativo(s).

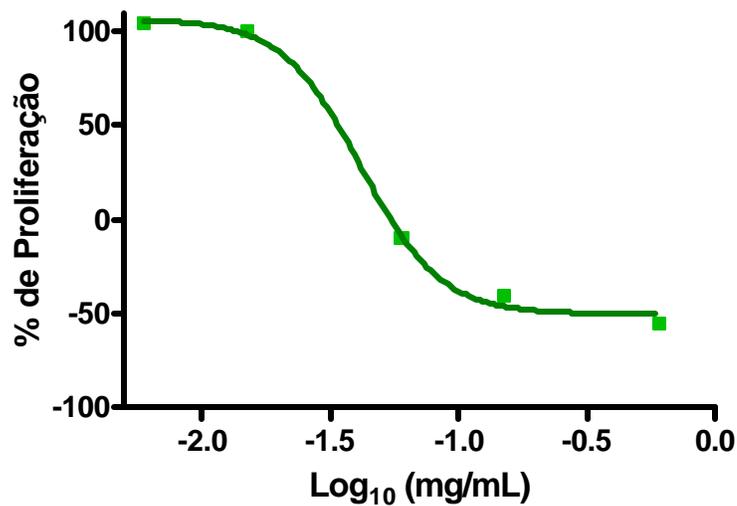


Figura 14. Atividade do extrato metanólico (JRM) sobre a linhagem MCF-7

Tabela 3. Parâmetros de citotoxicidade do extrato metanólico (JRM) em MCF-7

Parâmetros (mg/mL)	BEIRA, 2000	LIMA, 2005
C ₅₀	0.059	0.034
CIT	0.080	0.054
CL ₅₀	0.179	0.030

A figura 15 são fotos realizadas com máquina digital (Sony) em microscópio invertido (Quimis) de cultivos de células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, controle e expostas, durante 48 horas nas concentrações do extrato metanólico (JRM) de 0,006 mg/mL; 0,015 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,15 mg/mL e 0,6 mg/mL. Nesta figura se observa a inibição do crescimento com a concentração 0,15 mg/mL e morte celular com

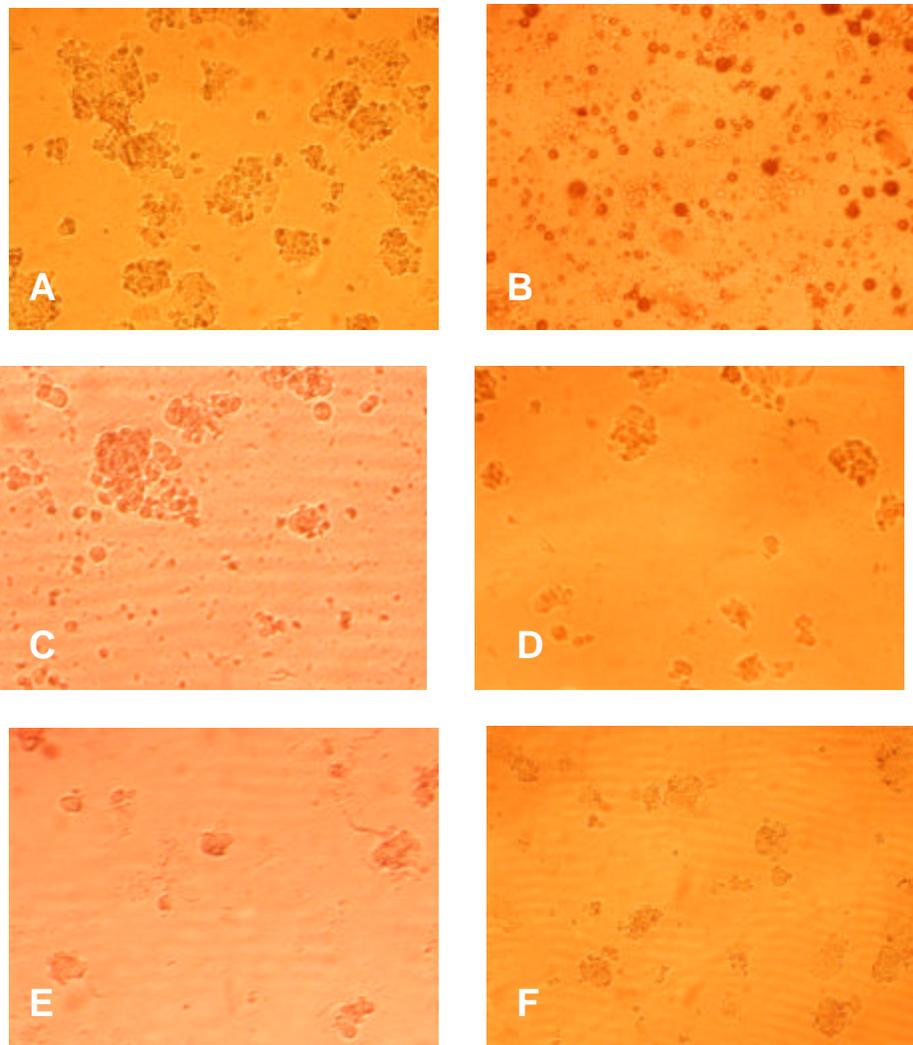


Figura 15. Fotos de células da linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, expostas durante 48 horas nas seguintes concentrações do extrato metanólico JRM: A) controle B) 0,6 mg/mL C) 0,15 mg/mL D) 0,06 mg/mL E) 0,015 mg/mL e F) 0,006 mg/mL.

❖ Atividade citotóxica do extrato clorofórmico sobre a linhagem MCF-7

No gráfico ilustrado na figura 16, foi representado o efeito de concentrações crescentes do JRC (0,0015 mg/mL; 0,006 mg/mL; 0,015 mg/mL; 0,06 mg/mL e 0,15 mg/mL), na qual foi possível verificar a inibição da proliferação celular comparado ao controle, sendo a CI_{50} igual a 0.021 mg/mL.

Não é possível comparar os resultado com o trabalho anteriormente realizado, pois BEIRA (2000) testou este extrato sobre a linhagem Bx-PC3, e demonstrou que o mesmo inibiu a proliferação e causou morte celular sobre esta linhagem.

Com respeito ao extrato clorofórmico, neste estudo, foi verificado que não houve morte celular, o que pode representar que este extrato atua de maneira diferente nas diferentes linhagens celulares, pois Bx-PC3 é uma linhagem de adenocarcinoma de -7 de adenocarcinoma de mama, indicando que este extrato talvez seja mais ativo em determinados tipos celulares do que outros.

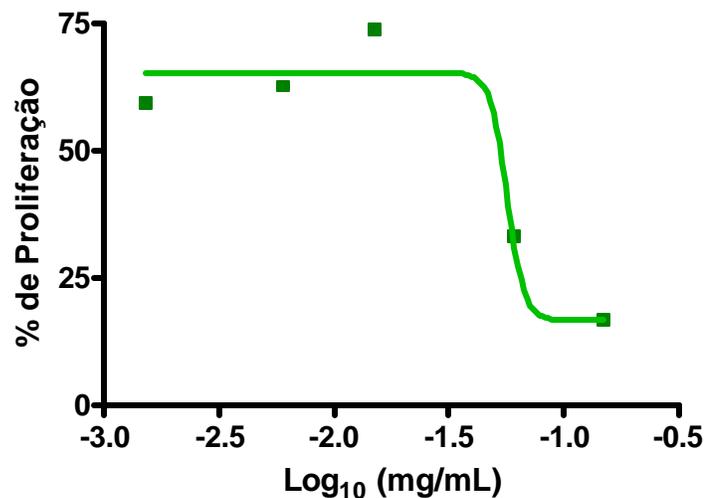


Figura 16. Atividade do extrato clorofórmico (JRC) sobre a linhagem MCF-7

4.2. Estudo da atividade citotóxica das frações metanólica e hexânica de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. sobre a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano

As frações citadas foram obtidas seguindo a metodologia citada no item 3.2.3, assim como a atividade citotóxica e/ou inibidora da proliferação celular foram estudadas utilizando a mesma metodologia referidas para os extratos estudados anteriormente.

❖ Atividade citotóxica da fração metanólica sobre a linhagem MCF-7

Na figura 17, foi demonstrado os efeitos das concentrações crescentes da fração metanólica (0,002 mg/mL; 0,006 mg/mL; 0,012 mg/mL; 0,040 mg/mL e 0,105 mg/mL) sobre a proliferação da linhagem MCF-7. Como pode ser verificado, não houve crescimento celular desta linhagem, não tendo como avaliar a atividade desta fração.

Este resultado pode ter sido gerado pela utilização da marca industrial da placa de cultivo, que deve possuir algum tratamento tóxico, pois o crescimento em garrafas é adequado e nestas placas foi inferior ao esperado. Também foi testada outra marca de placa que possibilitou um crescimento celular adequado.

No experimento desenvolvido em Barcelona por BEIRA (2000) foi identificada atividade antiproliferativa e morte celular, com os valores para CI_{50} , CIT e CL_{50} iguais a 0.530 mg/mL, 1.378 mg/mL e 2.151 mg/mL, respectivamente.

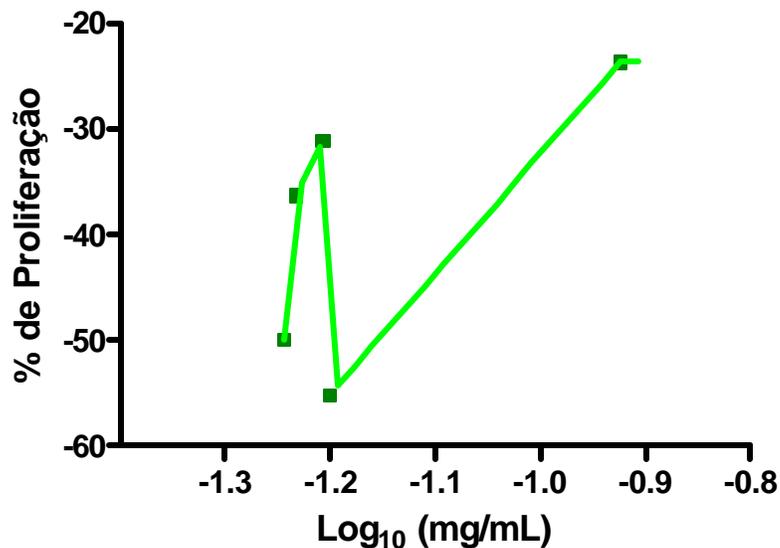


Figura 17. Atividade da fração metanólica (JRMFM) sobre a linhagem MCF-7

❖ Atividade citotóxica da fração hexânica sobre a linhagem MCF-7

A atividade da fração hexânica foi avaliada na presença de concentrações crescentes (0,002 mg/mL; 0,006 mg/mL; 0,012 mg/mL; 0,040 mg/mL e 0,105 mg/mL) sobre a linhagem de estudo. A figura 18 mostra que esta fração apresentou resultados irregulares sobre o crescimento celular, sendo este resultado completamente diferente de BEIRA (2000).

Não foi possível comparar os resultados destes testes, pois são necessários novos experimentos para uma avaliação desta fração.

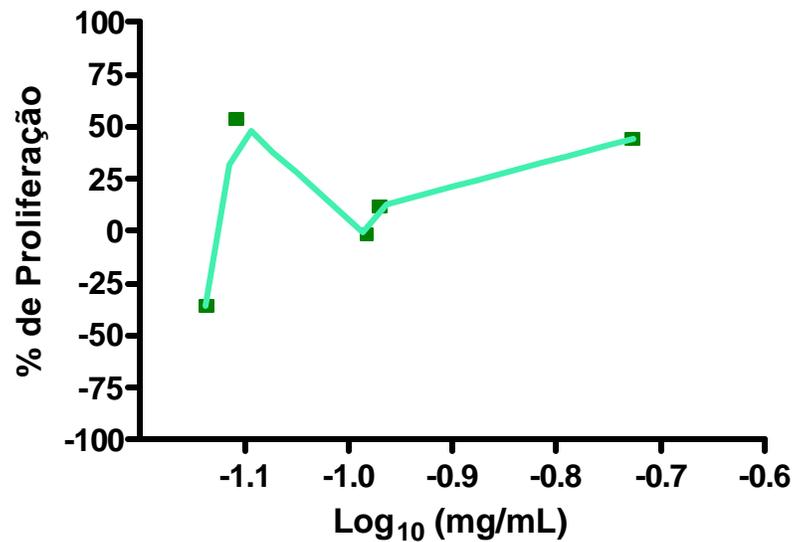


Figura 18. Atividade da fração hexânica (JRMFH) sobre a linhagem MCF-7

4.3. Estudo da atividade citotóxica dos extratos de éter de petróleo e metanólico de *Carapa guianensis* Aubl. sobre a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano

Da mesma forma que os extratos e frações de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. foram testados extratos da *Carapa guianensis* Aubl. sobre a linhagem MCF-7, na qual as células foram cultivadas sob as mesmas condições e os testes de citotoxicidade realizados com o mesmo ensaio colorimétrico.

❖ Atividade citotóxica do extrato de éter de petróleo sobre a linhagem MCF-7

A atividade do extrato de éter de petróleo foi avaliada na presença de concentrações crescentes deste extrato (0,006 mg/mL; 0,015 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,15 mg/mL e 0,6 mg/mL). Como pode observar-se, na figura 19, houve inibição da proliferação, mas este extrato não provocou morte celular e as concentrações mais baixas aumentaram a proliferação celular, comparado ao controle.

Futuramente, serão realizados experimentos modificando a faixa de concentrações, pois foi observado um aumento da proliferação nas concentrações 0,006 mg/mL; 0,015 mg/mL e a 0,06 mg/mL e estas não serão mais avaliadas. Então, ações mais altas como 2,0 mg/mL; 1,0 mg/mL; 0,6 mg/mL e 0,15 mg/mL.

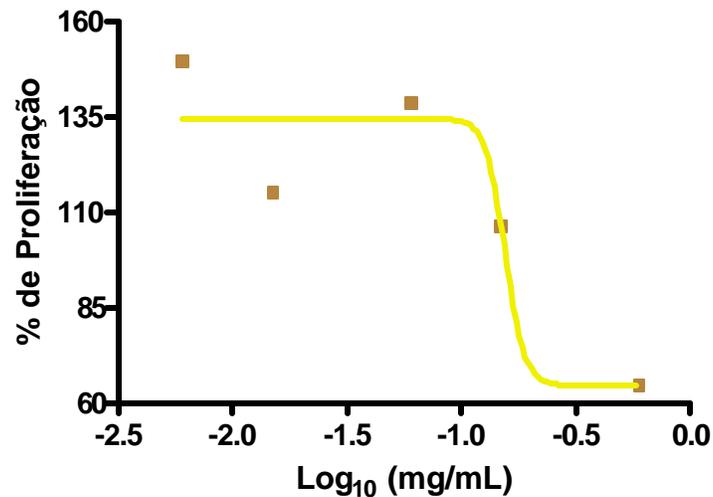


Figura 19. Atividade do extrato de éter de petróleo (CGEP) sobre a linhagem MCF-7

❖ Atividade citotóxica do extrato metanólico sobre a linhagem MCF-7

Na figura 20, foi representado o efeito de concentrações crescentes do extrato metanólico (0,006 mg/mL; 0,015 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,15 mg/mL e 0,6 mg/mL) sobre a proliferação da linhagem MCF-7.

Verificou-se que este extrato promoveu a proliferação celular contrariando o esperado. Desta forma, este extrato está descartado para futuros testes, pois aumenta o celular da linhagem MCF-7.

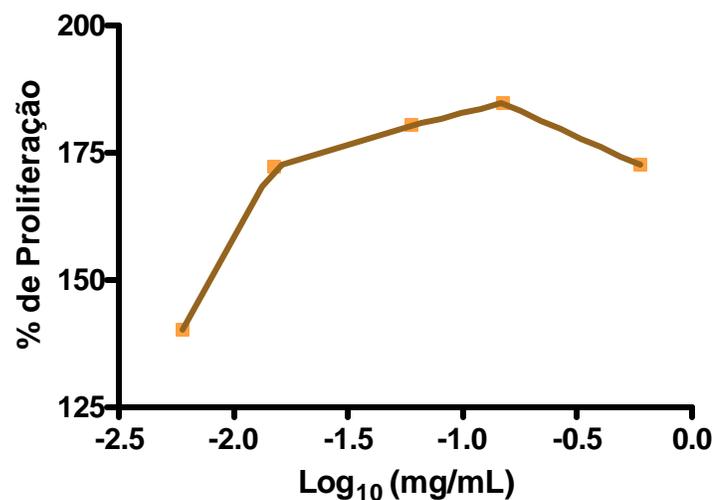


Figura 20. Atividade do extrato metanólico (CGEM) sobre a linhagem MCF-7

Quanto aos extratos de *Carapa guianensis* Aubl.:

- O extrato metanólico não inibiu a proliferação celular, mas sim aumentou o crescimento;
- O extrato de éter de petróleo apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem celular sendo mais efetivo que o metanólico.

Foi possível realizar as técnicas de cultivo no Laboratório de Cultivo Celular, como proliferação celular, contagem de viabilidade celular, congelamento, descongelamento e citotoxicidade, com êxito em todas as técnicas desenvolvidas.

É necessário adquirir equipamentos como estufa de CO₂ e espectrofotômetro para a realização dos experimentos, pois no momento são desenvolvidos em outros laboratórios o que dificulta o controle de condições dos mesmos.

Desta forma, sugere-se a continuação do processo de purificação dos extratos das duas plantas já que foi comprovado o potencial antiproliferativo “ ” nos experimentos.

Com isso, o valor dos produtos naturais e seus componentes derivados são de dicina, já que os extratos estudados nesta pesquisa revelaram atividades muito eficientes frente a células de adenocarcinoma de mama.

6. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1997. p. 1256–1257.

ALBUQUERQUE, J. M. **Plantas Medicinais de Uso Popular**. Brasília: Editora MEC, 1989.

ALCÂNTARA, L. (PSDB-CE). **Alimento Funcional**. Senado Federal, 03 de novembro de 1998. Disponível em: <http://www.polymar.com.br/noticias/n_lucio.php>. Acesso em: 25 de Abril de 2004.

ALVES, T. R. **Vamos falar abertamente sobre o Câncer**. Revista Alô Mulher. Ano 2, n. 60, p. 24-28, novembro 2001.

AMPUERO, S. **Frecuencia de la mutación 185delAG en el gen BRCA1 en mujeres chilenas sanas con antecedentes familiares de cancer de mama**. Revista Médica de Chile. v. 130, n. 10, p. 1113 - 1123, Santiago, out. 2002.

ANDRADE, E. H.; ZOGHBI, M. D.; MAIA, J. G. **Volatiles from the leaves and flowers of *Carapa guianensis* Aubl.** Journal of Essential Oil Research. v. 13, pages 436-438, nov./dez., 2001.

As variações da Mama Normal. Disponível em: <<http://www.mama.com.br>>. Acesso em: 11 de Abril de 2004.

AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. **Câncer na população feminina brasileira**. Revista de Saúde Pública. v. 27, n. 1, São Paulo, Fev. 1993. ISSN 0034-8910.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: Guia de Identificação e Interesse**. 1. ed. Rio Grande do Sul: Instituto Souza Cruz, 2002. p. 278-279.

BARKER, K. **Na Bancada: Manual de Iniciação Científica em Laboratórios de Pesquisas Biomédicas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 474 p.

BARROS, I. M. **Biossegurança em Quimioterapia Antineoplásica** <<http://www.biossegurancahospitalar.com.br/files/BIOEMQUIMI.doc>>. Acesso em: 24 de Janeiro de 2005.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Editora da Universidade Federal de Viçosa, v. 2. Viçosa, 1991.

BASTOS, A. C. **Ginecologia**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 411 p.

BEIRA, F. T. A. **Evaluación de la actividad antineoplásica de extractos de la planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.** 2000. 130 f. Tesis (Doctor em Farmacia) – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Barcelona, Barcelona.

BELIZÁRIO, J. E. **O próximo desafio: Reverter o Câncer**. Revista Ciência Hoje. v. 31, n. 184, Julho de 2002. p. 51 – 57.

BONUMÁ, S. **A saúde começa na mesa**. Revista Época, 330 ed. 13 de setembro de 2004.

BORGES, M.R.; ROBINSON, W.M. **Genética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 276 – 280.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino - serviço**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002. 380 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Controle do Câncer de Mama: Documento de Consenso**. INCA, Abril 2004. 39p.

CAMARGO, L. **Comida contra o Câncer**. Jornal Zero Hora – Caderno Vida. n. 638, Porto Alegre, 24 de Janeiro de 2004. 8 p.

CAMPOS, D. **20 Problemas Frequentes em Cuidados de Saúde Preventiva**. Lisboa: McGraw – Hill de Portugal, 2002. p. 275-304.

Câncer de Mama. Disponível em: <<http://andre.sasse.com/mama.htm>>. Acesso em: 04 de Abril de 2004a.

Câncer de Mama. Disponível em: <<http://www.santalucia.com.br/oncologia/default.htm>>. Acesso em: 26 de Junho de 2004b.

CARPER, J. **Alimentos: O melhor remédio para a boa saúde**. Editora Metha, 1995. Disponível em: <www.editorametha.com.br/livros/20.asp>. Acesso em: 02 de Maio de 2004.

CARRENO, M. S. R.; PEIXOTO, S.; GIGLIO, A. **Reposição Hormonal e Câncer de Mama**. Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia, Departamento de Cancerologia da Associação Médica Brasileira. Ano II, n. 07, Art 41, 3º Trimestre de 1999.

CHAVES, N. **Nutrição Básica e Aplicada**. 2. ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara, 1985. p. 244-249.

COHEN, E.; QUISTAD, G. B.; CASIDA, J. E. **Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide.** Life Sci, v. 58, pages 1075-1081, 1996. PubMed indexed for Medline.

COLOZZA, M.; BISAGNI, G. MOSCONI, A. M.; GORIA, S. **Epirubicin versus CMF as adjuvant therapy for stage I and II breast cancer: a prospective randomised study.** European Journal of Cancer, Italy, 2002. p. 2279–2288. Received 26 February 2002; received in revised form 14 June 2002; accepted 9 August 2002.

CONNOLLY, J. D.; MCCRINDLE, R.; OVERTON, K. H.; FEENEY, J. **Heartwood constituents of *Carapa guianensis* Aubl.** Tetrahedron, v. 22, pages 891-896, England, 1966.

CONTANT, C. M. E.; SEYNAEVE, C.; KLIJN, J. G. M.; EGGERMONT, A. M. M.; VAN GEEL, A. N. **Clinical experience of prophylactic mastectomy followed by immediate breast reconstruction in women at hereditary risk of breast cancer (HB(O)C) or a proven BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation.** European Journal of Surgical Oncology (EJSO). 2002. p. 28: 627±632.

COOPER, G. M. **A Célula: Uma abordagem molecular.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 638-341.

DAMASCENO, F. C.; MORAES, M. S. A.; KRAUSE, L. C.; MARTINELLI, M.; RODRIGUES, M. R. A. **Caracterização físico-química do óleo das sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.).** XI Encontro de Química da Região Sul (XI SBQSUL), Pelotas-RS, novembro 2003.

DEVINE, C. M. **Fitoestrogênio e câncer de mama.** Disponível em: <www.aleitamento.org.br/fito.htm>. Acesso em: 27 de Abril de 2004.

DIÓGENES, M. A. R.; REZENDE, M. D. S.; PASSOS, N. M. G. **Prevenção do Câncer: Atuação do Enfermeiro na Consulta de Enfermagem Ginecologia.** 2. ed. Fortaleza: Pouchain Ramos, 2001. 125 p.

FERRAZ, A.; FARIA, D. H.; BENNETI, M. N.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A.; VON POSER, G. L. **Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*.** Phytomedicine 12 (2005) 112-115.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.** 4. ed. United States of America: Wiley-Liss, 2000. 577 p.

GALLARDO, M.; FAÚNDEZ, P.; CRUZ, A.; RODRIGUEZ, M.; ALVAREZ, M. **Determinación de una mutación en el gen BRCA1 en una familia que presenta cancer de mama hereditario.** Revista Médica de Chile. v. 132, n. 2, p. 132: 203-210, Santiago, fev. 2004.

GEORGE, E. D. **Dieta contra el Cáncer de Mama**. Panamá - El Panamá América. Octubre 20, 2003 - Publicado 10:48 a.m. Disponível em: <http://www.latinol.com/nproject/iarticulof.asp?id=21883>>. Acesso em: 06 de Abril de 2004.

GLEYE, J. **Screening of plants used in south Brazilian folk medicine**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 35 pages 165-17, 1991.

GONZALES, H. **Enfermagem em Ginecologia e Obstetrícia**. São Paulo: editora SENAC, 1994. p. 16–17.

GRAHAM, J. G.; QUINN, M. L.; FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. **Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell**. *Journal of Ethnopharmacology* v. 73, 347–377, 2000.

GUARNERI, V.; CONTE, P. F. **The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease**. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. v. 31, Supplement 1, Italy, June. 2004.

GUIMARÃES, L. J. M. **Câncer de Mama**. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/BIO240/AC%20059.htm>>. Acesso em: 18 de Julho de 2004.

GUTHRIE, N.; GAPOR, A.; CHAMBERS, A. F.; CARROLL, K. K. **Palm oil tocotrienols and plant flavonoids act synergistically with each other and with Tamoxifen in inhibiting proliferation and growth of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells in culture**. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 6(1): 41-45, Canada, 1997.

HADDAD, N.; SILVA, M. B. **Mortalidade por neoplasma em mulheres em idade reprodutiva (15 a 49 anos) no Estado de São Paulo, Brasil, de 1991 a 1995**. *Revista da Associação Médica Brasileira*. v. 47, n. 3, São Paulo, Jul./Set. 2001. ISSN 0104-4230

HADJISAVVASA, A.; CHARALAMBOUSA, E.; ADAMOUB, A.; NEUHAUSENC, S. L.; KYRIACOUA, K. **Hereditary breast and ovarian cancer in Cyprus: identification of a founder BRCA2 mutation**. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. September 2003, 151 (2004) 152–156.

HOPKINS, C. Y.; CHISHOLM, M. J.; CODY, W. J. **Fatty acid components of some Santalaceae seed oils**. *Phytochemistry*, v. 8, Issue 1, Canada, January 1969, 161-165 p. Received 15 July 1968. Available online 9 March 2001.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. **Estimativas para 2005: Incidências de Câncer no Brasil**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/index.asp?link=conteudo_view.asp&id=5>. Acesso em: 18 de Janeiro de 2005a.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. **Processo de Carcinogênese**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>. Acesso em: 23 de Maio de 2004b.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. **Quimioterapia**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 24 de Janeiro de 2005c.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. J.; AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. **In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer**. Journal of Ethnopharmacology, v. 90, pages 33-38, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. p. 292-295.

LECORRE, L.; FUSTIER, P.; CHALABI, N. BIGNON, Y. J.; GALLON, D. B. **Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines**. Clinica Chimica Acta. France, 2004. 115–121. Received 6 October 2003; accepted 12 February 2004.

LEWIS, R. **Genética Humana: Conceitos e Aplicações**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. p. 350-352.

LIS, T. **Câncer de Mama: A cura está em suas mãos**. Disponível em: <<http://www.acesa.com/mulher/arquivo/dicas/2003/04/29-mama/>>. Acesso em: 07 de abril de 2004.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Tivas do Brasil**. 2 ed. São Paulo: Editora Plantarum, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. 428 p.

LOTUFO, T. **O Poder dos Alimentos**. Revista Isto É, n. 1540, Abril de 1999.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F. **Catálogo das madeiras da Amazônia SUDAM**, 1968.

LOURENÇO, J. J. **Characterization of Mutations in BRCA1 Gen in Patients with inherited Breast and/or Ovary Cancer in National Cancer Institute (INCA - RJ)**. Revista Brasileira de Cancerologia, Rio de Janeiro, 2004, p. 50(1): 67.

MACHNIEWICZ, P. H; FAUCZ, F. R. **Associação de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2**. Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 31 ed. v. 6, n. 31. Jul/Dez. 2003.

MAHAN, L. K.; STUMP, S. E. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: editora Roca, 1998. p. 823 – 842.

Manual Merck: Saúde para a Família. Seção 15, Capítulo 166. **Tratamento do Câncer**. Disponível em: <http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec15_166.htm>. Acesso em: 24 de Janeiro de 2005.

MARQUES, L. **Cancro de Mama**. Rev Port Clin Geral, 2003, p. 19:463-68.

MATTHIAS, L. A.; JOHNS, E. A. **Tapping an Amazonian plethora: Four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil)**. Journal of Ethnopharmacology 40, 53-75, 1993.

MELLO, A. P. M. **Alimentos Nutraceuticos**. Disponível em: <<http://www.hub.unb.br/assistencia/informacoes/nutraceuticos.htm>>. Acesso em: 15 de Maio de 2004.

MELO, D.; SADDI, V. A.; MOMOTUK, E. G. **Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático**. Revista Brasileira de Cancerologia – Instituto Nacional do Câncer / INCA, v. 48, n. 1, Jan/Fev/Mar. 2002.

MITSUGUI, C. S.; SANTOS, A. L.; COSTA, E. A.; CASTRO, M. S. A.; LIMÃOS, E. A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. **Estudo da Atividade Antinociceptiva do Extrato Aquoso de *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba)**. XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, v. 1., página 200, número do resumo

MIZUNO, T. **A Solução para o Câncer**. 1. ed. São Paulo: Editora Artes gráficas Ltda, 1997. 153 p.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO, A.; GOODRICH, M. G.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. **Feasibility of a High-Flux Anticancer-Drug-Screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines**. Journal of the National Cancer Institute, v. 83, n. 11, pages 1107-1112, June, 1991.

MONTENEGRO, T. **Câncer: A humanidade contra – ataca**. Revista Super Interessante. 206 ed. Novembro de 2004.

MORENO, J. M. M. **Dieta, Nutrición y Cancer: Evidencias Epidemiológicas**. Disponível em: <<http://www.opolanco.es/Boletin14/dietcan.htm>>. Acesso em: 09 de Maio de 2004.

MUKHERJEE, A. K.; BASU, S.; SARKAR, N.; GHOSH, A. C. **Advances in Cancer Therapy with Plant based Natural Products**. Current Medicinal Chemistry, October 2001, v. 8, n. 12, 1467-1486.

MUÑOZ, J.; ROSS, P.; CRACCO, P. **Flora indígena del Uruguay: Árboles e arbustos ornamentales**. Montevideo – Uruguay: Editorial Hemisferio Sur. 1993. p. 144-145.

Fraumeni. Revista de Medicina, São Paulo, 2002,
Jan./Dez. 81 (1/4):42-6.

PORTUGAL, I. **Ação detecta e trata o Câncer de Mama.** Diário Popular – Viva Bem.
Ano 114, n. 342, Pelotas, 17 de Agosto de 2004. p. 2 – 3.

Prevenido o Câncer de Mama. Disponível em:

<http://www.reservaer.com.br/saude/cancerdemama.html>. Acesso em: 12 de Junho de 2004.

QUEIROZ, R. Y.; TEDDE, G. **Carcinomas intra-ductal e ductal micro-invasor de mama.** Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia, Departamento de Cancerologia da Associação Médica Brasileira. Ano III, n. 09, Art 34, 1º Trimestre de 2000.

REES, G. J. G. **Isto é: Guia da Saúde Familiar – Câncer.** São Paulo: Três Ltda, 2001. p. 15 – 17.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.** Canoas: Ulbra, 2003. p. 41 – 42.

RICKI, L. **Genética Humana: Conceitos e Aplicações.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. p. 351 – 359.

RIVERA-FILLAT, M. P.; GRAU-OLIETE, M. R. **Estudios preclínicos de compuestos antitumorales en: El ensayo clínico en Oncología.** Cood. e Dias Rubió. Ed. Ergon S. A. Madrid, 1995.

RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; SIMON, R. M.; TOSINI, S.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; BOYD, M. R. **Comparison of in vitro Anticancer-Drug-Screening data generated with a Tetrazolium assay versus a Protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines.** Journal of the National Cancer Institute, v. 82, n. 13, pages 1113-1117, July, 1990.

SCHULTZ, A. **Introdução à Botânica Sistemática.** v. 2. 6. ed. Porto Alegre: Editora Sagra, 1990. p. 87-88.

SEGATTO, C. **O Câncer sob controle.** Revista Época, 317. ed. Editora Globo, 14 de Junho de 2004.

SICHERI, R., LOLIO, C. A.; CORREIA, V. **Variações geográficas no padrão de mortalidade proporcional por doenças crônicas degenerativas no Brasil.** Revista de Saúde Pública, v. 26, n. 6, Dez. 1992, p. 424 – 430. ISSN 0034 – 8910.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 328-329.

SIQUEIRA, D. S.; PEREIRA, A. S.; AQUINO, F. R.; CABRAL, J. A.; FERREIRA, C. A. C.; SIMONEIT, B. R. T.; ELIAS, V. O. **Determination of high molecular mass compounds from Amazonian plant's leaves.** Química Nova, v. 26, n. 5, São Paulo Set./Out. 2003.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. **New colorimetric cytotoxicity assay for Anticancer-Drug-Screening**. Journal of the National Cancer Institute, v. 82, n. 13, pages 1107-1112, July, 1990.

SOBOTTKA, A. M. **Estudo Químico de *Baccharis ochracea* Spreng. e *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. e efeito de seus extratos aquosos sobre a reprodução de ratas**. 1992. 103 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

STEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. **Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em** . Revista Nutrição. v. 14, n.1, p. 43-52. Campinas Jan./Abr. 2001. ISSN 1415-5273.

VAISMAN, S. **Prevenindo o Câncer de Mama**. NAPACAN - Núcleo de Apoio ao Paciente com Câncer. Disponível em: <www.napacan.com.br/educando/prev_c_mama.asp>. Acesso em: 07 de Abril de 2004.

VARGAS, V. M.; GUIDOBONO, R. R.; HENRIQUES, J. A. **Genotoxicity of plant extracts**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991; 86 Suppl 2:67-70. PMID: 1842016 [PubMed - indexed for MEDLINE].

VERNETTI, F. J. **Genética e Doenças**. Diário Popular – Viva Bem. Ano 114, n. 193, Pelotas, 16 de Março de 2004. 3 p.

VERONESI, U.; LUINI, A.; COSTA, A.; ANDREOLI, C. **Mastologia Oncológica**. Rio de Janeiro: Medsi, 2002. 580 p.

XAVIER, N. L. **Manual de Ginecologia**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 294 p.

ZAVA, D. **Cuidado com a soja e as isoflavonas**. Disponível em: <www.geocities.com/novatrh/soja.html>. Acesso em: 09 de Maio de 2004.