

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Jéssica Alessandra Perini

Estudo do efeito farmacológico e da toxicidade do extrato de *Euterpe oleracea* em modelo experimental de câncer de mama.

Rio de Janeiro

2017

Jéssica Alessandra Perini

Estudo do efeito farmacológico e da toxicidade do extrato de *Euterpe oleracea* em modelo experimental de câncer de mama.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, do Departamento de Toxicologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Saúde Pública e Meio Ambiente. Subárea de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Jamila Perini
Co-orientador: Daniel Machado

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica

Biblioteca de Saúde Pública

P445e Perini, Jéssica Alessandra
 Estudo do efeito farmacológico e da toxicidade do extrato de
 Euterpe oleracea em modelo experimental de câncer de mama. /
 Jéssica Alessandra Perini. -- 2017.
 124 f. : il. color. ; tab. ; graf. ; mapas

 Orientadora: Jamila Perini.
 Coorientador: Daniel Machado.
 Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola
 Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2017.

 1. Neoplasias da Mama. 2. Terapêutica. 3. Euterpe -
 toxicidade. 4. Euterpe – efeito de drogas. 5. Experimentação
 Animal. 6. Ratos Wistar. 7. ELISA - métodos. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.99449

Jéssica Alessandra Perini

Estudo do efeito farmacológico e da toxicidade do extrato de *Euterpe oleracea* em modelo experimental de câncer de mama.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, do Departamento de Toxicologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Saúde Pública e Meio Ambiente. Subárea de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 29 de março de 2017.

Banca examinadora

Dr Antônio Palumbo Junior - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra Rossana Colla Soletti – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Dra Jamila Alessandra Perini - Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (Orientadora)

Dr Daniel Escorsim Machado - Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (Co-orientador)

Rio de Janeiro

2017.

Dedico esse trabalho aos meus maiores exemplos, a minha família, em especial ao meus
pais, Esther e Luiz Silvio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por ter permitido mais essa conquista, por ter me guiado e ter me dado forças todos os dias para nunca desistir.

Aos meus amados pais, Esther e Luiz Silvio, pelos anos de muito amor e carinho, e que apesar da distância entre o Rio de Janeiro e Joinville, me apoiaram e me incentivaram na realização e concretização dos meus sonhos. Obrigada por todos os ensinamentos e tempo dedicado a mim. Pelos princípios ensinados e passados aos quatro filhos, sei que não foi fácil, mas vocês cumpriram com o papel de pais brilhantemente. Vocês são meus exemplos! Não existem palavras para agradecer o tanto que vocês fizeram e fazem por mim. Amo muito vocês!

A minha querida avó Hilda (*in memoriam*), pela paciência e amor que sempre teve comigo, mesmo quando eu sapateava no meio da rua. Sei que de onde estiver, está olhando por mim e me iluminando. Quantas saudades de você.

Aos meus queridos e amados irmãos, Jonathan, Janine e Jamila, pelos bons momentos vividos e compartilhados. Pelos ensinamentos, amizade e cumplicidade. Pelo apoio, incentivo e carinho que sempre me deram. Amo vocês!

Aos meus queridos sobrinhos, Luca, Mariah e Alice, pela diversão, alegria, carinho e da magia em ser criança. Amo vocês!

Um especial agradecimento à minha irmã Jamila e ao meu cunhado Daniel, por me proporcionarem a vinda ao Rio de Janeiro, me recebendo amorosamente em sua casa, e por me deixarem fazer parte dessa família tão linda e especial. Sei que não é fácil, perder a privacidade como casal e família. Por me deixarem participar do crescimento da nossa pequena Alice. Pelas conversas, broncas e conselhos. Por me fazerem crescer como pessoa e como profissional. Pelas comemorações em cada nova etapa e conquista. Sem vocês nada disso seria possível. Sou imensamente agradecida pelo que fizeram e fazem por mim. Amo vocês!

A minha amada afilhada Alice, pela alegria de viver, pelas brincadeiras, pelo carinho e amor. Pelas festas do pijama, com direito a nuggets, batata sorriso e muitas brincadeiras, ufa... e quantas brincadeiras! Pela alegria no rosto e na voz quando me vê e grita “Dinnndaaa”. Pela ternura em me chamar de “Dinda”, uma palavra que remete a tantos significados e responsabilidades. Pela escolha da Mel, nossa amada e “branca

azedinha” gatinha, que trouxe mais alegrias e amor a nossas vidas. Pela companhia que vocês duas me fazem. Amo vocês duas!

As minhas queridas e eternas amigas, grupo “Amigas pelo Brasil”, Manuela (Manuzão), Juliana (Piu), Ailin (Lin), Rafaela (Faffy), Samara (Sah) e Mariana (Mah), pelo companheirismo, carinho, risadas e momentos vividos (que não foram poucos). Nossos encontros sempre tão esperados, ainda mais agora que eu não estou mais aí (em Joinville). Pelos nossos amigos secretos de encerramento, sempre rendendo muitas histórias e boas lembranças. Vocês fizeram e fazem essa caminhada ser mais leve. Adoro vocês!

As minhas amigas Bruna e Luciane, que desde a faculdade dividimos angustias, sonhos, conquistas e realizações. Sem contar, as “festas em casa” que agora devido a vida adulta, já não acontecem mais, mas sempre que podemos, estamos nos encontrando para matar as saudades. É sempre bom revê-las!

Às eternas ex HDH, Nicole e Wanessa, pelas conversas sobre nossa profissão, trabalho, animais e tudo o que adoramos. Pelo incentivo e apoio nessa jornada. Pela ida incansáveis ao restaurante O Forno. Como é bom estar com vocês.

Aos meus orientadores, Dra Jamila e Dr. Daniel, que confiaram e acreditaram em mim e me possibilitaram a realização desse trabalho. Sempre me orientando para que eu alcançasse o meu máximo. Pela paciência, ensinamentos e incentivos importantes para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos colegas, Daniela, Erika, Jéssica Vilarinho, Karina, Lucas, Mayara, Mirla e Thaís, do Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas e do Laboratório de Pesquisa em Análises Clínicas, pelos estudos, aprendizado, amizade e risadas. Às meninas dos “animais”, pela ajuda nos experimentos e nos finais de semana e feriados dispensados para tratar os animais. Sem vocês todos, essa trajetória teria sido muito mais difícil.

A amiga Karina, pelas conversas, risadas e discussões em torno do nosso tão querido açai. Não podendo deixar de mencionar, das deliciosas gordices divididas. Obrigada pelo carinho e ombro amigo.

Ao aluno Thiago do Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia pela ajuda na coleta dos sofridos lavados e nas citometrias e dosagem de óxido nítrico.

A técnica Patrícia do biotério da UEZO, pela disponibilidade em sempre nos atender com a demanda dos animais e ajudando no que fosse possível.

Ao professor e amigo Arnaldo, pelas caronas até a FIOCRUZ, pelas conversas sobre política, saúde e situação do Brasil e pelo incentivo de continuar essa jornada.

Aos meus companheiros de Mestrado, pelos estudos, desesperos, risadas e amizades. Pelos grupos de WhatsApp que nunca paravam às vésperas das provas de epidemiologia e estatísticas. Enfim, vencemos mais essa etapa. Não podendo deixar de mencionar nossos encontros fora da ENSP, sempre muito prazerosos. Um obrigada especial as duas Danis, a “Dani não mãe” e a “Dany mãe” pelo companheirismo e estudos, e também a guerreira Cecília, com toda a sua organização como líder da turma e seu bom humor. Vocês todos tornaram os dois anos de mestrado mais leves.

A todos os professores que participaram da minha formação acadêmica e profissional.

As agências de fomento FAPERJ e FIOCRUZ, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização e concretização desse trabalho, para o meu crescimento pessoal e profissional.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

RESUMO

O câncer de mama é um problema de saúde pública, com uma alta incidência e sendo a principal causa de morte por câncer em mulheres no Brasil e no mundo. Dentre os processos envolvidos no microambiente tumoral da mama, destacam-se a angiogênese e a inflamação, tendo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e os macrófagos, como os principais fatores desses processos. Recentemente, o extrato de *Euterpe oleracea* (açai), um fruto abundantemente encontrado na região amazônica, apresentou efeito antitumoral *in vitro* em linhagens de células de carcinoma mamário humano. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo estabelecer um modelo experimental de carcinoma mamário e avaliar o potencial efeito farmacológico do açai no câncer de mama. Foram utilizadas 40 ratas Wistar, distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: tratado com 200 mg/kg de extrato de açai e controle que recebeu apenas o veículo, ambos via gavagem durante 16 semanas. Um dia depois do início do tratamento, foi induzido o tumor mamário com administração de 25 mg/kg de DMBA (7,12-dimetil benzo antraceno) via subcutânea na região mamária. Ao final do tratamento o tumor foi coletado para as análises macroscópica, histológicas e imunohistoquímica (VEGF, receptor do fator de crescimento endotelial vascular - FLK, COX-2 e metaloproteinase de matriz 9 - MMP-9); sangue para a dosagem dos níveis glicêmicos e lavado peritoneal para as análises bioquímica (óxido nítrico), citometria de fluxo (F4-80/MAC-2+) e ELISA (VEGF, prostaglandina E₂ - PGE₂ e interleucina 10 - IL-10). As amostras do coração, fígado e rins foram coletadas para análises toxicológicas. O estabelecimento tumoral foi confirmado, após 16 semanas da indução, pela avaliação macroscópica e histológica, com uma taxa de indução tumoral e óbitos de 93,2% e 43,8%, respectivamente. Após tratamento com açai, na análise histológica verificou-se uma diminuição das células inflamatórias, uma menor imunomarcção para VEGF, FLK e COX-2, diminuição no número de macrófagos e níveis significativamente menores de VEGF, PGE₂ e IL-10, no grupo tratado com açai comparado ao controle. O açai aumentou a sobrevida dos animais ($P = 0,002$, Teste de long-rank), reduziu significativamente o número de óbitos ($P = 0,0036$, Teste Qui-quadrado) e protegeu o fígado e os rins dos efeitos tóxicos causados pelo carcinógeno DMBA. Esses resultados indicam que o açai reduziu o processo inflamatório e angiogênico, provavelmente pela a redução significativa no número de macrófagos, inibindo a sinalização VEGF/FLK e os níveis de PGE₂, contribuindo para a redução do carcinoma mamário. Concluímos que o açai é um potencial agente terapêutico coadjuvante para ser testado no tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: Neoplasia da mama, Terapêutica, Modelo animal, *Euterpe oleracea*.

ABSTRACT

Breast cancer is a public health problem with high incidence among women and the leading cause of cancer death in women in Brazil and the world. Among the processes involved in the breast tumor microenvironment, angiogenesis and inflammation plays a central role, with the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), cyclooxygenase 2 (COX-2) and macrophages, as the main factors of these processes. Recently, the extract of *Euterpe oleracea* (açai), a fruit that is widely found in the Amazon region, already showed antitumorigenic effect in vitro in human breast cancer cell lines. The present study aimed to establish a breast carcinoma experimental animal model and investigate the potential pharmacological effect of açai on breast cancer. Forty female Wistar rats were randomized into two groups: treated with 200 mg/kg of açai extract or vehicle, via gastric tube for 16 consecutive weeks. One day after initiation of treatment, mammary carcinogenesis was induced using a subcutaneous injection of 25 mg/kg of 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) in the mammary gland. After treatment, the tumor was collected for macroscopic, histological and immunohistochemical (VEGF, FLK, COX-2 and MMP-9) analyzes; blood for measurement of glucose levels and the peritoneal fluid was collected to nitric oxide (NO) dosage, flow cytometry (F4-80/MAC-2+) and ELISA immunoassay (VEGF, PGE2 e IL-10). Heart, liver and kidney samples were collected for toxicological analysis. The mammary carcinoma was confirmed, after 16 weeks of induction, by macroscopic and histological evaluation, and tumor incidences rate were 93.2% and of deaths were 43.8%. After the treatment with açai, a decrease in the number of inflammatory cells was observed in the histological analysis and a reduction in immunostaining of VEGF, FLK and COX-2 was observed and macrophages levels were lower in the treated group than the control group. The treated group also exhibited lower concentrations of PGE2, VEGF and IL-10 compared to the control group. Survival analysis indicates that açai increased the survival ($P = 0.0002$, long-rank test) and reduced the deaths number ($P = 0.0036$, Chi-square test) in the treated group and protect the liver and kidneys the toxics effects of DMBA. The results of this study demonstrated the antiangiogenic and anti-inflammatory potential of açai, probably by the decreases the number of activated macrophages, resulting in the reduction of the VEGF, FLK and COX-2 and may reduce the development of breast cancer. We concluded that açai is a promising therapeutic agent for breast cancer.

Keywords: Breast Neoplasms, Therapeutics, Animal Models, *Euterpe oleracea*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa de 2016 nos EUA de casos novos e óbitos pelas principais localizações de câncer por sexo.....	24
Tabela 2: Rastreamento do câncer de mama no Brasil.....	27
Tabela 3: Categorias BI-RADS® para o exame mamográfico, sua interpretação e recomendação de conduta.....	29
Tabela 4: Caracterização dos subtipos dos tumores de mama.....	30
Tabela 5: Principais compostos fitoquímicos encontrados no açaí.	37
Tabela 6: Peso corporal das ratas não induzidas e induzidas com DMBA durante as 16 semanas de indução tumoral.....	54
Tabela 7: Número de animais induzidos com DMBA, que desenvolveram o tumor mamário e que vieram a óbito nos grupos controle e tratado com o extrato de açaí durante as 16 semanas de indução tumoral.	64
Tabela 8: Peso corporal dos grupos controle e tratado com açaí.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia da mama humana durante a puberdade não gravídica.....	21
Figura 2: Histologia da mama feminina.	22
Figura 3: Glândula mamária feminina inativa e ativa e suas modificações durante a gravidez e lactação.....	23
Figura 4: Dez tipos de câncer mais incidentes nas mulheres no Brasil, estimados para 2016 e 2017, exceto pele não melanoma.	25
Figura 5: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade de Federação.	25
Figura 6: Mortalidade pelas localizações de cânceres mais frequentes na população feminina em regiões desenvolvidas e em desenvolvimento em 2012.	26
Figura 7: Exame clínico das mamas.	28
Figura 8: Características de células tumorais.	31
Figura 9: Fruta Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	36
Figura 10: Indução via subcutânea de câncer de mama com DMBA em ratas Wistar. .	43
Figura 11: Número de animais induzidos com DMBA para o estabelecimento do modelo experimental de câncer de mama e os animais que desenvolveram o tumor mamário e que tiveram óbito em função de abscesso tumoral.	53
Figura 12: Peso corporal das ratas não induzidas e induzidas com DMBA durante as 16 semanas de estabelecimento do carcinoma mamário.	54
Figura 13: Análise macroscópica da região abdominal das ratas após 16 semanas da indução tumoral com DMBA.	55
Figura 14: Porcentagem da área do tumor nos animais não induzidos e induzidos, após o estabelecimento tumoral (16 semanas).	56
Figura 15: Análise microscópica com coloração de HE após 16 semanas de estabelecimento do modelo de carcinoma mamário.	57
Figura 16: Imunomarcção para VEGF nas amostras de tecido mamário dos animais após o estabelecimento do carcinoma mamário	58
Figura 17: Quantificação da porcentagem de VEGF nas amostras de tecido dos grupos não induzido e induzidos com DMBA, após estabelecimento do modelo tumoral.	58
Figura 18: Concentração de VEGF pelo método de ELISA nas amostras de lavados dos animais não induzidos e induzidos com DMBA após o estabelecimento tumoral.	59

Figura 19: Concentração de PGE ₂ pelo método de ELISA nas amostras de lavado peritoneal das ratas não induzidas e induzidas com DMBA, após estabelecimento do tumor.....	60
Figura 20: Concentração de IL-10 pelo método de ELISA no lavado peritoneal dos grupos não induzidos e induzidos com DMBA, após estabelecimento do câncer de mama.	60
Figura 21: Citometria de fluxo após estabelecimento tumoral nas amostras de lavado peritoneal das ratas não induzidas e induzidas com DMBA.	61
Figura 22: Esfregaço sanguíneo das ratas após o estabelecimento tumoral	62
Figura 23: Quantificação da série branca nas amostras de sangue dos animais não induzidos e induzidos após o estabelecimento do carcinoma mamário.	62
Figura 24: Número de animais induzidos com DMBA para o estabelecimento do câncer de mama.....	63
Figura 25: Curva de sobrevida dos animais controles e tratados com o extrato de açaí durante as 16 semanas de tratamento	64
Figura 26: Análise macroscópica dos tumores após o tratamento com açaí.	65
Figura 27: Avaliação histológica com coloração de HE nas amostras de tumores mamários dos animais controle e tratado com açaí	66
Figura 28: Imunohistoquímica para VEGF.	67
Figura 29: Quantificação da porcentagem de VEGF nas amostras de tecido dos grupos controle e tratado com açaí.....	67
Figura 30: Dosagem da concentração sérica de VEGF pelo método de ELISA nas amostras de lavado peritoneal dos animais controle e tratados com açaí.....	68
Figura 31: Imunohistoquímica para FLK.	69
Figura 32: Quantificação da porcentagem de FLK nas amostras de tecido dos grupos controle e tratado com o extrato de açaí.	69
Figura 33: Imunomarcação para MMP-9.	70
Figura 34: Quantificação da porcentagem de MMP-9 nas amostras de tecido das ratas controle e tratada com açaí.	70
Figura 35: Citometria de fluxo para identificação de macrófagos em amostras de lavado peritoneal de ratas controle e tratadas com açaí.	71
Figura 36: Imunomarcação para COX-2.	72

Figura 37: Quantificação da porcentagem de COX-2 nas amostras de tecido dos animais controle e tratado com o extrato de açaí.....	72
Figura 38: Dosagem dos níveis de PGE ₂ pelo método de ELISA nas amostras de lavado peritoneal do grupo controle e tratado com açaí.....	73
Figura 39: Dosagem dos níveis de IL-10 pelo método de ELISA nas amostras de lavado peritoneal das ratas controle e tratadas com o extrato de açaí.....	74
Figura 40: Dosagem de óxido nítrico pelo método colorimétrico em amostras de lavado peritoneal dos animais controle e tratado com açaí.....	74
Figura 41: Peso corporal das ratas controle e tratados com açaí durante todo o período de indução e tratamento (16 semanas).....	75
Figura 42: Dosagem de glicose no sangue dos animais controle e tratados com açaí ...	76
Figura 43: Comprimento e largura do coração dos animais controle e tratados com o extrato de açaí.....	77
Figura 44: Avaliação histológica com coloração de HE em amostras de tecido do coração dos animais controles e tratados com extrato de açaí.	78
Figura 45: Comprimento e largura do fígado dos animais controles e tratados com extrato de açaí.....	78
Figura 46: Análise microscópica com coloração de HE de amostras de tecido do fígado das ratas controle e tratadas com extrato de açaí.....	79
Figura 47: Comprimento e largura dos rins dos animais controles e tratados com açaí.	79
Figura 48: Análise histológica com coloração de HE em amostras de tecido dos rins dos grupos controle e tratado com extrato de açaí	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	American Cancer Society
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BI-RADS	Breast Imaging Reporting and Data System
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DAB	Diaminobenzidina
DL ₅₀	Dose letal 50%
DMBA	7,12-Dimetilbenzantraceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
ECM	Exame clínico das mamas
ELISA	Imunoensaio Enzimático
FDA	Food and Drug Administration
FLK	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
G	Gramas
GRO/KC	Análogo humano do rato para interleucina 8
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina-Eosina
HER-2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IFN γ	Interferon-gama
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Intraperitoneal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
μ M	Micrómetro
mg/dl	Miligramas por decilitros

MMP-2	Metaloproteinase de Matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz 9
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
NF-kB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAAF	Punção por agulha fina
PAG	Biópsia percutânea com agulha grossa
PARP-1	Poli(ADP-ribose) polimerase-1
PBS	Tampão fosfato-salino
PCNA	Antígeno nuclear da proliferação celular
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PFA	Paraformaldeído
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pg/mL	Picogramas por mililitros
ppt	Partes por trilhão
RE	Receptor de estrogênio
RM	Ressonância magnética
RP	Receptor de progesterona
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNM	Tamanho, linfonodo, metástase
UEZO	Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular-1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 Anatomia e histologia da mama feminina.....	21
2.2 Câncer de mama: Conceito e epidemiologia.....	23
2.3 Diagnóstico e caracterização tumoral do câncer de mama.....	27
2.4 Microambiente tumoral.....	31
2.5 Tratamento e definição da conduta terapêutica do câncer de mama.....	33
2.5.1 <i>Euterpe oleracea</i> como proposta de tratamento do câncer de mama.....	36
3. JUSTIFICATIVA.....	41
4. OBJETIVOS.....	42
4.1 Objetivos gerais.....	42
4.2 Objetivos específicos.....	42
4.2.1 Estabelecer um modelo experimental, <i>in vivo</i> , de carcinoma mamário utilizando um indutor químico.....	42
4.2.2 Avaliar o efeito farmacológico e a toxicidade do extrato de <i>Euterpe oleracea</i> em modelo experimental de câncer de mama.....	42
5. METODOLOGIA.....	43
5.1 Estabelecimento de modelo experimental de câncer de mama em Ratas Wistar, utilizando um indutor químico.....	43
5.1.1 Peso dos animais durante a indução tumoral.....	44
5.1.2 Caracterização morfológica dos tumores mamários.....	44
5.1.3 Estudo imunohistoquímico.....	44
5.1.4 Estudo histomorfométrico.....	45
5.1.5 Citometria de fluxo.....	46
5.1.6 Imunoensaio Enzimático.....	47
5.1.7 Esfregaço sanguíneo e análise hematológica (série branca).....	49
5.2 Avaliação do efeito farmacológico do extrato de <i>Euterpe oleracea</i> em modelo experimental de carcinoma mamário.....	49
5.2.1 Estudo imunohistoquímico.....	50
5.2.2 Análise da produção de Óxido Nítrico.....	50

5.3 Avaliação da toxicidade do extrato de <i>Euterpe oleracea</i> em modelo experimental de câncer de mama	51
5.3.1 Níveis glicêmicos	51
5.3.2 Análise dos órgãos.....	52
5.4 Análise estatística	52
6. RESULTADOS	53
6.1 Estabelecimento do modelo experimental de câncer de mama	53
6.1.1 Peso dos animais durante a indução tumoral.....	53
6.1.2 Caracterização morfológica dos tumores mamários.....	55
6.1.3 Estudo imunohistoquímico.....	57
6.1.4 Imunoensaio Enzimático	59
6.1.5 Citometria de fluxo.....	61
6.1.6 Esfregaço sanguíneo e análise hematológica (série branca).....	61
6.2 Tratamento com o extrato de <i>Euterpe oleracea</i> no modelo de carcinoma mamário	63
6.2.1 Avaliação histológica dos tumores após tratamento com açaí	65
6.2.2 Avaliação do processo angiogênico	66
6.2.2.1 Citometria	71
6.2.3 Avaliação do processo inflamatório	71
6.2.3.1 ELISA (PGE ₂ e IL-10).....	73
6.2.3.2 Análise da produção de Óxido Nítrico	74
6.2.4 Avaliação da toxicidade	75
6.2.4.1 Níveis glicêmicos	76
6.2.4.2 Análise dos órgãos.....	77
7. DISCUSSÃO	81
8. CONCLUSÃO.....	90
9. PERSPECTIVAS	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
Anexo I.....	102
Anexo II.....	103
Anexo III	104
Anexo IV	105
ANEXO V	109

1. INTRODUÇÃO

O câncer tornou-se um problema global de saúde pública, em virtude do aumento de sua incidência nos últimos anos, devido ao envelhecimento populacional e ao aumento da exposição a fatores de risco ambientais (TORRE et al., 2015). No mundo, em 2012, foram observados aproximadamente 14,1 milhões de novos casos de câncer, cerca de 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões com câncer. Dentre essas estimativas, 8 milhões dos novos casos de câncer, 5,3 milhões das mortes e 15,6 milhões dos que viviam com câncer aconteceram em países em desenvolvimento (IARC, 2012). Para o Brasil, nos anos de 2016 e 2017, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2015). Até 2030, no mundo, estima-se um aumento significativo no número de novos casos de câncer por ano de aproximadamente 21,7 milhões e 13 milhões de mortes por câncer (ACS, 2015a).

Entre essas estimativas mundiais do ano de 2012, cerca de 6,7 milhões de novos casos de câncer e 3,5 milhões de mortes ocorreram em mulheres. E uma das localizações de câncer que tem maior incidência nas mulheres é a mama, sendo também a principal causa de morte por câncer nas mulheres no mundo (IARC, 2012; ACS, 2015b). No Brasil, também é a neoplasia mais comum nas mulheres se excluirmos os tumores de pele não melanoma, sendo estimados 57.960 novos casos para 2016 e 2017, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015), sendo também a maior causa de morte por câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O câncer de mama, assim como o câncer em geral, é o desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular, promovendo alterações no crescimento celular ou apoptose e levando ao surgimento do tumor. Isso ocorre devido a alterações genéticas, podendo ser hereditárias ou em virtude de exposição a fatores ambientais ou fisiológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Atualmente, os tipos de tratamento para o câncer de mama são: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, inibidores hormonais e anticorpos monoclonais (EBCTCG, 2005a; NOUNOU et al., 2015). Os tratamentos disponíveis para essa doença são de elevado custo e nem sempre apresentam os resultados esperados. Assim, a busca contínua por novas terapias farmacológicas torna-se relevante.

Recentemente, o extrato *Euterpe oleracea*, popularmente conhecido como açaí, principalmente encontrado na região Amazônica (LICHTENTHÄLER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006a), vem sendo investigado não apenas por seus benefícios decorrentes de seus macronutrientes, mas também devido a suas propriedades farmacológicas, em função da sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; SILVA et al., 2014). Resultados promissores foram recentemente apresentados por Silva et al. (2014), que observaram o efeito antitumoral do extrato do açaí em um estudo, *in vitro*, utilizando linhagens de células de carcinoma mamário humano. Até o presente momento não existem dados sobre o efeito farmacológico ou tóxico do extrato de *Euterpe oleracea* em modelo experimental, *in vivo*, de câncer de mama. Nesse contexto, surge a necessidade de estudos mais abrangentes para avaliar o efeito farmacológico, bem como a toxicidade do açaí na terapia do câncer de mama.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia e histologia da mama feminina

A mama feminina é um órgão par, situado sob o músculo peitoral na parede torácica superior. Sua principal função é a produção de leite e é constituído por epitélio e estroma especializado (KUMAR e PERKINS, 2010). A composição histológica da mama humana varia conforme a idade, o sexo e o estado fisiológico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). Para auxiliar no diagnóstico das doenças da mama, ela é dividida em quadrantes, sendo: região central da mama, superior lateral e medial, inferior lateral e medial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A glândula mamária humana do nascimento até a puberdade é imatura e não cresce, ou seja, está no estado de quiescência (MACIAS e HINCK, 2012). Nessa fase, é constituída por seios e ductos galactóforos, compostos por ramificações e porções dilatadas (MACIAS e HINCK, 2012; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). Na puberdade, os ductos são alongados por estímulo de hormônios ovarianos e há também a diferenciação em células do epitélio luminal e mioepiteliais, que constituem os ductos (Figura 1) (MACIAS e HINCK, 2012).

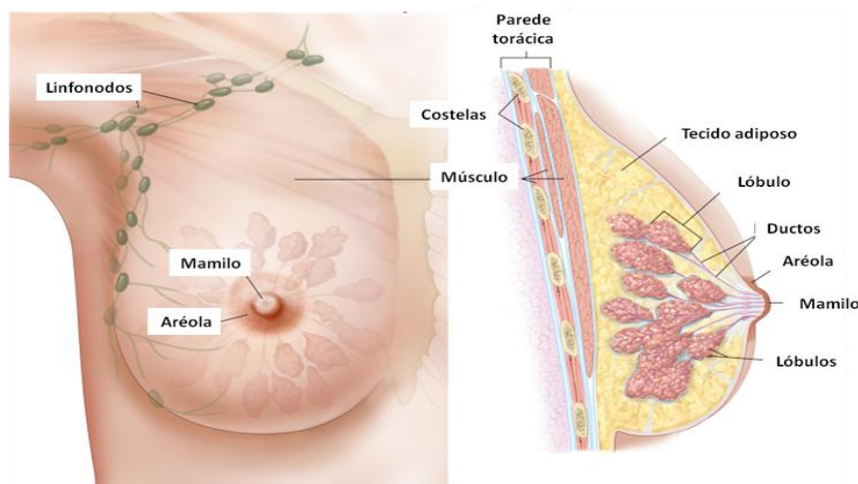


Figura 1: Anatomia da mama humana durante a puberdade não gravídica. Adaptado de Breast Cancer Treatment (PDQ), 2015.

Na mulher adulta, o estroma interlobular da mama é composto por tecido fibroso denso e tecido adiposo, que envolvem os lóbulos, contendo uma mistura de linfócitos disseminados e é responsivo hormonalmente (Figura 2) (KUMAR e PERKINS, 2010).

No mamilo, originam-se de seis a dez dos principais ductos mamários, estando o epitélio escamoso queratinizado da pele dentro dos ductos, alterando-se subitamente para um epitélio cuboidal com dupla camada que reveste o ducto. O ducto terminal então ramifica-se, criando um agrupamento de pequenos ácinos, que se assemelham a um cacho de uva e, assim, formando o lóbulo (KUMAR e PERKINS, 2010).



Figura 2: Histologia da mama feminina. Mama composta por lóbulos e ductos envolvidos pelo estroma interlobular, composto principalmente por tecido fibroso denso. **Fonte:** <<http://anatpat.unicamp.br/lamgin21.html>>.

Os lóbulos e ductos são cobertos por dois tipos de células: as mioepiteliais e as epiteliais luminais. As células mioepiteliais são compostas por miofilamentos, ficam sobre a membrana basal e auxiliam na saída do leite e dão base aos lóbulos. Essas células são revestidas pelas células epiteliais luminais. Dessa forma, apenas as células luminais do ducto terminal e do lóbulo são responsáveis pela produção do leite (KUMAR e PERKINS, 2010).

Durante a gravidez, as glândulas mamárias iniciam um intenso crescimento e desenvolvimento, e ductos dão lugar a alvéolos mamários (unidades secretoras tubuloalveolares) em decorrência da ação de vários hormônios como estrógenos, progesterona, prolactina e lactogênio placentário humano (Figura 3) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). E é só nessa fase, ou seja, no início da gravidez, que a mama fica inteiramente madura e funcional (KUMAR e PERKINS, 2010). O leite humano é produzido durante a fase de lactação pelas células epiteliais dos alvéolos e quando a amamentação cessa, a maior parte desses alvéolos que se originaram durante a gestação degenera por apoptose e são eliminados pelos macrófagos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

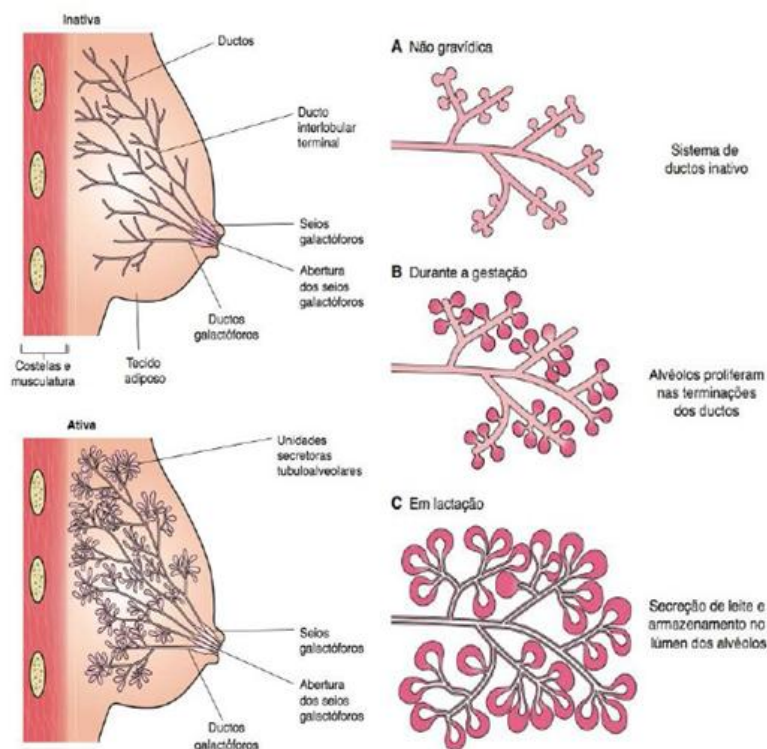


Figura 3: Glândula mamária feminina inativa e ativa e suas modificações durante a gravidez e lactação. Fonte: Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Geral. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Um pouco antes da menopausa, inicia-se um processo de atrofia do tecido mamário, sendo substituído progressivamente por tecido adiposo, até que na menopausa é quase que inteiramente formado por esse tecido e também por resíduos de tecido glandular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). A transição entre essas etapas e as alterações fisiológicas do tecido mamário são mediadas pela ação de hormônios, sendo o principal deles o estrogênio. Porém, ainda é insuficiente o que se sabe sobre os mecanismos nos quais as células epiteliais e estromais respondem aos estímulos hormonais, pois uma possível desregulação nesse processo pode desencadear em condições patológicas, como, por exemplo, o câncer (MACON e FENTON, 2013).

2.2 Câncer de mama: Conceito e epidemiologia

O câncer de mama é o desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular, promovendo alterações no crescimento celular ou apoptose e levando ao surgimento do tumor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; ACS, 2015c). Esse evento ocorre em virtude de alterações genéticas, podendo ser hereditárias ou devido a exposições a fatores ambientais ou fisiológicos (alterações hormonais) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Atualmente, o câncer de mama é um problema global de saúde pública, sendo uma das mais frequentes e importantes doenças que acometem as mulheres no mundo, tanto em regiões desenvolvidas (794 mil casos) como em regiões em desenvolvimento (883 mil casos) (IARC, 2012). É a segunda localização de tumor mais frequente no mundo e a primeira entre as mulheres, acometendo cerca de 1,38 milhão de indivíduos por ano (ACS, 2015b). Em 2012, foram diagnosticados no mundo 1,67 milhão de novos casos desta neoplasia, equivalendo-se a 25% de todos os tipos diagnosticados em mulheres (IARC, 2012; INCA, 2014).

São estimados para o ano de 2016, nos Estados Unidos, cerca de 247 mil novos casos de câncer de mama em mulheres, sendo a neoplasia mais comum no sexo feminino, representando 29% de todos os cânceres diagnosticados, com um número de óbitos em torno de 40 mil, totalizando 14% das mortes por todos os cânceres, atrás apenas do câncer de pulmão, conforme tabela 1 (ACS, 2015b).

Tabela 1. Estimativa de 2016 nos EUA de casos novos e óbitos pelas principais localizações de câncer por sexo.

Estimativa de novos casos*		Estimativa de óbitos	
Masculino	Feminino	Masculino	Feminino
Próstata	Mama	Pulmão e brônquio	Pulmão e brônquio
180.890 (21%)	246.660 (29%)	85.920 (27%)	72.160 (26%)
Pulmão e brônquio	Pulmão e brônquio	Próstata	Mama
117.920 (14%)	106.470 (13%)	26.120 (8%)	40.450 (14%)
Cólon e reto	Cólon e reto	Cólon e reto	Cólon e reto
70.820 (8%)	63.670 (8%)	26.020 (8%)	23.170 (8%)
Bexiga urinária	Corpus uterino	Pâncreas	Pâncreas
58.950 (7%)	60.050 (7%)	21.450 (7%)	20.330 (7%)
Melanoma da pele	Tireoide	Fígado e vias biliares	Ovário
46.870 (6%)	49.350 (6%)	18.280 (6%)	14.240 (5%)
Linfoma Não-Hodgkin	Linfoma Não-Hodgkin	Leucemia	Corpus uterino
40.170 (5%)	32.410 (4%)	14.130 (4%)	10.470 (4%)
Renal e pélvico renal	Melanoma da pele	Esôfago	Leucemia
39.650 (5%)	29.510 (3%)	12.720 (4%)	10.270 (4%)
Cavidade oral e faringe	Leucemia	Bexiga urinária	Fígado e vias biliares
34.780 (4%)	26.050 (3%)	11.820 (4%)	8.890 (3%)
Leucemia	Pâncreas	Linfoma Não-Hodgkin	Linfoma Não-Hodgkin
34.090 (4%)	25.400 (3%)	11.520 (4%)	8.630 (3%)
Fígado e vias biliares	Renal e pélvico renal	Cérebro e sistema nervoso	Cérebro e sistema nervoso
28.410 (3%)	23.050 (3%)	9.440 (3%)	6.610 (2%)
Todas as localizações	Todas as localizações	Todas as localizações	Todas as localizações
841.390 (100%)	843.820 (100%)	314.290 (100%)	281.400 (100%)

* Excluindo câncer de pele basocelular e de células escamosas e carcinoma in situ exceto bexiga urinária. Adaptada do ACS - <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsstatistics/cancerfactsfigure2016/index>.

No Brasil, excluindo-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é a neoplasia mais comum nas mulheres, sendo estimados 57.960 novos casos em 2016 e

2017, representando 28,1% de todos os casos de neoplasias em mulheres, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 4) (INCA, 2015).

	Localização Primária	Casos	%
 Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo do útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 4: Dez tipos de câncer mais incidentes nas mulheres no Brasil, estimados para 2016 e 2017, exceto pele não melanoma. * Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10. Adaptado de INCA (2015).

Se considerarmos as regiões do Brasil, excluindo os cânceres de pele não melanoma, o de mama é o câncer mais incidente nas mulheres nas regiões Sul (74,30/100.000), Sudeste (68,08/100.000), Centro-Oeste (55,87/100.000) e Nordeste (38,74/100.000). Já na região Norte, é o segundo tumor mais frequente, com um risco estimado de 22,26 a cada 100 mil mulheres (Figura 5) (INCA, 2015).

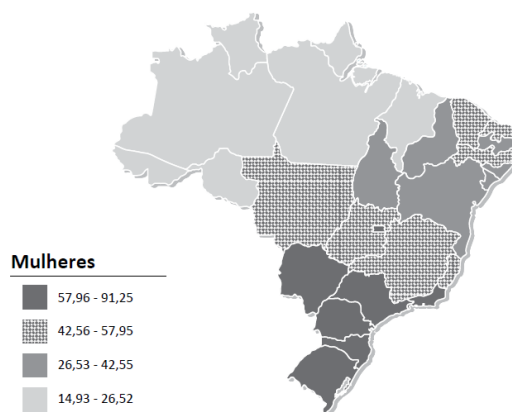


Figura 5: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade de Federação (neoplasia maligna da mama feminina). Fonte: INCA, 2015.

A incidência e a mortalidade por câncer de mama, desde as estimativas de 2008, vêm aumentando, com um acréscimo de 20% para a incidência e de 14% para a mortalidade (IARC, 2012). Conforme dados provenientes de Registros Hospitalares, em média, 60% dos tumores de mama são diagnosticados no estágio III ou IV (THULER e MENDONÇA, 2005; SIMON et al., 2009), acarretando um maior risco de mortalidade.

Com isso, o câncer de mama ocupa a quinta causa de morte por neoplasia em geral no mundo e, no Brasil, ocupa a quarta posição (IARC, 2012). Dados do ano de 2012 indicam que no sexo feminino é a causa de morte por tumor mais frequente, tanto em regiões desenvolvidas, com um total de 198 mil mortes, representando 15,4% do total de óbitos, quanto em regiões em desenvolvimento, com 324 mil mortes, equivalendo a 14,3% do total, perdendo apenas para o câncer de pulmão (Figura 6) (IARC, 2012).

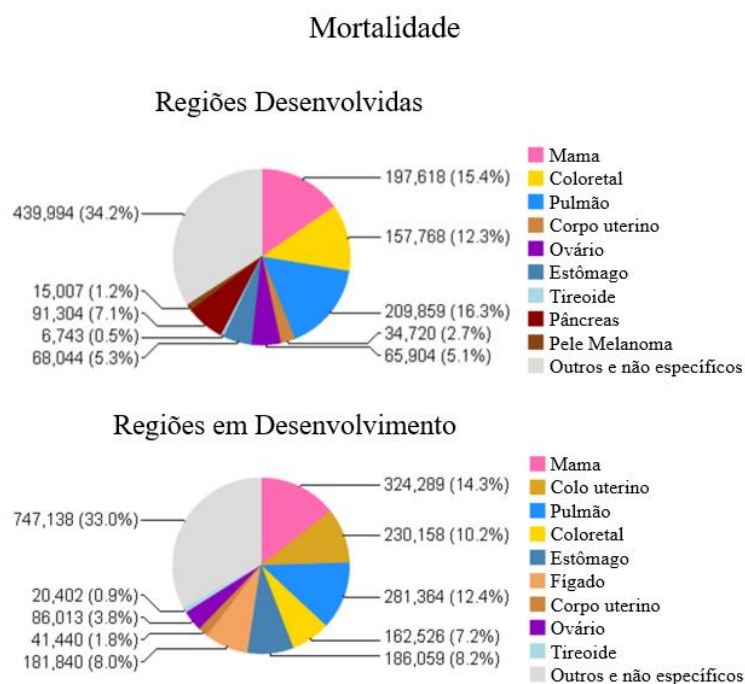


Figura 6: Mortalidade pelas localizações de cânceres mais frequentes na população feminina em regiões desenvolvidas e em desenvolvimento em 2012. Adaptado de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.

No ano de 2012, em todo o mundo, 1,7 milhão de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama, havendo 6,232 milhões de mulheres vivas, diagnosticadas com a doença nos últimos 5 anos com um total de 522 mil mortes em decorrência dessa neoplasia (IARC, 2012). No Brasil, a mortalidade pelo câncer de mama também é a maior causa de morte por câncer entre mulheres, havendo em 2013, um total de 14.206 óbitos, tendo a região Sul (12,7 óbitos por 100 mil mulheres) e a Sudeste (12,62 óbitos por 100 mil mulheres) as maiores taxas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Apesar da crescente mortalidade, a sobrevida por esse câncer vem melhorando nas últimas 4 décadas em países desenvolvidos (INCA, 2014), possivelmente pelo avanço no diagnóstico precoce e pelas melhorias nos tratamentos ofertados (ACS,

2015b; NOUNOU et al., 2015). Atualmente, a sobrevida de cinco anos é de 85% para os países desenvolvidos, porém para os países em desenvolvimento esses valores não aumentaram, estando entre 50 e 70% (INCA, 2015). Dessa forma, mesmo considerado um câncer de relativo bom prognóstico, desde que diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade do câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito possivelmente porque a doença está sendo diagnosticada ainda em estágios avançados (LEE et al., 2012; INCA, 2014).

2.3 Diagnóstico e caracterização tumoral do câncer de mama

O diagnóstico do câncer de mama é feito normalmente por meio de exame clínico das mamas, mamografia, ultrassom, ressonância magnética, biópsia (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2002; NOUNOU et al., 2015), avaliação dos receptores hormonais positivos para estrogênio (RE) e progesterona (RP) e a expressão do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-2) (ANDERSON, SCHWAB e MARTINEZ, 2014; ACS, 2015c). No Brasil, a periodicidade e a população-alvo para o rastreamento do câncer de mama são definidas pelo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), conforme tabela abaixo:

Tabela 2: Rastreamento do câncer de mama no Brasil.

População-alvo	Periodicidade dos exames
Mulheres de 35 anos ou mais com risco elevado	Exame clínico das mamas e mamografia anual
Mulheres entre 40 a 49 anos	Exame clínico das mamas anual e se houver alteração realizar mamografia
Mulheres entre 50 a 69 anos	Exame clínico das mamas anual e mamografia a cada dois anos

Fonte: Ministério da Saúde, 2013.

O exame clínico das mamas (ECM) é realizado pela inspeção estática e dinâmica, palpação das mamas e dos gânglios axilares e supraclaviculares (Figura 7) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). O ECM tem como finalidade observar e identificar alterações visuais nas mamas, como assimetrias, alterações no contorno da mama, ulcerações cutâneas, diferenças na cor da pele, textura e temperatura, além de verificar a

presença de nódulos palpáveis e a saída de secreção pelos mamilos (GUSSO e LOPES, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).



Figura 7: Exame clínico das mamas. Adaptado do Ministério da Saúde, 2013.

A mamografia consiste em uma imagem de raio-X da mama (ACS, 2015c; NOUNOU et al., 2015), e é a técnica mais indicada para diagnosticar o câncer de mama após os 35 anos de idade, pois a sensibilidade da mamografia é menor em mamas densas do que naquelas com predomínio de tecidos adiposos (CHALA e BARROS, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Segundo o American Cancer Society (ACS) (2015c), o rastreamento pela mamografia reduz em 20% o risco de morrer por câncer de mama.

A ultrassonografia, que também é um método de diagnóstico por imagem, é indicada a pacientes jovens e com mamas densas. Esse método auxilia na diferenciação entre lesões císticas ou sólidas, lesões palpáveis com mamografia negativa ou inconclusiva, em pacientes jovens com lesão palpável, em mulheres com alterações no exame clínico no ciclo grávido-puerperal, nas doenças inflamatórias e abscessos e nas coleções (CHALA e BARROS, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; BEDNARSKI et al., 2015).

A ressonância magnética (RM) da mama é outro método de diagnóstico por imagem de alta resolução, que utiliza campo magnético em vez de raio-X. É utilizada como um método complementar à mamografia e à ultrassonografia da mama, pois apresenta uma elevada sensibilidade para a detecção do câncer de mama, porém não deve substituir o rastreio por meio da mamografia (CHALA e BARROS, 2007; ACS, 2015c; NOUNOU et al., 2015). No Brasil, a RM é mais indicada nos casos em que os

métodos tradicionais deram resultados inconclusivos, em carcinoma oculto, para auxiliar no planejamento terapêutico, para a avaliação da resposta à quimioterapia neoadjuvante, para as suspeitas de recidivas e, por fim, para avaliar possíveis complicações dos implantes mamários (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A mamografia, a ultrassonografia e a RM da mama têm seus resultados classificados de acordo com o Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS®), conforme tabela 3 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Tabela 3: Categorias BI-RADS® para o exame mamográfico, sua interpretação e recomendação de conduta.

Categoria	Interpretação	Recomendação de conduta
0	Exame incompleto	Correlação com outros métodos de imagem e comparação com mamografia do ano anterior.
1	Exame negativo	Rotina de rastreamento de acordo com a faixa etária ou continuar a investigar se o ECM for alterado
2	Exame com achado tipicamente benigno	Rotina de rastreamento de acordo com a faixa etária
3	Exame com achado provavelmente benigno	Controle radiológico *
4	Exame com achado suspeito	Avaliação por exames cito ou histopatológicos
5	Exame com achado altamente suspeito	
6	Exame com achados cuja malignidade já está comprovada	Terapêutica específica em Unidade de Tratamento de Câncer

* Está indicado exame histopatológico nas lesões categoria 3 quando houver impossibilidade de realizar o controle; quando a lesão encontrada for concomitante à lesão suspeita ou altamente suspeita homo ou contralateral; ou em pacientes que tenham indicação para terapia de reposição hormonal. **Fonte:** Ministério da Saúde, 2013.

A biópsia da mama é o método definitivo para o diagnóstico do câncer de mama (NOUNOU et al., 2015), sendo a biópsia cirúrgica (excisional) o método considerado "padrão ouro". Porém, em tumores mamários em estádios avançados, a utilização de biópsias menos invasivas é uma alternativa no panorama do custo-efetividade para prover o diagnóstico antes da conduta terapêutica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Existem dois tipos de biópsias por agulhamento: a punção por agulha fina (PAAF), que é o método menos invasivo e remove células da mama e a biópsia percutânea com agulha grossa (PAG), que remove tecidos cilíndricos pequenos (NOUNOU et al., 2015). Há, ainda, a biópsia percutânea a vácuo, que utiliza um sistema de aspiração a vácuo e é guiado por raio-X, ultrassonografia ou RM, além da biópsia cirúrgica incisional, em que é retirada parte da lesão e a excisional, que retira toda a lesão da mama (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Todos os métodos de biópsias necessitam de estudo histopatológico, que deve descrever as características dos tumores de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em sua 4ª edição da classificação dos tipos histológicos do câncer de mama (Anexo I) (GOBBI, 2012).

Em relação aos receptores hormonais, os tumores são avaliados quanto à positividade ou não para RE e RP, e também quanto a superexpressão de HER-2 (ANDERSON, SCHWAB e MARTINEZ, 2014; ACS, 2015c). Com essa avaliação, o tumor é caracterizado molecularmente e é subclassificado de acordo com o sistema da Sociedade de Câncer (ACS, 2015c), conforme tabela 4.

Tabela 4: Caracterização dos subtipos dos tumores de mama.

Subtipo	Características moleculares e genéticas	Prevalência	Características clínicas
Luminal A	RE + e/ou RP+, HER2-, baixo Ki-67	74%	Crescimento lento; Menos agressivo; Baixa recorrência; Alta sobrevivência; Melhor prognóstico de todos os subtipos; Respondem à terapia endócrina.
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2+ (ou HER2 com alta de Ki67)	10%	Altas taxas de proliferação; Prognóstico pior do que Luminal A; Respondem à terapia endócrina.
HER-2	HER-2 + e RH-	4%	Tendem a crescer e a se espalhar de forma mais agressiva; Maior grau histológico; Pior prognóstico a curto prazo; Existem terapias específicas.
Triplo negativo	RE-, RP- e HER-2-	12%	Idade mais jovem no momento do diagnóstico; Mutações no gene BRCA1*; Alto grau histológico; As maiores taxas de recorrência à distância após a cirurgia; Mau prognóstico a curto prazo; Não tem terapias específicas.

* Não é exclusivo do tumor de mama triplo negativo, podendo ocorrer nos outros subtipos. **Fonte:** (ACS, 2015c).

Os tumores podem ainda ser classificados de acordo com o tamanho tumoral (T) em centímetros, o grau de envolvimento linfonodal (N) e o número de metástases à distância (M), todos no momento do diagnóstico por meio da Classificação de Tumores Malignos (TNM) (Anexo II) da União Internacional Contra o Câncer (UICC, 2002).

Assim, a conduta terapêutica para cada paciente baseia-se nos exames e classificações dos tipos de câncer de mama descritos anteriormente.

2.4 Microambiente tumoral

Vários processos estão envolvidos no crescimento tumoral, sendo eles, a manutenção da sinalização proliferativa, a evasão de sinais supressores do crescimento, a imortalidade celular e replicativa, a inflamação e a indução da angiogênese, invasão e metástase (Figura 8) (HANAHAN e WEINBERG, 2011; CHEN et al., 2017). Dentre esses processos, a angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos (neovascularização) a partir de vasos pré-existentes, responsável ainda pela remodelação e maturação desses novos vasos, é um importante evento para o desenvolvimento do tumor, estando envolvido no crescimento tumoral primário, na invasão e na metástase (FOLKMAN, 2007; CHU e WANG, 2012; WELTI et al., 2013).



Figura 8: Características de células tumorais. Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

O processo angiogênico pode ser fisiológico ou patológico. A angiogênese fisiológica acontece durante o desenvolvimento embrionário, ciclo menstrual e também durante o reparo de feridas, no qual é essencial o suprimento de oxigênio e de nutrientes (CONWAY, COLLEN e CARMELIET, 2001; BAUER, 2005; FOLKMAN, 2007). Esse processo complexo é regulado por meio de fatores pró e antiangiogênicos no organismo e, em condições normais, o organismo é capaz de manter o equilíbrio entre esses moduladores. Quando o organismo perde o controle sobre a formação de novos vasos sanguíneos, ocorrem estados patológicos, que chamamos de angiogênese patológica, podendo estar aumentada ou insuficiente (TONINI, ROSSI e CLAUDIO, 2003).

A maioria dos tumores sólidos, incluindo o câncer de mama, necessitam da neovascularização para suprir suas necessidades metabólicas e também para a disseminação do tumor e metástase (FOLKMAN, 2007). Além disso, a neovascularização fornece ao tumor uma rota para que as células cancerígenas alcancem a circulação sanguínea e, dessa forma, consigam desenvolver metástases à distância (LU et al., 2005).

Para que o processo angiogênico ocorra, existem vários fatores envolvidos, sendo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) um dos principais (LU et al., 2005; FOLKMAN, 2007; SAHARINEN et al., 2011). O VEGF é um dos responsáveis pela formação dos novos capilares sanguíneos e também linfáticos, além de estimular a permeabilidade vascular desses vasos quando ligado aos seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 (GASPARINI, 2000; CHU e WANG, 2012). Níveis elevados de VEGF são encontrados em mulheres com tumores mamários e estão associados à recorrência da doença, à ocorrência de metástase, à quimioresistência e também a piores prognósticos (GASPARINI, 2000; BYRNE, BOUCHIER-HAYES e HARMEY, 2005; LU et al., 2005; SAHARINEN et al., 2011).

Outro componente importante para o microambiente tumoral, são os macrófagos, que promovem o crescimento do tumor, a degradação da matriz, induzem a angiogênese e contribuem para a metástase, estando abundantemente presentes em todas as fases de progressão do tumor, incluindo no de mama (NOY e POLLARD, 2014; OSTUNI et al., 2015; GAN et al., 2016; CHEN et al., 2017). Existem dois tipos de macrófagos, o M1 e o M2, sendo esse último recrutado por células tumorais, sendo responsável por suprir as respostas inflamatórias promovendo a tumorigênese (QIAN e POLLARD, 2010; SICA e MANTOVANI, 2012; CHEN et al., 2017). Os macrófagos respondem a hipóxia tumoral aumentando a liberação de VEGF, além de orientar a migração desse fator para áreas do tumor sem vascularização (LEWIS et al., 2000; BINGLE, BROWN e LEWIS, 2002; OBEID et al., 2013; LIN et al., 2015). Chen et al. (2017) utilizando um modelo *in vivo* de carcinoma mamário com camundongos nude induzidos com células MDA-MB-231 ou MDA-MB-435, demonstraram que os níveis elevados de macrófagos M2 leva ao aumento dos níveis da proteína CHI3L1, promovendo metástase pela ativação dos receptores de interleucina 13 (IL-13). Além disso, a proteína CHI3L1 está relacionada a um mau prognóstico da doença, podendo ser um possível marcador para o diagnóstico do câncer de mama.

Juntamente com a angiogênese, a inflamação também contribui para o desenvolvimento tumoral, sendo mediada por citocinas pró e anti-inflamatórias (YASMIN et al., 2015). Dentre os fatores pró-inflamatórios, que desempenham um papel crucial na inflamação crônica, incluem-se os membros da superfamília das interleucinas, a metaloproteinase 9 (MMP-9) e a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), estando associados à modulação da apoptose, angiogênese, proliferação, invasão e metástase (YASMIN et al., 2015).

A COX-2 é uma enzima inflamatória indutível, e está presente no organismo apenas por estímulos inflamatórios (tabaco, álcool, trauma, corpos estranhos, toxinas, vírus, bactérias, etc.). De forma rápida, ela resulta na síntese de prostaglandinas (PGs), principalmente em prostaglandina E₂ (PGE₂), que modulam positivamente a resposta inflamatória (HARRIS, 2014a). Vários estudos elucidam a importância da COX-2, estando elevada em diferentes tipos de tumores, incluindo o câncer de mama (SINGH; LUCCI, 2002; SPIZZO et al., 2003; XU et al., 2016). Spizzo et al. (2003), estudando tumores mamários, relataram um papel crucial da COX-2 na angiogênese e na invasão tumoral. Neste mesmo contexto, outros autores associam a COX-2 com um pior prognóstico, maior tamanho do tumor e metástases (MIGLIETTA et al., 2010; SETIA, VAISH e SANYAL, 2012; XU et al., 2016), como também a importância da PGE₂ na recorrência de células malignas (CAO e PRESCOTT, 2002). Devido ao envolvimento com o desenvolvimento tumoral, o VEGF, os macrófagos e a COX-2, estão sendo estudados como um alvo potencial para o tratamento de tumores, incluindo o câncer de mama.

2.5 Tratamento e definição da conduta terapêutica do câncer de mama

Os tipos de tratamento para o câncer de mama atualmente incluem: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, anticorpos monoclonais e hormonioterapia (EBCTCG, 2005a; NOUNOU et al., 2015) e devem ser realizados em um contexto multidisciplinar (UENO et al., 2010; SANTA-MARIA et al., 2015; XU et al., 2015). A escolha do melhor tipo de tratamento baseia-se no estágio do tumor no momento do diagnóstico, no tamanho, na localização e nas características tumorais, na positividade para os receptores hormonais, na condição e desejo da paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; RUNOWICZ et al., 2015).

A cirurgia de câncer de mama tem como finalidade a remoção do tumor e a determinação do estágio da doença. Os tipos de cirurgia da mama são: cirurgia de conservação da mama, em que apenas o tumor e as margens de segurança são removidos; e a mastectomia simples ou radical, em que a mama toda e os linfonodos axilares são retirados, podendo ou não o músculo pequeno peitoral ser removido (AEBI et al., 2010; ACS, 2015c).

A radioterapia é o uso de radiação para destruir as células tumorais, podendo ser utilizada antes ou após a cirurgia. Antes da cirurgia é indicada para a redução do tamanho tumoral e após é indicada para destruir as células tumorais remanescentes. A radioterapia após a cirurgia conservadora da mama reduz em 50% o risco de recorrência da doença e em 20% o risco relativo de morte (EBCTCG, 2005b; ACS, 2015c). A radioterapia pode ser administrada externamente ou como braquiterapia, e a indicação vai depender do tipo e localização do tumor e também do desejo da paciente (ACS, 2015c).

A quimioterapia é o tratamento sistêmico do câncer e tem como objetivo reduzir a proliferação das células tumorais por meio da administração de medicações contínuas ou em intervalos regulares, podendo ser administradas para 3 finalidades. A quimioterapia neoadjuvante, realizada antes da ressecção tumoral. É indicada para diminuir o tamanho de tumores irresssecáveis no momento do diagnóstico. Essa conduta torna-os ressecáveis, melhorando o prognóstico da paciente. A quimioterapia adjuvante, realizada após o tratamento cirúrgico, tem a finalidade de aumentar o tempo livre de recorrência da doença. E, por fim, a quimioterapia paliativa, indicada nos casos em que se necessita reduzir os sinais e os sintomas que afetam a capacidade funcional do paciente, não refletindo, porem em sua sobrevida (BRASIL, 2015).

As combinações de medicamentos podem ser mais eficazes para o tratamento quimioterápico do câncer de mama do que um medicamento sozinho. A combinação mais utilizada atualmente é a de antraciclinas e taxanos. Com isso, o protocolo FAC é o mais frequentemente prescrito, que é a combinação de 500mg/m² de 5-fluorouracil, 50mg/m² de doxorrubicina e 500mg/m² de ciclofosfamida, via intravenosa, por 6 ciclos de 21 dias cada (ICESP, 2010).

No contexto dos anticorpos monoclonais, o trastuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado, que se liga ao HER-2, é indicado para as pacientes que expressam o receptor, melhorando significativamente a sobrevida global e a sobrevida

livre de recorrência (ULAS et al., 2015; WANG et al., 2015). A taxa de resposta do uso do trastuzumab em combinação com a quimioterapia fica em torno de 85% (BURSTEIN et al., 2001; ULAS et al., 2015).

Outro anticorpo utilizado no tratamento do câncer de mama é o bevacizumab, que se liga ao fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A). Estudos mostraram que o uso do bevacizumab em tumores de mama aumentam as taxas de resposta em cânceres metastáticos e em tratamentos neoadjuvantes, com benefício sobre a sobrevida livre da doença, porém sem benefícios significativos na sobrevida global (KÜMLER, CHRISTIANSEN e NIELSEN, 2014). Apesar de o FDA (Food and Drug Administration), a agência reguladora dos EUA, ter retirado seu registro para a utilização no câncer de mama, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) mantém seu registro liberado para o câncer de mama metastático ou recorrente, quando administrado em conjunto com paclitaxel (ANVISA, 2010).

A hormonioterapia também é indicada em pacientes que apresentam os receptores hormonais positivos. O tamoxifeno é o medicamento mais utilizado para os tumores de mama com receptores de estrogênio positivo e, a utilização por 5 anos, reduz a recorrência tumoral e a taxa de mortalidade pelo câncer de mama (JAGER et al., 2015). Porém, para muitas pacientes o uso do tamoxifeno não é indicado devido à resistência medicamentosa ou efeitos adversos graves. Dessa forma, a utilização dos inibidores de aromatase de terceira geração, como o anastrozol, letrozol ou exemestano, é mais indicada por terem melhor tolerabilidade (IWASE, 2008).

Com relação ao tipo de tratamento recebido, a ACS (2015c) afirma que 58% das mulheres diagnosticadas com câncer de mama, em estágios iniciais (I ou II), realizam cirurgia conservadora da mama, 36% mastectomia, 3% radioterapia ou quimioterapia sem a cirurgia e 2% não recebem nenhum tratamento. Já em mulheres com estágio avançado (III ou IV) da doença, 14% realizam cirurgia conservadora da mama, 58% mastectomia, 17% radioterapia ou quimioterapia sem a cirurgia e 11% não recebem nenhum desses tratamentos (ACS, 2015c). Segundo Van Dongen et al. (2000), a taxa de recorrência loco regional para pacientes pós mastectomia é de 12% e para pacientes com cirurgia conservadora da mama é de 20%.

Conforme descrito anteriormente, o câncer de mama tem uma alta taxa de incidência e de mortalidade, apesar do grande número de tratamentos disponíveis. Além disso, há muitos casos de recidiva da doença mesmo em pacientes que receberam algum

tipo de tratamento. Essas observações evidenciam a necessidade de pesquisar novos tratamentos ou tratamentos complementares com objetivo de melhorar ainda mais a sobrevida das pacientes com esse tipo de neoplasia.

2.5.1 *Euterpe oleracea* como proposta de tratamento do câncer de mama

A fruta *Euterpe oleracea*, mais comumente conhecida como açaí (Figura 9), é originária da América Central e do Sul, sendo encontrada em grandes quantidades na região Amazônica (LICHTENTHÄLER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006a). É consumida como alimento básico em muitas regiões do Brasil e também como planta medicinal e vem despertando interesse internacionalmente como alimento funcional, devido a seus benefícios nutricionais e de promessa terapêutica (KINGHORN et al., 2011; ULBRICHT et al., 2012).



Figura 9: Fruta Açaí (*Euterpe oleracea*). **Fonte:** www.portalamazonia.com.br

A polpa do açaí é composta de cerca de 48% de lipídios, 13% de proteína, 8% de aminoácidos, 25% de açúcares totais e quantidades menores de compostos como: fibras, vitaminas (A, B1, B2, B3, C e E) e diversos outros fitoquímicos, como as lignanas, os polifenóis (antocianinas, proantocianidinas e outros flavonóides), os esteróides e o resveratrol (SCHAUSS et al., 2006b; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; ULBRICHT et al., 2012). A tabela 5 lista os principais compostos fitoquímicos encontrados no açaí.

Tabela 5: Principais compostos fitoquímicos encontrados no açaí.

Compostos fitoquímicos	Referência
Antocianinas: Cianidina 3-glicosídeo; Cianidina 3-glucosídeo; Cianidina 3-rutinosídeo; Cianidina 3-sambubiosídeo; Peonidina 3-glicosídeo; Peonidina 3-rutinosídeo.	(SCHAUSS et al., 2006b; JENSEN et al., 2008; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; ULBRICHT et al., 2012)
Flavonóides: Homoorientina; Orientina; Taxifolina deoxihexose; Isovitexina; Scoparin.	(DEL POZO-INSFRAN, PERCIVAL e TALCOTT, 2006; SCHAUSS et al., 2006b; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; ULBRICHT et al., 2012)
Proantocianidinas: Epicatequina; Catequina; Procianidinas diméricas do tipo B	(ULBRICHT et al., 2012)
Esteróides: β -sitosterol; Campesterol; Sigmasterol	(SCHAUSS et al., 2006b; ULBRICHT et al., 2012)
Ácidos graxos: Ácido oleico; Ácido palmítico; Ácido linoleico.	(SCHAUSS et al., 2006b; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; ULBRICHT et al., 2012)
Lignanas: Isolariciresinol; 5-metóxi-isolariciresinol; Lariciresinol; Pinoresinol; Siringaresinol.	(CHIN et al., 2008; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011)

Segundo Hogan et al. (2010), o extrato de açaí apresenta um teor de compostos fenólicos totais de 312 mg equivalentes de ácido gálico por grama, de flavonoides de 124 mg equivalentes de rutina e de antocianinas de 100 mg equivalentes cianidina 3-glicosídeo por grama. Em 2014, Silva et al. observaram uma maior concentração de polifenóis no extrato da semente do açaí, com 28,3%, seguido pelo extrato total do fruto com 25,5% e pelo extrato da casca com 15,7%.

Além das propriedades de seus macronutrientes, as ações farmacológicas do açaí estão ligadas a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, efeitos cardioprotetores e anticancerígenos (HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; SILVA et al., 2014). A atividade antioxidante atribuída ao açaí está associada a seus componentes polifenóis, como por exemplo, as antocianinas (DEL POZO-INSFRAN, PERCIVAL e TALCOTT, 2006; JENSEN et al., 2008; ULBRICHT et al., 2012), sendo elas cianidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-diglucoside e cianidina 3-glucosido (JENSEN et al., 2008) e também as formas conjugadas, como o glucuronato, o sulfonato, a aglicona e o metilato (DEL POZO-INSFRAN, PERCIVAL e TALCOTT, 2006; ULBRICHT et al., 2012). São descritos ainda os flavonoides, como o orientina, o homoorientina, a vitexina, a luteolina, o chrysoeriol, a quercetrina, o di-hidrocaempferol (KANG et al., 2010) e lignanos, mais especificamente o pinoresinol e as proantocianidinas, como componentes

responsáveis pela ação antioxidante do açaí (CHIN et al., 2008; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011).

A ação anti-inflamatória do açaí está relacionada aos seus compostos flavonoides (ULBRICHT et al., 2012). Em um estudo *in vitro* com linhagem de macrófagos J774A.1, o açaí apresentou uma atividade inibidora para as enzimas COX-1 (ciclo-oxigenase 1) e COX-2, assim como inibiu a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) mesmo na dose mais baixa de 0,1ppt (SCHAUSS et al., 2006a).

Os efeitos cardioprotetores do açaí estão ligados aos componentes fitoquímicos como polifenóis, flavonoides (RIBEIRO et al., 2010), carotenoides, ácidos fenólicos e ácidos linoleicos (HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011).

A atividade antitumoral do açaí está associada a seus compostos fitoquímicos, como por exemplo, polifenóis, ácidos fenólicos, glicosídeo, aglicona, flavonoides (DEL POZO-INSFRAN, PERCIVAL e TALCOTT, 2006; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; SILVA et al., 2014), antocianinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, peonidina-3-(6''-malonil)glicosídeo e delphinidina-3-(6''- acetil)-glicosídeo, proantocianidinas (HOGAN et al., 2010; STONER et al., 2010; SILVA et al., 2014), elagitaninos (ULBRICHT et al., 2012) e lignanos (HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011).

Recentemente, estudos, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado a eficácia do açaí como um agente anticancerígeno (STONER et al., 2010; HORIGUCHI et al., 2011; FRAGOSO et al., 2012, 2013; DIAS et al., 2014; SILVA et al., 2014). Considerando o efeito do açaí em modelos *in vitro* para o estudo do câncer, frações polifenólicas da polpa do açaí demonstraram reduzir a proliferação das células leucêmicas HL-60, provavelmente pelo aumento da apoptose via caspase-3 ativada (DEL POZO-INSFRAN, PERCIVAL e TALCOTT, 2006).

Em modelo experimental, *in vivo*, utilizando roedores com progressão patológica relacionada ao câncer de esôfago, foi demonstrado que a polpa do açaí pode atenuar a proliferação celular e o tamanho dos tumores a partir da diminuição dos níveis de interleucina 5 (IL-5) e GRO/KC (análogo humano do rato para interleucina 8) e regulação positiva dos níveis de interferon-gama (IFN γ) (STONER et al., 2010).

Outro estudo, também utilizando modelo de roedores com câncer de bexiga, demonstrou que o açaí reduziu a proliferação celular tumoral e o dano ao DNA (ácido desoxirribonucleico), devido a atenuação do antígeno nuclear da proliferação celular

(PCNA) e da proteína p63, mostrando ser um potente agente antioxidante, além de ter ação anticarcinogênica (FRAGOSO et al., 2012). O mesmo grupo evidenciou em outro estudo com o açaí, utilizando modelo de câncer de cólon em roedores, a redução do número e da multiplicidade dos tumores e também da proliferação celular em decorrência da redução das proteínas β -catenina e conexina-43 e dos índices de Ki-67 e caspase-3 (FRAGOSO et al., 2013).

Ainda no carcinoma de cólon, um estudo *in vitro*, demonstrou que o açaí inibiu o crescimento celular e reduziu a ROS. Além disso, reduziu proteínas pró-oncogênicas pela regulação negativa do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B), da molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1), da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), do VEGF, do gene Bcl-2 e da proteína survivina. A ativação da via mitocondrial pró-apoptótica deu-se pelo aumento da liberação de proteína do citocromo c, diminuição da poli(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) e clivagem da caspase-3, evidenciando a atividade anti-inflamatória e citotóxica do açaí em tais células (DIAS et al., 2014).

Recentemente, Silva et al. (2014), demonstraram a ação do açaí em um estudo *in vitro* com linhagem de células de carcinoma mamário humano, que diminuiu a viabilidade celular, modificou as características morfológicas das células, pela presença de corpos densos em elétrons e vacúolos autofágicos no citoplasma de células MCF-7 e induziu a autofagia a partir do aumento na expressão de LC3B-II, mostrando o potencial antitumorigênico do açaí.

Outro estudo em ratos sadios demonstrou o efeito cardioprotetor do açaí, administrado em conjunto com a doxorrubicina, um agente antitumoral já empregado na clínica médica e que apresenta efeitos adversos, sendo o principal deles, a cardiotoxicidade. A combinação com o açaí apresentou diminuição dos efeitos adversos de cardiotoxicidade da doxorrubicina, mostrando que ele pode atuar como um coadjuvante no tratamento do câncer diminuindo tais efeitos (RIBEIRO et al., 2010).

Recentemente, Marques et al. (2016), testaram o açaí em três doses diferentes (30, 100 e 300 mg/kg), administrado via gavagem durante 14 dias, em ratos Wistar. Os resultados do ensaio cometa e micronúcleo mostraram que as doses testadas de açaí não foram capazes de causar efeitos tóxicos nas células de leucócitos, testiculares, fígado e medula óssea dos ratos em estudo, concluindo que o açaí não promove efeitos genotóxicos nas células analisadas (MARQUES et al., 2016).

Diante dessas considerações, que comprovam que o açaí apresenta efeitos benéficos à saúde, devido sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e antigenotóxica, e avaliando sua eficácia em estudos *in vitro* e *in vivo* de células tumorais, pesquisas em torno do uso do extrato de açaí tornam-se relevantes na busca de novos tratamentos para o câncer de mama.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é a segunda localização neoplásica mais comum no mundo, o tipo mais frequente e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. Por ser uma doença heterogênea, o tratamento torna-se muitas vezes ineficaz porque depende das características do tumor e também da resposta individual das pacientes ao tratamento. Além disso, a quimioterapia e a radioterapia apresentam muitos efeitos adversos, o que dificulta a adesão ao tratamento. Assim, considerando-o um problema de saúde pública, existe a necessidade de estudos abrangentes nessa área.

Em um estudo *in vitro* com linhagens de células de carcinoma mamário humano, o extrato de açaí apresentou um potencial antitumorigênico, pela redução da viabilidade celular e da alteração das características morfológicas, porém ainda não foi testado em modelos experimentais *in vivo*. Nesse contexto, os resultados promissores em relação a atividade antitumoral do açaí, já observados em estudos *in vitro* com câncer de mama, além do baixo custo aquisitivo e da provável ausência de efeitos adversos, justificam a utilização do extrato do açaí como um agente terapêutico complementar para o tratamento do câncer de mama.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito farmacológico e tóxico do extrato do fruto total de *Euterpe oleracea* em um modelo experimental de câncer de mama.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Estabelecer um modelo experimental, *in vivo*, de carcinoma mamário utilizando um indutor químico.

- Confirmar macroscopicamente e microscopicamente o tumor mamário em modelo experimental, caracterizando morfológicamente as lesões tumorais;
- Avaliar a distribuição e os níveis do fator pró-angiogênico VEGF;
- Estudar o perfil hematológico e a contagem de macrófagos ativos;
- Quantificar os níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) e interleucina 10 (IL-10);

4.2.2 Avaliar o efeito farmacológico e a toxicidade do extrato de *Euterpe oleracea* em modelo experimental de câncer de mama.

- Realizar a análise macroscópica e microscópica da manutenção e do desenvolvimento dos tumores mamários;
- Caracterizar morfológicamente as lesões tumorais após o tratamento com açaí;
- Avaliar a distribuição do VEGF, do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (FLK), da MMP-9 e COX-2;
- Quantificar as concentrações de VEGF, PGE₂, IL-10, óxido nítrico (NO) e macrófagos ativos;
- Avaliar o estado nutricional, os níveis glicêmicos e o perfil hematológico dos animais;
- Avaliar o efeito protetor do extrato de açaí no estabelecimento do carcinoma mamário utilizando o indutor químico DMBA (7,12-dimetil benzo antraceno).

5. METODOLOGIA

5.1 Estabelecimento de modelo experimental de câncer de mama em Ratas Wistar, utilizando um indutor químico

O modelo experimental de câncer de mama foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO) com o número de protocolo 008/2014 (Anexo III).

Os animais do estudo foram acondicionados em gaiolas de polietileno e mantidos sob condições controladas de temperatura (20-24°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas cada, com água e ração de livre demanda.

Foram utilizados no modelo 73 ratas Wistar, com 8 semanas de idade e pesando em torno de 150-200 gramas. A indução tumoral foi estabelecida conforme descrito anteriormente por Deepalakshmi e Mirunalini (2013) e Cerqueira-Coutinho et al. (2016 – ANEXO IV), administrando uma única dose de 25mg/kg de DMBA, via subcutânea na glândula mamária de ratos fêmeas Sprague-Dawley com 7 semanas de idade. Após 16 semanas, observou-se o estabelecimento de 100% do carcinoma mamário com um volume tumoral médio de 18,32cm³ e desvio padrão de 1,5cm³, com superexpressão de receptores de estrogênio, e a histologia mostrou o aumento da atividade mitótica.

Para a indução tumoral, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de 0,1ml de xilazina 2% e 0,2 ml de ketamina. Em seguida, foram pesados e submetidos à tricotomia no quadrante inferior direito, deixando a quinta mama à direita à mostra. Foi aplicada uma injeção subcutânea nessa mama, com uma seringa de 1 ml e agulha de 13 x 4,5 mm em uma única dose de 25 mg/kg de DMBA em 0,5 ml de emulsão de óleo de girassol e 0,5 ml de solução salina, conforme ilustrado na figura 10.



Figura 10: Indução via subcutânea de câncer de mama com DMBA em ratas Wistar.

Os animais foram avaliados semanalmente, por um tempo total de 16 semanas. Em relação ao peso, utilizando balança digital e quanto ao aparecimento dos tumores, pela apalpação das mamas.

5.1.1 Peso dos animais durante a indução tumoral

Após a indução tumoral, os animais foram pesados em uma balança semi-analítica (S2202 – Bel Engineering, Piracicaba, SP) semanalmente, tendo um total de 16 aferições por animal. Após as pesagens, os resultados foram colocados em uma planilha Excel para realização da curva de pesos dos animais e análises estatísticas.

5.1.2 Caracterização morfológica dos tumores mamários

No tempo determinado de 16 (n = 20) semanas após a indução tumoral, os animais foram eutanasiados para avaliação macroscópica dos tumores e foram fotografados em câmera digital (EOS Rebel T3 – Nikon, Tóquio, Japão) a uma distância de 15 cm dos tumores, e essas foram colocadas no software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para calcular a área do tumor. A maior área do tumor obtida foi considerada como 100% e o restante das áreas calculadas por regra de três (fórmula abaixo), obtendo, assim, a porcentagem da área tumoral para cada animal.

$$\begin{array}{lcl} \text{Fórmula:} & \text{Maior área tumoral} & - & 100\% \\ & \text{Demais áreas tumorais} & - & x \end{array}$$

As amostras de tumores mamários e de pele da mama foram coletadas para análise histológica com coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e para o estudo imunohistoquímico. Foram coletadas, ainda, amostras de sangue e de lavado peritoneal para análises hematológicas e bioquímicas, respectivamente.

5.1.3 Estudo imunohistoquímico

Para o estudo de crescimento de novos vasos sanguíneos foi realizada imunomarcagem para identificação de VEGF, seguindo o protocolo abaixo descrito por Machado et al. (2014 - ANEXO V).

As lâminas foram desparafinizadas com 3 banhos de álcool por 30 minutos cada e após foram realizados 3 banhos com xilol por 30 minutos cada, seguidos de um banho com água destilada por 5 minutos. Foi realizada então a recuperação antigênica com tampão citrato 0,01M, com o pH 6,0 no micro-ondas. Após a fervura do tampão, as lâminas foram colocadas por 5 minutos nesse tampão. As lavagens entre as várias etapas foram feitas com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4) em temperatura ambiente em 2 banhos de 5 minutos cada. Após isso, a inativação da peroxidase endógena foi realizada com peróxido a 3% por 15 minutos em temperatura ambiente, seguida de 2 banhos com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4), em temperatura ambiente, por 5 minutos cada. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% por 30 minutos em câmara úmida. Os cortes foram então incubados com anticorpo primário monoclonal anti-VEGF (SC 57496 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 1:100, diluídos em PBS/BSA 1% em câmara escura e úmida overnight. Para o controle negativo foi utilizado apenas o PBS/BSA 1% sem o anticorpo monoclonal. Após 2 banhos com tampão fosfato em temperatura ambiente por 5 minutos cada, os cortes foram incubados com anticorpo secundário Biotina (K 0690 – DAKO Corporation, Carpinteria, CA) e Estreptavidina (K 0690 – DAKO Corporation, Carpinteria, CA) por 30 minutos cada com dois banhos com tampão fosfato em temperatura ambiente por 5 minutos cada entre os anticorpos. Os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB) (K 3468 – DAKO Corporation, Carpinteria, CA), ficando o tempo necessário para se obter uma coloração castanha, seguido de um banho de água destilada por 2 minutos e contrastados com Hematoxilina por 5 minutos e, em seguida, colocados em água corrente por 2 minutos. Por fim, os cortes foram hidratados em 2 banhos de álcool 90% e 100%, clarificados em xilol I, II e III em banhos de 5 minutos cada, e montados com lamínula e Entellan para posteriormente serem observados em microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão).

5.1.4 Estudo histomorfométrico

A observação microscópica dos cortes das lesões da mama das ratas, marcados com VEGF foi realizada conforme descrito anteriormente por Machado et al. (2014), utilizando um microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão), fotografando com câmera digital (Coolpix 990 – Nikon, Tóquio, Japão) e, posteriormente, fazendo a análise em

programa de análise de imagem Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Em cada lâmina foram analisados 10 campos aleatórios de maior aumento (40X), utilizando a média dos resultados obtidos. A contagem das áreas marcadas com VEGF foi correlacionada com as áreas demarcadas (per área), expressas em porcentagem.

5.1.5 Citometria de fluxo

Para a coleta do lavado peritoneal foi utilizada uma seringa de 10 ml com agulha 25 x 0,7 mm, 10 ml de PBS e tubo falcon de 15 ml. O procedimento foi realizado introduzindo no peritônio das ratas, 10 ml de PBS, aguardando alguns segundos e aspirando o líquido em seguida.

Após a coleta, o material foi colocado em tubo falcon, sendo centrifugado por 5 minutos em uma rotação de 1200 rpm, sendo desprezado o sobrenadante. Ao pellet formado foram adicionados 2 ml de paraformaldeído (PFA) a 4% e mantido em geladeira.

Para a análise das amostras foi utilizado o protocolo descrito por Machado et al. (2014). A amostra foi centrifugada por 5 minutos em uma rotação de 10.000 rpm, e descartado o sobrenadante. O pellet foi ressuspendido em 300 µl de PBS/BSA, o qual foi separado em dois tubos falcon: um tubo para o controle, com 200 µl e o outro com 100 µl para o teste, deixando-os por 30 minutos. Após, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a uma rotação de 10.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. No tubo para o teste, foi colocado 99 µl de PBS e 1 µl do anticorpo F4-80 (BM8 FITC – Abcam, Cambridge, EUA), deixando incubar por 30 minutos. Decorrido o tempo, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a uma rotação de 10.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspendido mais uma vez em 300 µl de PBS/BSA, centrifugado por 5 minutos em uma rotação de 10.000 rpm, sendo descartado o sobrenadante.

A amostra foi, então, incubada com o segundo anticorpo, com 99 µl de PBS e 1 µl do anticorpo Mac-2+ (I2211 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e deixado por 30 minutos, sendo posteriormente centrifugado por 5 minutos em uma rotação de 10.000 rpm e descartado o sobrenadante. O pellet foi ressuspenso em 300 µl de PBS/BSA, centrifugado por 5 minutos em uma rotação de 10.000 rpm e o sobrenadante foi novamente descartado. Por fim, foi adicionado 500 µl de PBS em cada tubo e

colocado no citômetro (FACSCalibur, BD Biosciences, EUA) para a leitura. Foram contados 10 mil eventos por animal e os resultados analisados no programa CellQuest (BD Biosciences, USA).

5.1.6 Imunoensaio Enzimático

Para essa análise, foi utilizado também o lavado peritoneal, coletado da mesma forma que descrito no item anterior, porém centrifugado por 10 minutos a uma rotação de 4000 rpm até 30 minutos depois da coleta. Após a centrifugação, o sobrenadante foi dividido em eppendorf de 1,5 ml com 1 ml da amostra em cada eppendorf, devidamente identificado e acondicionado no freezer de -80°C até o momento da análise.

As amostras foram quantificadas por Imunoensaio Enzimático (ELISA) utilizando kits comerciais para dosar às concentrações de VEGF (kit Mouse VEGF-A da Thermo Scientific, Waltham, MA), PGE₂ (kit PGE-2 monoclonal EIA da Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) e IL-10 (kit Mouse IL-10 da Thermo Scientific, Waltham, MA), seguindo as recomendações do fabricante. Esse método baseia-se no princípio da competição por anticorpo monoclonal específico. Para realização de cada ensaio, as amostras de lavado peritoneal foram descongeladas e homogeneizadas, em seguida, procedeu-se para cada ensaio os protocolos descritos abaixo.

Para a dosagem das concentrações de VEGF foi utilizado 100 µl da amostra e 100 µl de diluente A por poço, enquanto que para o controle foi utilizado apenas o diluente A, em seguida a placa foi coberta com plástico filme e deixando incubar por 2,5 horas em temperatura ambiente com suave agitação. Após incubação foi desprezado o conteúdo dos poços e realizada a lavagem. Foi colocado em cada poço 100 µl de solução biotinilado de anticorpo anti-VEGF e deixado incubar durante 1 hora em temperatura ambiente com uma suave agitação. Foi novamente desprezada a solução dos poços e realizada a lavagem com tampão de lavagem. Em seguida, adicionado 100 µl da solução de Streptavidina-HRP a cada poço, a placa foi incubada por 45 minutos em temperatura ambiente com uma suave agitação, desprezando o conteúdo dos poços e realizando a lavagem com tampão de lavagem. Em cada poço foi colocado 100 µl do agente revelador de cor TMB, deixando incubar no escuro (envolto em papel alumínio) em temperatura ambiente e com uma suave agitação por um período de 30 minutos. Após a incubação, a placa foi lida no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular

Devices Corporation, Sunnyvale, CA) na absorvância de 450 nm, gerando automaticamente as concentrações de VEGF em uma curva de calibração, com um coeficiente de correlação sempre maior ou igual a 0,98, utilizando-se para isso o programa SoftMax (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, CA). O limite de quantificação foi de 2 pg/ml e o ponto mais alto da curva foi de 1000 pg/ml.

Para dosagem dos níveis de PGE₂, cada poço da placa, foi colocado um volume de 50 µl de amostra, realizando-se no mínimo duas diluições em triplicata, 50 µl de PGE-2 AChE Tracer e mais 50 µl de PGE-2 anticorpo monoclonal. A placa foi então coberta com plástico filme e incubada a 4 °C durante 18 horas. Após a incubação, os poços foram esvaziados e lavados com tampão de lavagem. Foram adicionados 200 µl de reagente Ellman na placa, colocando-a no agitador durante 60-90 minutos. Decorrido o tempo, a placa foi lida no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) na absorvância de 405 nm, gerando automaticamente as concentrações de PGE-2 em uma curva de calibração, com um coeficiente de correlação sempre maior ou igual a 0,98, utilizando-se para isso o programa SoftMax (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, CA). O limite de quantificação foi de 7,8 pg/ml e o ponto mais alto da curva foi de 1000 pg/ml.

Para as dosagens de IL-10, em cada poço da placa, foi colocado um volume de 50 µl de amostra, realizando-se no mínimo duas diluições em triplicata, 50 µl de tampão de lavagem e mais 50 µl do anticorpo IL-10. A placa foi então coberta com plástico filme e incubada em temperatura ambiente durante 3 horas. Decorrido o tempo de incubação, os poços foram esvaziados e lavados com tampão de lavagem, sendo adicionados 50 µl de reagente de Anticorpo Biotinilado em cada poço e cobrindo a placa com plástico filme e deixando incubar em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, os poços foram novamente esvaziados e lavados com tampão de lavagem, sendo adicionados 100 µl de solução de Streptavidina-HRP em cada poço e cobrindo-se novamente a placa com plástico filme e deixando-a incubando em temperatura ambiente por 30 minutos. O conteúdo da placa foi desprezado e a lavagem foi realizada com tampão de lavagem. Colocou-se, então, 100 µl de solução de substrato TMB em cada poço, incubando no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. Após os 30 minutos, foram adicionados 100 µl de Solução de Paragem a cada poço. Decorrido o tempo, a placa foi lida no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) na absorvância de 450 nm, gerando automaticamente as

concentrações de IL-10 em uma curva de calibração, com um coeficiente de correlação sempre maior ou igual a 0,98, utilizando-se para isso o programa SoftMax (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, CA). O limite inferior de detecção foi de 37 pg/ml e o ponto mais alto da curva foi de 3000 pg/ml.

5.1.7 Esfregaço sanguíneo e análise hematológica (série branca)

No tempo determinado de 16 semanas, durante a eutanásia dos animais, foi coletada uma amostra de 5 ml de sangue diretamente do coração das ratas com uma agulha 13 x 4,5 mm e seringa de 5 ml. O sangue coletado de cada animal foi passado para uma lâmina de esfregaço sanguíneo, devidamente identificada, colocando uma gota de sangue na parte superior da lâmina. Com o auxílio de outra lâmina em um ângulo de 45° foi realizado um movimento para frente de modo que a gota fosse carregada por toda a lâmina, formando uma camada delgada e uniforme. Após a fixação em temperatura ambiente foi realizada a coloração com o kit Panótico rápido (620529 – Laborclin, Pinhais, PR), imergindo cada lâmina por 2 segundos, 3 vezes consecutivas em cada solução (solução 1, 2 e 3). Posteriormente, foi feita a contagem das células brancas em microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão), apresentando os resultados em porcentagem.

5.2 Avaliação do efeito farmacológico do extrato de *Euterpe oleracea* em modelo experimental de carcinoma mamário

Um dia antes da indução do carcinoma mamário, foi iniciado o tratamento dos animais utilizando o extrato do fruto total de *Euterpe oleracea* (Cód.: 120.044.032), obtido em forma de pó liofilizado da empresa Liotécnica Tecnologia em Alimentos (Embu, São Paulo - SP). A posologia utilizada foi de 200mg/kg do extrato de *Euterpe oleracea*, administrado via gavagem, diariamente, conforme dose utilizada anteriormente por da Costa et al. (2012); Machado et al. (2016), por um período total de 16 semanas. O extrato de açaí foi diluído em 0,6 ml de solução salina. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo 1 (controle), que recebeu apenas solução salina (n= 20), via gavagem e grupo 2, que foi tratado com o extrato de *Euterpe oleracea*, diluído em solução salina (n= 20).

Após as 16 semanas de tratamento diário foram realizadas eutanásias nos animais em estudo para a realização de análises macroscópica, histológica e bioquímicas, além do estudo imunohistoquímico e do ensaio imunoenzimático. As amostras de tumores mamários e da pele da mama foram coletadas para as análises macroscópicas, histológica pela coloração de HE, imunohistoquímicas para a distribuição do VEGF, FLK, MMP-9 e COX-2. Para as análises bioquímicas (citometria de fluxo e ensaio imunoenzimático) foram coletados o lavado peritoneal. A coleta das amostras foi realizada nos dois grupos de animais em estudo: o grupo controle e o tratado com o extrato de açaí.

As amostras retiradas após as 16 semanas de tratamento com o extrato de açaí, para a realização do estudo histomorfométrico, da citometria de fluxo e do método de ELISA, seguiram os mesmos protocolos empregados no estabelecimento do modelo experimental de câncer de mama descritos acima no item 5.1.1.

5.2.1 Estudo imunohistoquímico

Foram realizadas imunomarcações para VEGF (SC-57496 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), FLK (SC-6251 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), MMP-9 (SC-6840 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e COX-2 (SC-1747 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), conforme protocolo descrito acima no subitem 5.1.1.4, apenas alterando o anticorpo primário para uma dessas imunomarcações.

5.2.2 Análise da produção de Óxido Nítrico

A análise de produção de óxido nítrico foi realizada conforme descrito por Green et al. (1982), e consiste na detecção de nitrito (NO_2^-), resultante da oxidação do NO dos sobrenadantes das amostras coletadas. Para essa análise, foram utilizados 5ml do lavado peritoneal coletado. O material foi colocado em um tubo falcon, devidamente identificado, centrifugado por 5 minutos em uma rotação de 1200 rpm, desprezando o sobrenadante. Ao pellet formado após a centrifugação foram adicionado 2 ml de PFA, sendo mantido no freezer a -20°C até a análise.

Para a dosagem de NO, as amostras foram descongeladas, centrifugadas por 5 minutos a uma rotação de 1200 rpm. O sobrenadante foi misturado na proporção de 1 ml de sobrenadante para 1 ml de reagente de Griess (1 volume de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% em água deionizada com igual volume de 0,1% N-[1-naftil] etilenodiamina em água deionizada). Foram colocados 50 µl da mistura em cada poço da placa em triplicata, deixando incubar por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi lida em um leitor de ELISA SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) a uma absorbância de 540 nm e a quantificação da produção de NO foi baseada em uma curva padrão de nitrito de sódio em PBS (0 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM e 100 µM).

5.3 Avaliação da toxicidade do extrato de *Euterpe oleracea* em modelo experimental de câncer de mama

A avaliação toxicológica de uma substância tem como objetivo identificar possíveis efeitos nocivos desencadeados nos seres humanos, devido à uma exposição pelas diferentes vias. Com isso, os modelos animais são os mais utilizados nos estudos de toxicidade e nos processos investigativos. Os testes toxicológicos são complementares aos testes biológicos, sendo necessários para a liberação em humanos (CAZARIN, CORRÊA e ZAMBRONE, 2004; BEDNARCZUK et al., 2010).

As análises do peso dos animais seguiram o mesmo protocolo descrito anteriormente no subitem 5.1.1.2, sendo pesados 1 vez por semana.

5.3.1 Níveis glicêmicos

Os níveis glicêmicos foram dosados no aparelho portátil, G-Tech Free (SD Biosensor Inc, Accumed Produtos Médicos Hospitalares, Duque de Caxias, RJ), utilizando uma gota de sangue de cada animal e seguindo as recomendações do fabricante. O método de ensaio deste equipamento é baseado na enzima glicose oxidase e a faixa de resultados podem variar entre 10 e 600 mg/dL (0,6 a 33,3 mmol/L). Todos os resultados foram anotados em uma planilha Excel para as análises estatísticas.

5.3.2 Análise dos órgãos

Foram retirados de cada animal, no dia da eutanásia, os seguintes órgãos: coração, fígado e rins. Cada órgão foi analisado macroscopicamente, com parâmetros de comprimento e largura e, histologicamente, com coloração de HE.

5.4 Análise estatística

Para as análises estatísticas e para os gráficos, foi usado o programa Primer e o *Oringin Graph*. Os dados foram representados em tabelas e gráficos, informando a Média, o Desvio Padrão (DP), conforme teste estatístico empregado. Para comparação das variáveis entre os diferentes tratamentos, foi utilizado o teste *t* de Student, enquanto que os dados categóricos foram expressos em porcentagem e avaliados pelo teste Qui-quadrado de Person (X^2). As curvas de sobrevida foram estimadas utilizando o método do produto limite de Kaplan-Meier, utilizando o programa SPSS 13.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois) e o p-valor obtido pelo teste de log-rank. Para todas as variáveis foi considerando um $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Estabelecimento do modelo experimental de câncer de mama

Após 16 semanas da indução tumoral, o percentual de animais induzidos com DMBA que desenvolveram o carcinoma mamário, bem como os óbitos que ocorreram após indução com DMBA foi de 93,2% e 43,8%, respectivamente. A figura 11 ilustra o número de animais que foram induzidos com o carcinógeno DMBA (N= 73), para o estabelecimento do modelo experimental de câncer de mama, os animais que desenvolveram o tumor mamário (N= 68), assim como os que vieram a óbito em função de abscesso tumoral (N= 32).

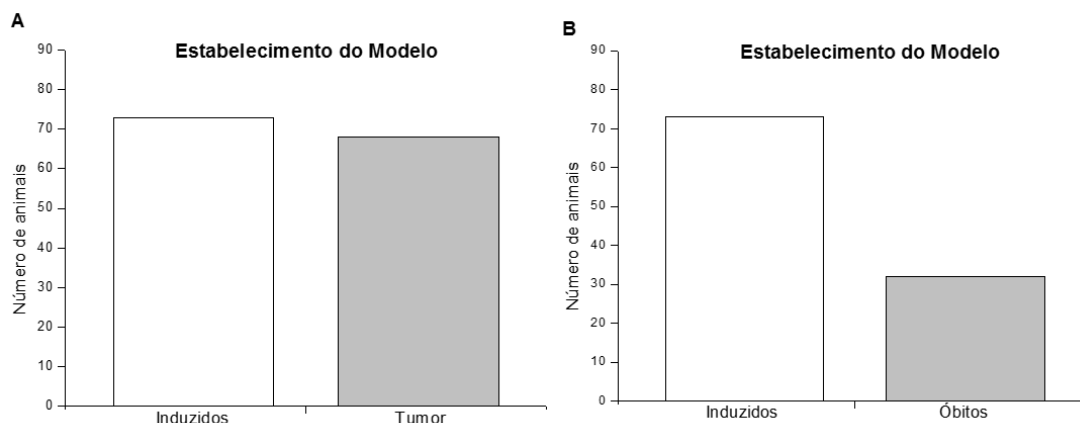


Figura 11: (A) Número de animais induzidos com DMBA (N= 73) para o estabelecimento do modelo experimental de câncer de mama e os animais que desenvolveram o tumor mamário (N= 68) após 16 semanas de indução tumoral. (B) Número de animais induzidos com DMBA (N= 73) e o número de animais que tiveram óbito em função de abscesso tumoral (N= 32).

6.1.1 Peso dos animais durante a indução tumoral

Foi avaliado semanalmente o peso dos animais durante todo o período de indução tumoral e notou-se uma leve diminuição no peso corporal durante todo o estabelecimento nos animais induzidos com DMBA quando comparados aos animais não induzidos. Apenas na 14^a e 15^a semanas essa diferença foi estatisticamente significativa (Figura 12 e Tabela 6).

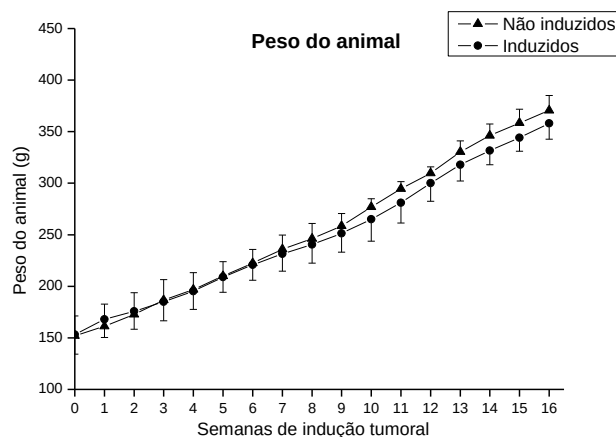


Figura 12: Peso corporal das ratas não induzidas (N = 10) e induzidas com DMBA (N = 10) durante as 16 semanas de estabelecimento do carcinoma mamário. A partir da 9ª semana de indução verificou-se uma redução, não significativa, no peso dos animais que receberam DMBA, porém na 14ª e 15ª semana essa diferença foi significativa ($P = 0,020$ e $0,026$, pelo teste T).

Tabela 6: Peso corporal das ratas não induzidas e induzidas com DMBA durante as 16 semanas de indução tumoral.

Semanas de Indução tumoral	Não induzido (N = 10)	Induzido (N = 10)	<i>P</i> -valor ^a
0	151,943 ± 19,366	153,263 ± 19,075	0,880
1	161, 279 ± 21,374	167,899 ± 17,449	0,458
2	172,667 ± 21,180	175,844 ± 17,430	0,718
3	186,580 ± 19,833	185,045 ± 18,493	0,860
4	196,876 ± 16,469	195,300 ± 17,628	0,839
5	210,051 ± 13,834	209,043 ± 14,811	0,877
6	222,510 ± 13,276	220,758 ± 14,813	0,784
7	236,010 ± 13,765	231,515 ± 16,843	0,522
8	246,303 ± 14,637	240,495 ± 18,084	0,440
9	258,555 ± 12,037	251,262 ± 18,058	0,302
10	276,916 ± 8,082	265,160 ± 21,308	0,120
11	294,486 ± 7,082	281,126 ± 19,751	0,059
12	309,726 ± 6,118	300,088 ± 17,656	0,120
13	330,406 ± 10,686	318,007 ± 15,953	0,056
14	346,116 ± 11,375	331,697 ± 13,766	0,020
15	358,438 ± 13,232	344,146 ± 13,147	0,026
16	370,551 ± 14,629	358,104 ± 15,407	0,080

^a Teste T.

6.1.2 Caracterização morfológica dos tumores mamários

O estabelecimento tumoral foi confirmado após 16 semanas da indução pela avaliação macroscópica e histológica. Verificou-se que os animais não induzidos (Figura 13 A e B) apresentaram o músculo da parede peritoneal íntegro e sem presença de alterações. Já nos animais induzidos com DMBA (Figura 13 C e D) foi possível observar a presença de uma massa cística sólida com muita fibrose e aderências, além de exsudato inflamatório no local da indução tumoral.



Figura 13: Análise macroscópica da região abdominal das ratas após 16 semanas da indução tumoral com DMBA. (A e B) Nos animais não induzidos, observou-se o músculo da parede peritoneal íntegro e sem presença de alterações. (C e D) Nos animais induzidos com DMBA, observou-se a presença de massa cística sólida com muitas aderências e exsudato inflamatório no local da indução do tumor (círculo).

Ainda na avaliação macroscópica foi determinada a área do tumor utilizando o programa ImageJ (Figura 14). No grupo de animais induzidos com DMBA a área do tumor variou entre 75,9% e 100%. Como esperado, o grupo de animais não induzido não apresentou tumor (área igual a zero).

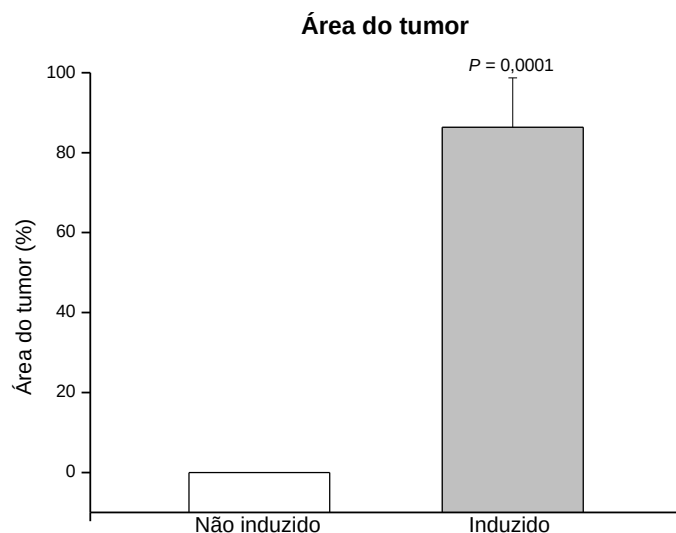


Figura 14: Porcentagem da área do tumor nos animais não induzidos (N = 10) e induzidos (N = 10), após o estabelecimento tumoral (16 semanas). Observou-se uma maior área tumoral nos animais induzidos ($P < 0,0001$, pelo teste T).

Para a confirmação do carcinoma mamário foram realizadas análises histológicas com coloração de HE. Nos animais não induzidos (Figura 15 A e B), os tecidos analisados estavam dentro dos padrões de normalidade, com presença de tecido muscular sem alterações. Entretanto, nos animais induzidos (Figura 15 C e D) foi observada área de carcinoma invasor com células bastante coradas e núcleo hipercromático. Nota-se, ainda, o tecido neoplásico com presença de células escamosas e depósito de queratina.

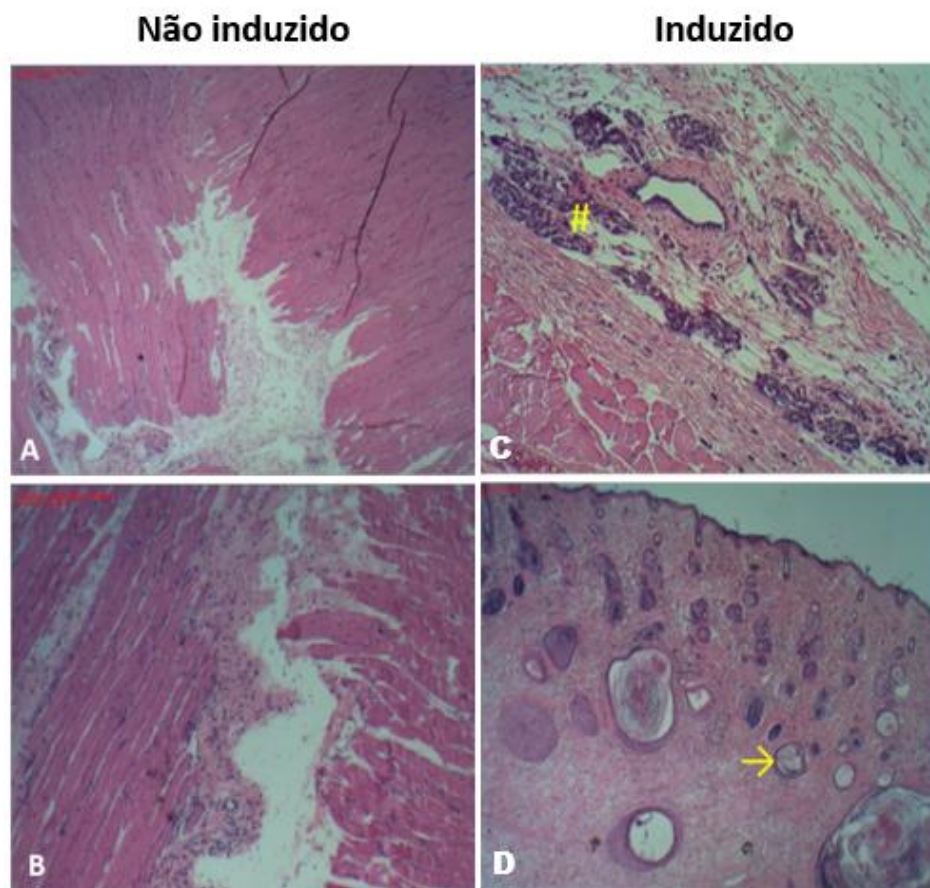


Figura 15: Análise microscópica com coloração de HE após 16 semanas de estabelecimento do modelo de carcinoma mamário. (A e B) Animais não induzidos. (C e D) Animais induzidos com DMBA. Notou-se área de carcinoma invasor com células bastante coradas, espalhando-se pelo estroma adjacente (#), além de tecido neoplásico com presença de células escamosas e depósitos de queratina (→). Aumento de 40x.

6.1.3 Estudo imunohistoquímico

Com relação à distribuição do VEGF nas amostras analisadas, foi detectada uma fraca imunoreatividade ao longo do estroma dos animais não induzidos (Figura 16 A e B). Já no grupo induzido, foi observada uma forte marcação no estroma fibrovascular ao redor das células neoplásicas (Figura 16 C e D).

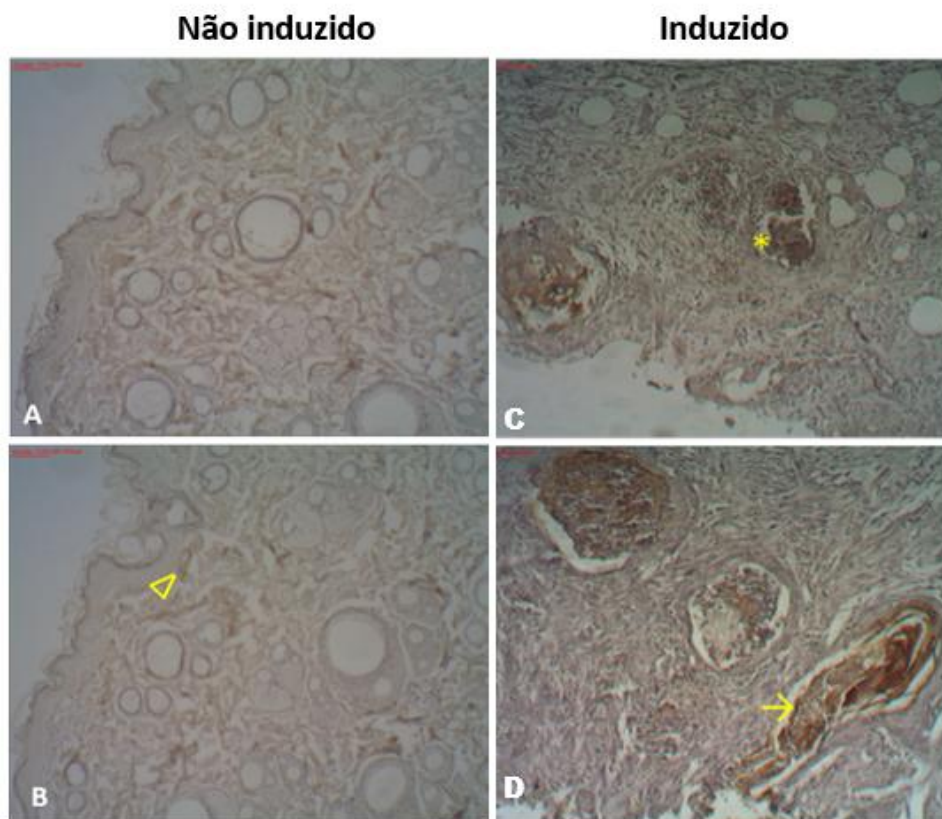


Figura 16: Imunomarcção para VEGF nas amostras de tecido mamário dos animais após o estabelecimento do carcinoma mamário. (A e B) Nos animais não induzidos, foi detectada uma marcação fraca ao longo do estroma (Δ). Entretanto, nos induzidos (C e D) foi observada uma forte marcação no estroma ao redor das células neoplásicas (*) e próximas às células escamosas (→). Aumento de 40x.

A análise histomorfométrica confirmou, estatisticamente, uma maior distribuição do VEGF nas amostras dos animais induzidos com DMBA em comparação aos não induzidos (Figura 17).

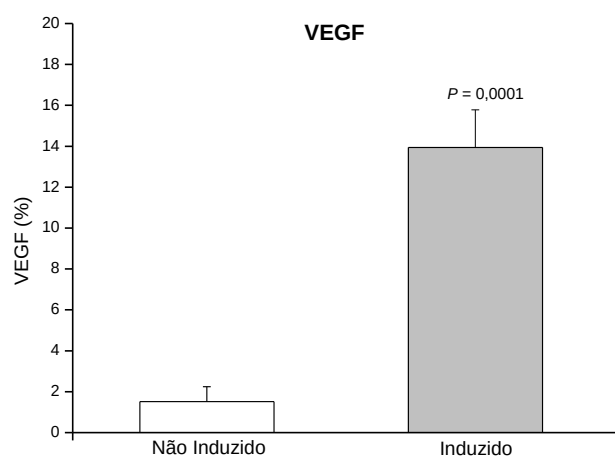


Figura 17: Quantificação da porcentagem de VEGF nas amostras de tecido dos grupos não induzido (N = 10) e induzidos com DMBA (N = 10), após estabelecimento do modelo tumoral. Observou-se uma maior distribuição do VEGF nos animais induzidos ($P < 0,0001$, pelo teste T).

6.1.4 Imunoensaio Enzimático

A dosagem das concentrações séricas de VEGF foi realizada pelo método de ELISA e, houve a confirmação de níveis mais elevados de VEGF nos animais induzidos com DMBA em relação aos não induzidos, com um p-valor estatisticamente significativo (Figura 18). As concentrações de VEGF nos animais não induzidos variaram entre 207,83 pg/mL e 242,58 pg/mL e, nos animais induzidos entre 399,42 pg/mL e 463,87 pg/mL.

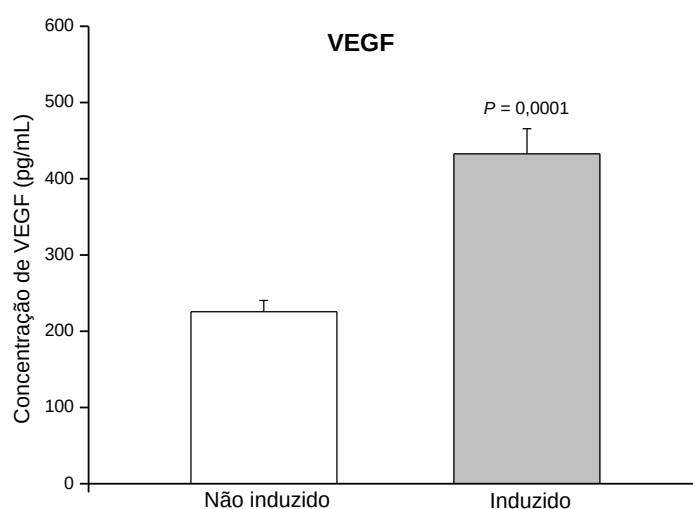


Figura 18: Concentração de VEGF pelo método de ELISA nas amostras de lavados dos animais não induzidos (N = 3) e induzidos com DMBA (N = 3) após o estabelecimento tumoral. Observou-se uma maior concentração sérica de VEGF nos animais induzidos ($P = 0,0001$, pelo teste T).

Pelo mesmo método de ELISA foi realizada a dosagem dos níveis de PGE_2 , verificando-se que após 16 semanas do estabelecimento do carcinoma mamário esses níveis estavam significativamente elevados nos animais induzidos quando comparados aos não induzidos (Figura 19). As concentrações de PGE_2 nos animais não induzidos variaram entre 50,44 pg/mL e 51,96 pg/mL e nos animais induzidos entre 282,7 pg/mL e 286,03 pg/mL.

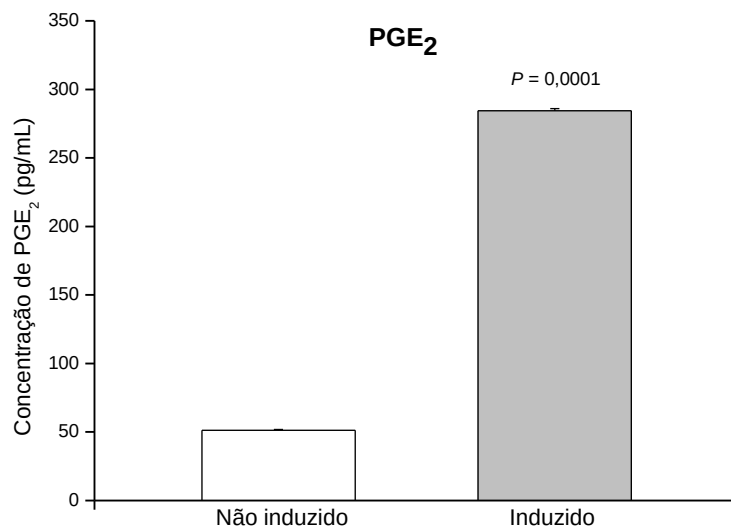


Figura 19: Concentração de PGE₂ pelo método de ELISA nas amostras de lavado peritoneal das ratas não induzidas (N = 3) e induzidas com DMBA (N = 3), após estabelecimento do tumor. Verificou-se uma maior concentração sérica de PGE₂ nos animais induzidos. ($P = 0,0001$, pelo teste T).

Foi verificada, ainda, elevadas concentrações de IL-10 nos animais induzidos após o estabelecimento do câncer de mama quando comparados aos não induzidos pelo método de ELISA (Figura 20). Nos animais não induzidos, as concentrações de IL-10 variaram entre 176,86 pg/mL e 182,75 pg/mL e nos animais induzidos os valores ficaram entre 601,85 pg/mL e 611,29 pg/mL.

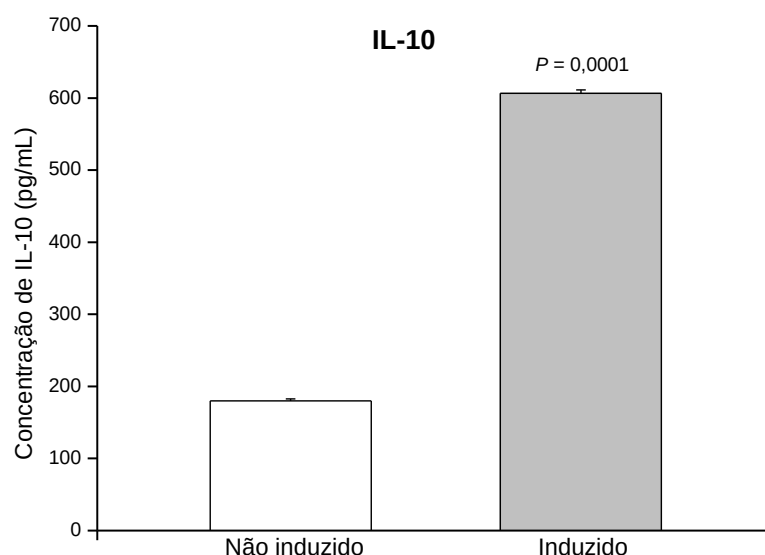


Figura 20: Concentração de IL-10 pelo método de ELISA no lavado peritoneal dos grupos não induzidos (N = 3) e induzidos com DMBA (N = 3), após estabelecimento do câncer de mama. Observou-se uma maior concentração sérica de IL-10 nos animais induzidos ($P = 0,0001$, pelo teste T).

6.1.5 Citometria de fluxo

A partir do lavado peritoneal dos animais, foi realizada a citometria de fluxo para identificação de macrófagos ativos F4-80/Mac-2+. Foi observado um aumento de 2 vezes na presença de macrófagos F4-80/Mac-2+ nos animais induzidos em relação aos não induzidos (Figura 21). O valor médio de macrófagos ativos F4-80/Mac-2+ nas ratas não induzidas foi de aproximadamente de 11%, e nas ratas induzidas foi de 22%.

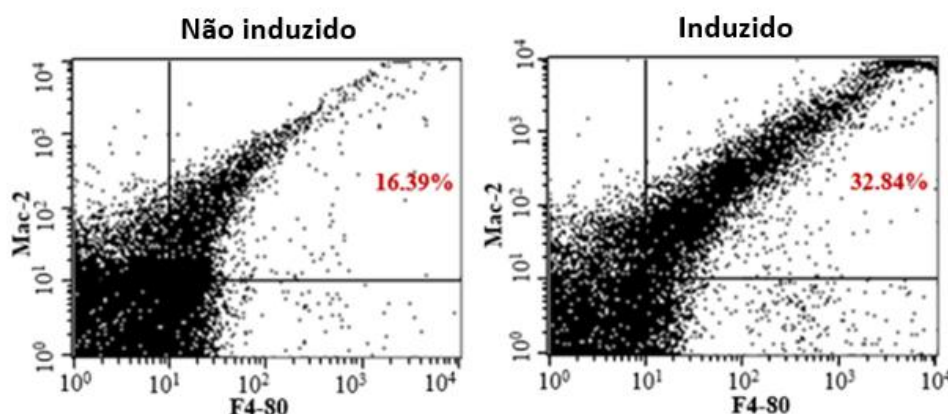


Figura 21: Citometria de fluxo após estabelecimento tumoral nas amostras de lavado peritoneal das ratas não induzidas (N = 3) e induzidas com DMBA (N = 3). Notou-se uma maior presença de macrófagos F4-80/Mac-2+ nos animais induzidos.

6.1.6 Esfregaço sanguíneo e análise hematológica (série branca)

Após a indução do câncer de mama foi realizada a análise hematológica dos animais induzidos e não induzidos por meio do esfregaço sanguíneo e pela contagem, em microscópio, da série branca (Figura 22 e 23). Observou-se uma linfocitose acentuada (aumento na quantidade de linfócitos) nos animais induzidos quando comparados aos animais não induzidos, indicando um aumento significativo na resposta imunológica desses animais. Além disso, o número de neutrófilos e monócitos também foi significativamente diferente entre os dois grupos.

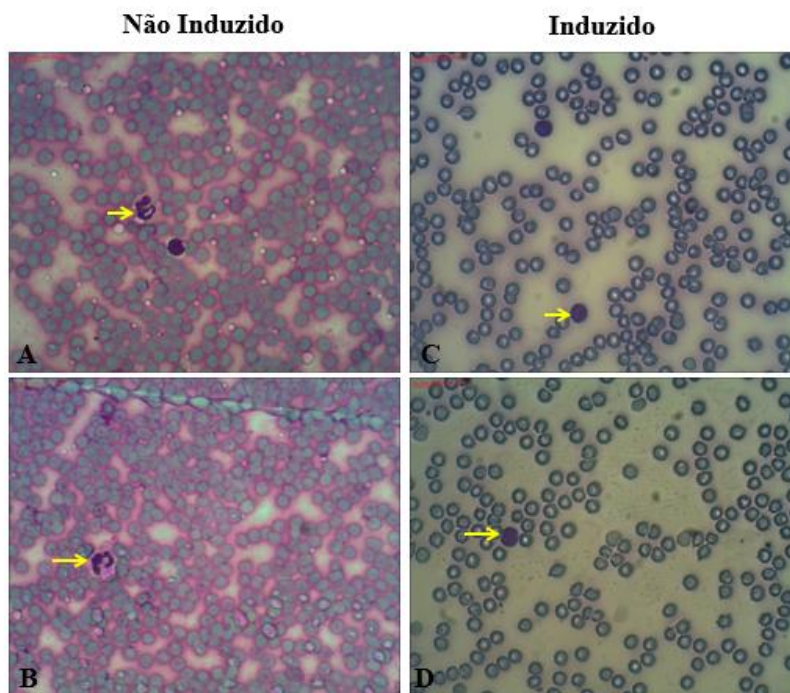


Figura 22: Esfregaço sanguíneo das ratas após o estabelecimento tumoral. (A e B) Animais não induzidos (N = 10). (C e D) Animais induzidos com DMBA (N = 10). As setas indicam presença de neutrófilos (A e B) e linfócitos (C e D). Aumento 40x.

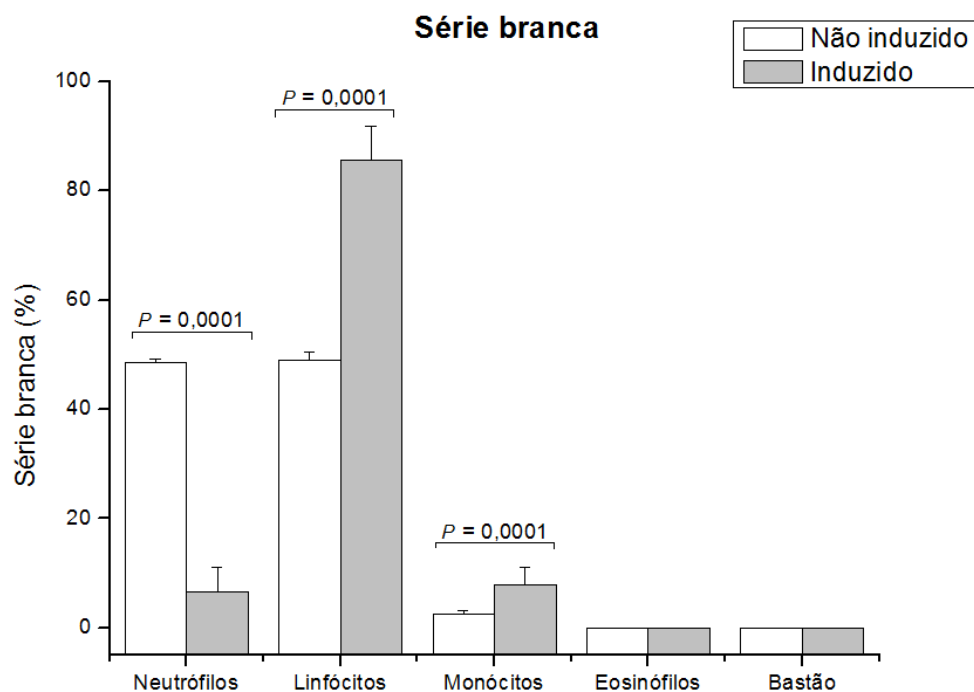


Figura 23: Quantificação da série branca nas amostras de sangue dos animais não induzidos (N = 10) e induzidos (N = 10) após o estabelecimento do carcinoma mamário. Observou-se diferença significativa entre os dois grupos no número de neutrófilos, linfócitos e monócitos ($P = 0,0001$ pelo teste T).

6.2 Tratamento com o extrato de *Euterpe oleracea* no modelo de carcinoma mamário

O tratamento com extrato de açaí (200 mg/kg, via gavagem) foi realizado diariamente, antes e durante as 16 semanas de indução tumoral, com o objetivo de avaliar o potencial farmacológico do açaí no desenvolvimento do carcinoma mamário. Um dia antes da indução com o carcinógeno DMBA, os animais foram divididos em 2 grupos: grupo controle (N = 20), recebendo solução salina e grupo tratado com açaí (N = 20). Ao longo das 16 semanas de estabelecimento do carcinoma mamário e do tratamento com açaí, 13 animais do grupo controle foram a óbito (taxa de mortalidade de 65%), provavelmente, em função da gravidade do tumor. No grupo tratado com açaí, apenas 3 animais foram a óbito (taxa de mortalidade de 15%). Em relação ao desenvolvimento do tumor mamário, todos os animais do grupo controle desenvolveram tumor (100%), enquanto que no grupo tratado com açaí, apenas 10 animais desenvolveram tumor (50%). Esses resultados foram organizados e apresentados na Figura 24.

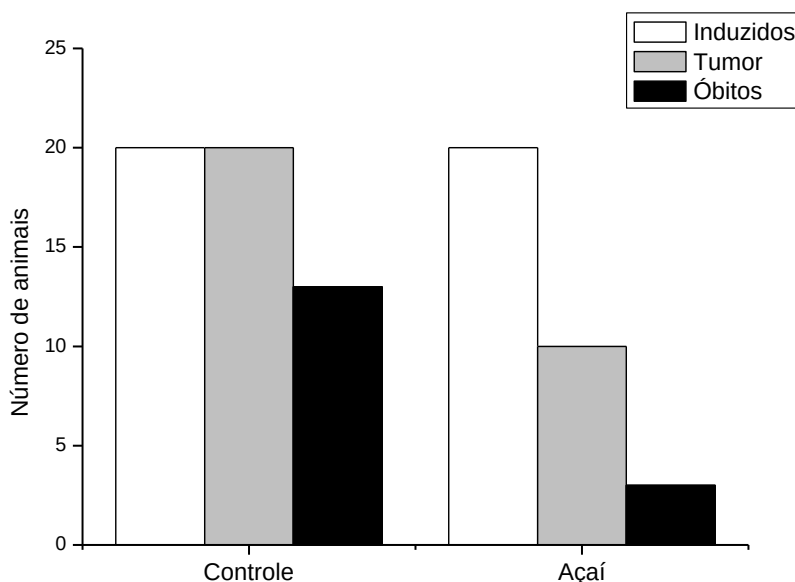


Figura 24: Número de animais induzidos com DMBA para o estabelecimento do câncer de mama (N = 40). No grupo controle foi administrado solução salina (N = 20) durante as 16 semanas de indução tumoral e no grupo tratado foi administrado diariamente 200 mg/kg do extrato de açaí (N = 20), iniciando o tratamento um dia antes da indução tumoral. O tumor mamário foi observado em 100% das ratas do grupo controle (N = 20) e em 50% das ratas do grupo tratado com o extrato de açaí (N = 10). Ocorreram 13 óbitos no grupo controle (taxa de mortalidade de 65%) e 3 no grupo tratado com o extrato de açaí (taxa de mortalidade de 15%).

Na tabela 7 consta a análise estatística realizada para avaliar o potencial farmacológico do açaí no tratamento do carcinoma mamário. O extrato de açaí reduziu significativamente o número de óbitos ($P = 0,0036$, Teste Qui-quadrado), assim como protegeu, significativamente, quanto ao desenvolvimento de tumores mamários ($P = 0,0004$, Teste Qui-quadrado). O impacto do extrato de açaí na sobrevivência cumulativa das ratas durante as 16 semanas de tratamento foi significativamente maior (15,15 semanas) do que no grupo que recebeu apenas solução salina (12,75 semanas). Os dados são apresentados na figura 25 ($P = 0,002$, Teste de long-rank).

Tabela 7: Número de animais induzidos com DMBA, que desenvolveram o tumor mamário e que vieram a óbito nos grupos controle e tratado com o extrato de açaí durante as 16 semanas de indução tumoral.

	Controle	Açaí	P-valor ^a
Induzidos	20	20	Referência
Presença tumor mamário	20 (100%)	10 (50%)	0,0004
Óbitos	13 (65%)	3 (15%)	0,0036

Dados são apresentados com o número e a porcentagem (%). ^a Teste Qui-quadrado.

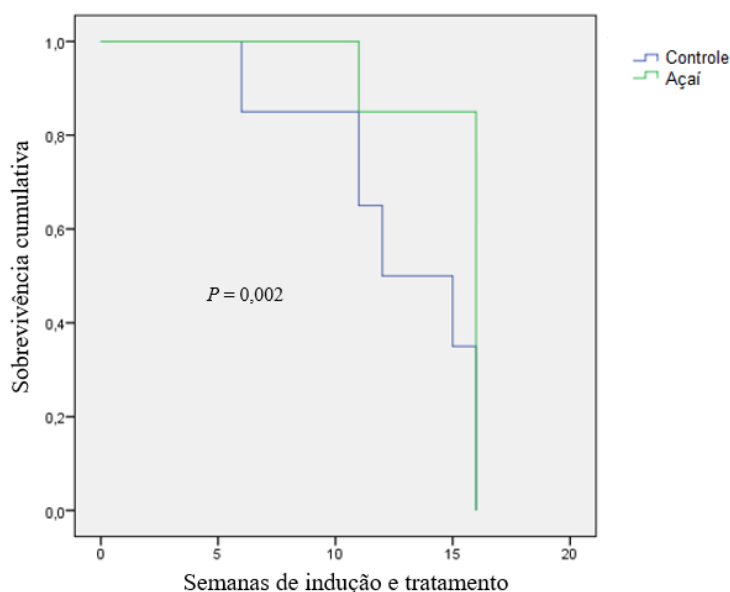


Figura 25: Curva de sobrevida dos animais controles e tratados com o extrato de açaí durante as 16 semanas de tratamento. Observa-se uma sobrevida significativamente menor no grupo controle (12,75 semanas), quando comparado ao grupo tratado com açaí (15,25 semanas) ($P = 0,002$, pelo teste de long-rank).

Após as 16 semanas de indução e tratamento com açaí, o número de animais que desenvolveram tumor mamário, no grupo controle e tratado com açaí, foi igual a 7 animais. Assim, as análises a seguir foram realizadas apenas nestes 14 animais. Tanto no grupo tratado com açaí quanto no grupo controle o tumor mamário apresentou aderências e massa cística no local da indução tumoral (Figura 26), não havendo diferença no tamanho e peso do tumor.



Figura 26: Análise macroscópica dos tumores após o tratamento com o extrato de açaí. (A e B) Animais controle. (C e D) Animais tratados com açaí. Em ambos os grupos foi observado o crescimento tumoral, com presença de aderências e massa cística no local da indução (círculo).

6.2.1 Avaliação histológica dos tumores após tratamento com açaí

Na avaliação histológica dos tumores nos grupos controle e tratados com açaí, observou-se em ambos os grupos área de carcinoma invasor com hiperchromasia celular ao redor do estroma fibrovascular (Figura 27). Porém nos animais controle (Figura 27 A e B) há uma maior presença de células inflamatórias quando comparados aos animais que receberam o tratamento com o extrato de açaí (Figura 27 C e D), no qual se observou pouca presença de células inflamatórias.

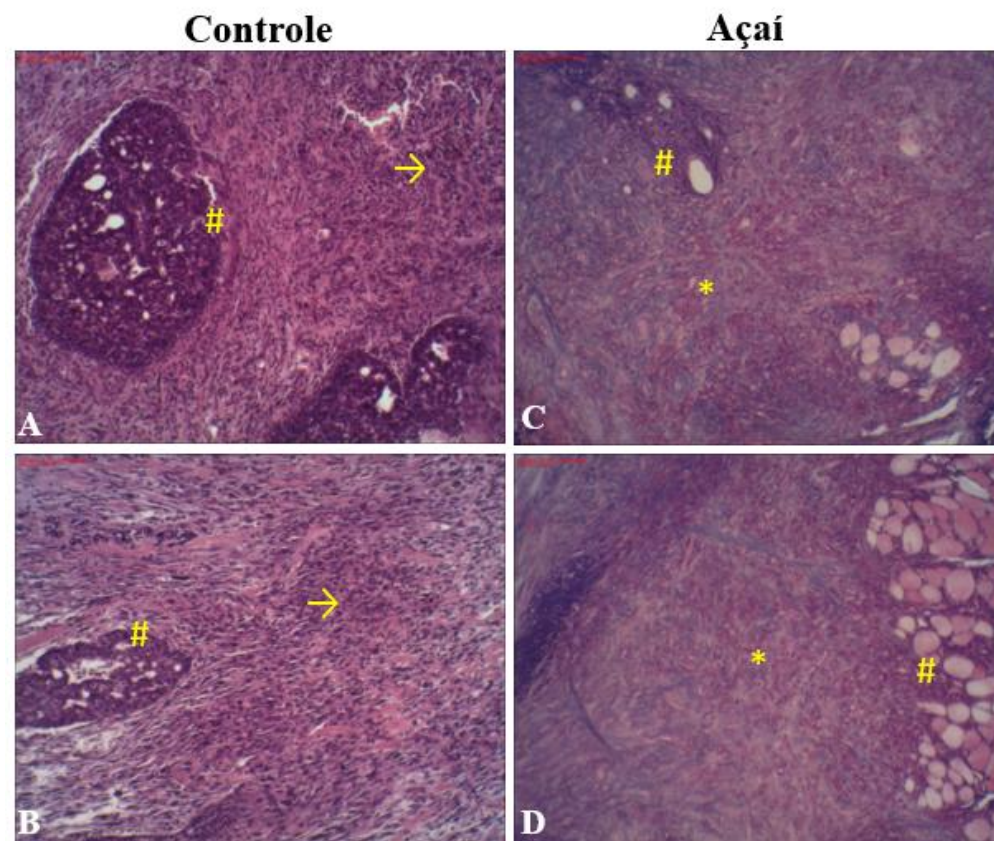


Figura 27: Avaliação histológica com coloração de HE nas amostras de tumores mamários dos animais controle (N = 7) e tratado com açaí (N = 7). (A e B) Nos animais controle, observou-se área de carcinoma invasor com hiper cromasia celular ao redor do estroma fibrovascular (#), com presença de muitas células inflamatórias (→). (C e D) Nos animais tratados com extrato de açaí, verificou-se área de carcinoma invasor com hiper cromasia celular ao redor do estroma fibrovascular (#), com menor número de células inflamatórias (→). Aumento de 40x.

6.2.2 Avaliação do processo angiogênico

Com relação à distribuição do VEGF, foi detectada uma forte imunoreatividade nas glândulas e ao longo do estroma nos animais do grupo controle (Figura 28 A e B), não sendo observada no grupo tratado com açaí (Figura 28 C e D). A análise histomorfométrica confirmou, estatisticamente, uma menor distribuição do VEGF nas amostras dos animais tratados com açaí em comparação aos animais controle (Figura 29).

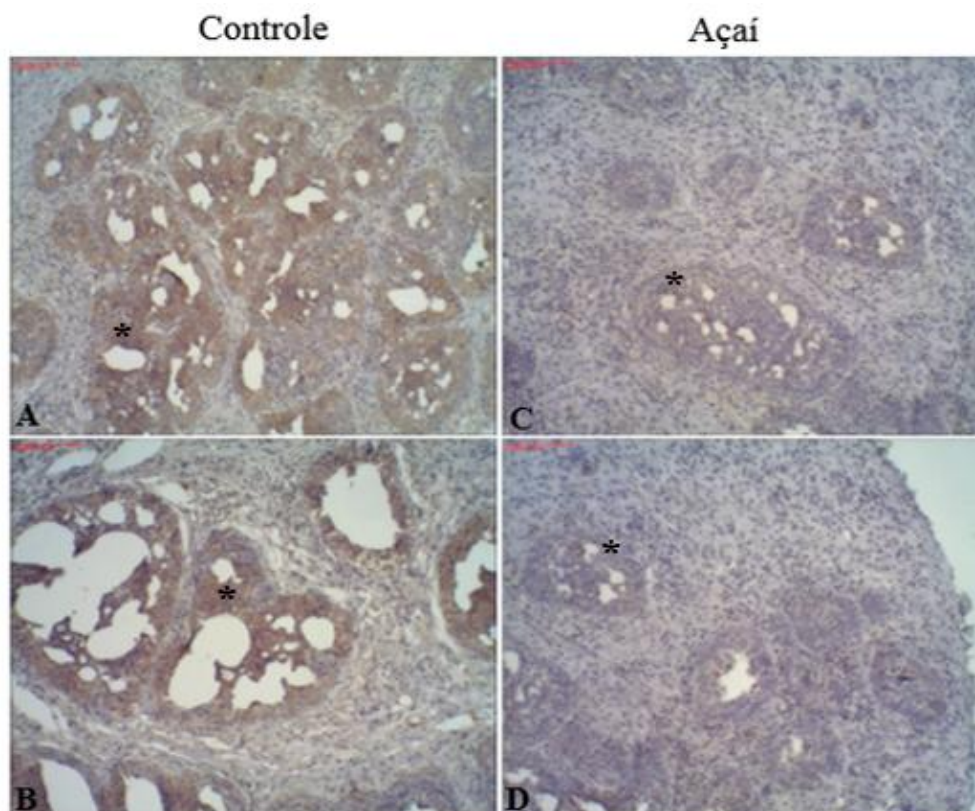


Figura 28: Imunohistoquímica para VEGF. (A e B) Nos animais controle (N = 7), observou-se uma maior marcação para o VEGF nas glândulas (*). (C e D) Nos animais tratados com açai (N = 7), as marcações estavam com menor intensidade (*). Aumento de 40x.

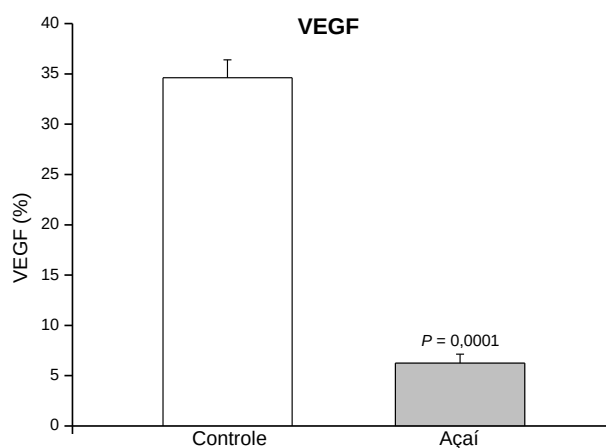


Figura 29: Quantificação da porcentagem de VEGF nas amostras de tecido dos grupos controle e tratado com açai. Observou-se uma maior porcentagem de VEGF nos animais controle ($P = 0,0001$, pelo teste T).

A quantificação sérica de VEGF foi realizada nos grupos controle (N = 7) e tratado com açai (N = 7), observando-se uma diminuição significativa da concentração de VEGF nos animais tratados com açai em comparação com os animais controles (Figura 30). A dosagem de VEGF nos animais controle variou entre 422,1 pg/mL e

511,71 pg/mL e, nos animais tratados com o extrato de açaí esses valores variaram entre 337,5 pg/mL e 404,71 pg/mL.

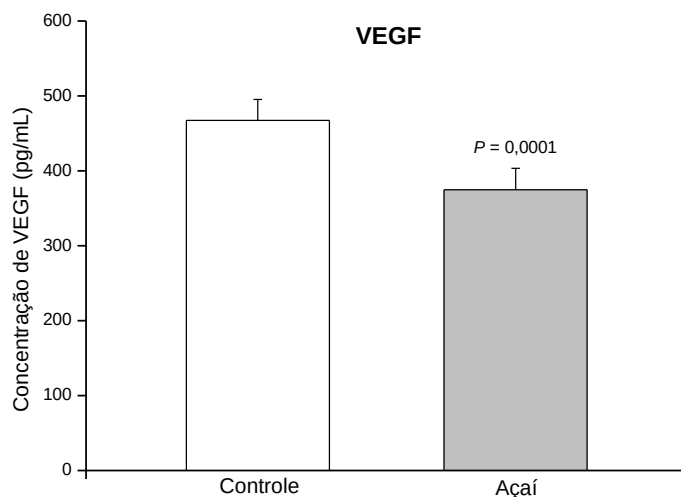


Figura 30: Dosagem da concentração sérica de VEGF pelo método de ELISA nas amostras de lavado peritoneal dos animais controle (N = 7) e tratados com açaí (N = 7). Observou-se uma maior concentração no grupo controle ($P = 0,0001$, pelo teste T).

A distribuição de FLK nas amostras analisadas revelou também uma maior marcação nas glândulas e ao longo do estroma nos animais do grupo controle (Figura 31 A e B) em comparação com o grupo tratado com açaí (Figura 31 C e D). Essa diferença foi confirmada estatisticamente pela análise histomorfométrica (Figura 32).

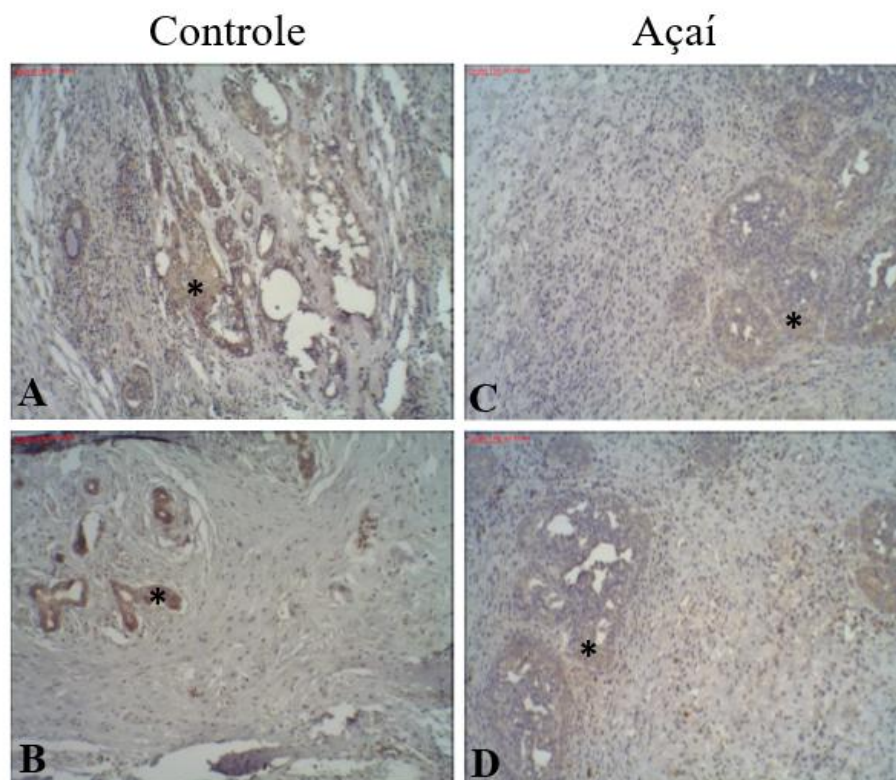


Figura 31: Imunohistoquímica para FLK. (A e B) Nos animais controle (N = 7), observou-se uma maior marcação para FLK principalmente nas glândulas (*). (C e D) Nos animais tratados com açai (N = 7), encontrou-se uma menor marcação para tal receptor. Aumento de 40x.

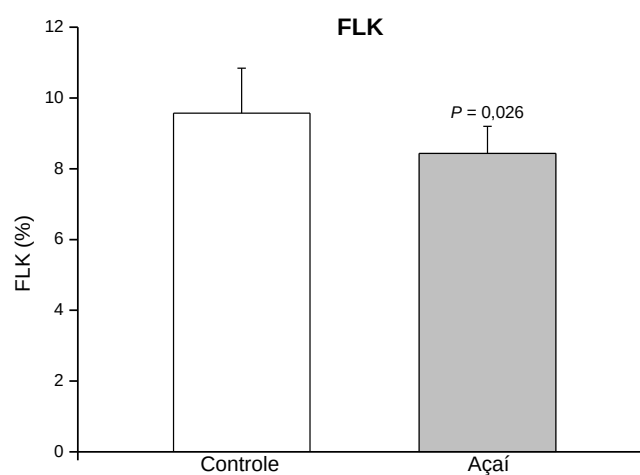


Figura 32: Quantificação da porcentagem de FLK nas amostras de tecido dos grupos controle e tratado com o extrato de açai. Verificou-se que a porcentagem de FLK foi maior nos animais controle ($P = 0,026$, pelo teste T).

Ainda, pelo mesmo método, com relação à distribuição da MMP-9 nas amostras analisadas, foi detectada uma marcação igual ao longo do estroma nos animais controle (Figura 33 A e B) e nos animais tratados com açai (Figura 33 C e D). A análise

histomorfométrica confirmou, estatisticamente, que não houve diferença na distribuição de MMP-9 nas amostras dos animais controle e tratados com açaí (Figura 34).

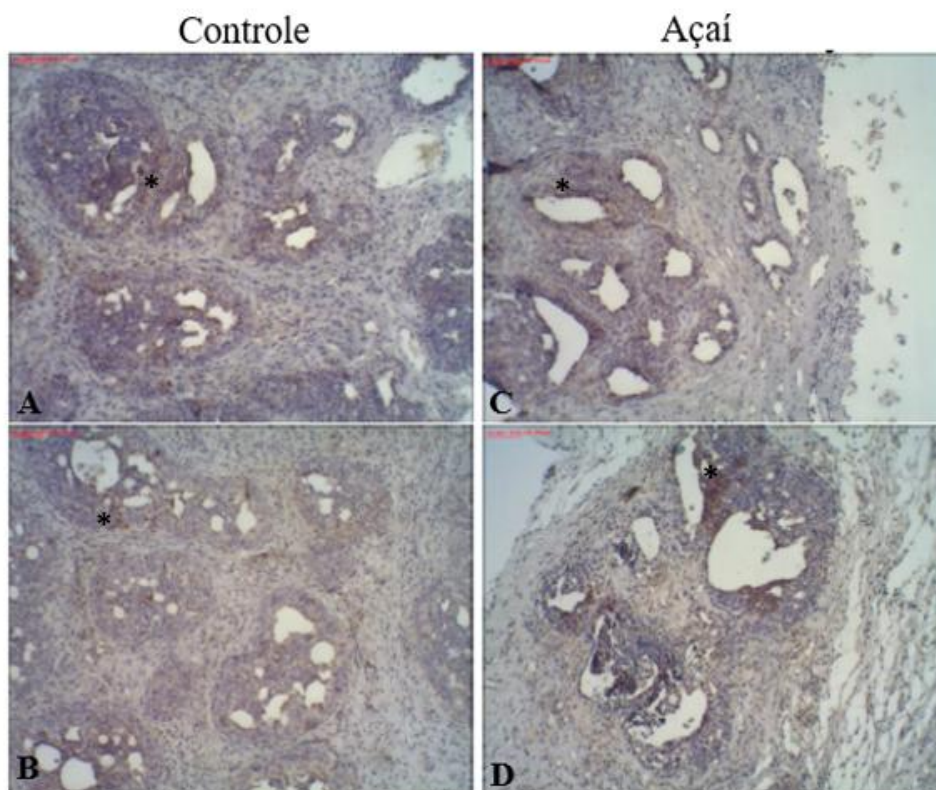


Figura 33: Imunomarcção para MMP-9. (A e B) Nos animais controle (N = 7), observou-se marcação para MMP-9 (*) igual aos animais tratados (C e D) com açaí (N = 7). Aumento de 40x.

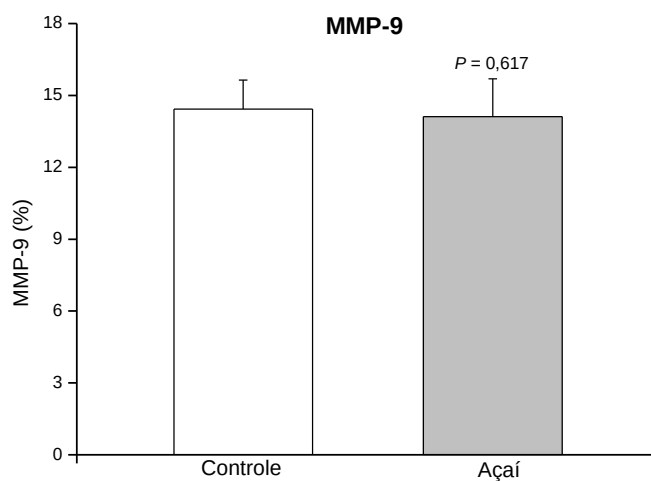


Figura 34: Quantificação da porcentagem de MMP-9 nas amostras de tecido das ratas controle e tratada com açaí. Não houve diferenças entre a porcentagem de MMP-9 nos dois grupos ($P = 0,617$, pelo teste T).

6.2.2.1 Citometria

Com as amostras de lavado peritoneal dos animais controle e tratado com açaí, realizamos a contagem de macrófagos ativos F4-80/Mac-2+. Verificou-se uma redução de aproximadamente 50% no número de macrófagos F4-80/Mac-2+ nos animais tratados com o extrato de açaí em comparação aos animais controle (Figura 35).

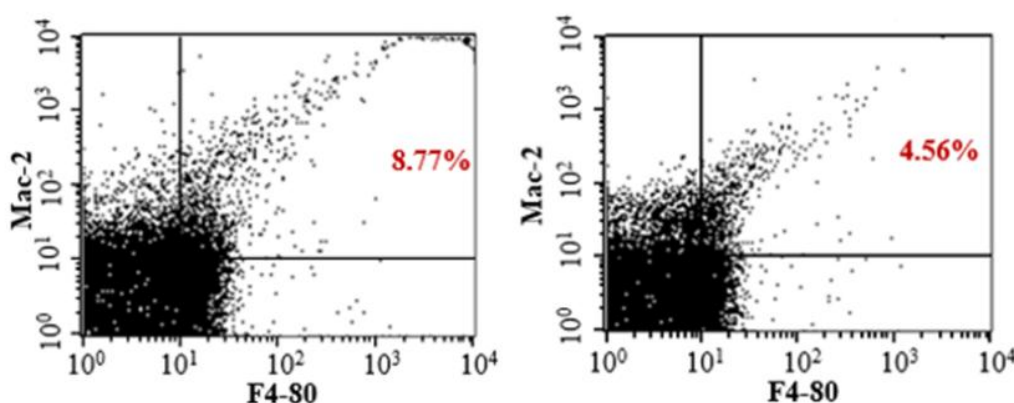


Figura 35: Citometria de fluxo para identificação de macrófagos em amostras de lavado peritoneal de ratas controle (N = 7) e tratadas com açaí (N = 7). Notou-se uma menor presença de macrófagos F4-80/Mac-2+ nos animais tratados com açaí.

6.2.3 Avaliação do processo inflamatório

No estudo imunohistoquímico, com relação à distribuição de COX-2 nas amostras analisadas, foi detectada uma forte imunoreatividade ao longo do estroma nos animais do grupo controle (Figura 36 A e B). Já no grupo tratado foi observada uma fraca marcação no estroma fibrovascular (Figura 36 C e D). A análise histomorfométrica confirmou, estatisticamente, uma menor distribuição de COX-2 nas amostras dos animais tratados com açaí em comparação aos animais controle (Figura 37).

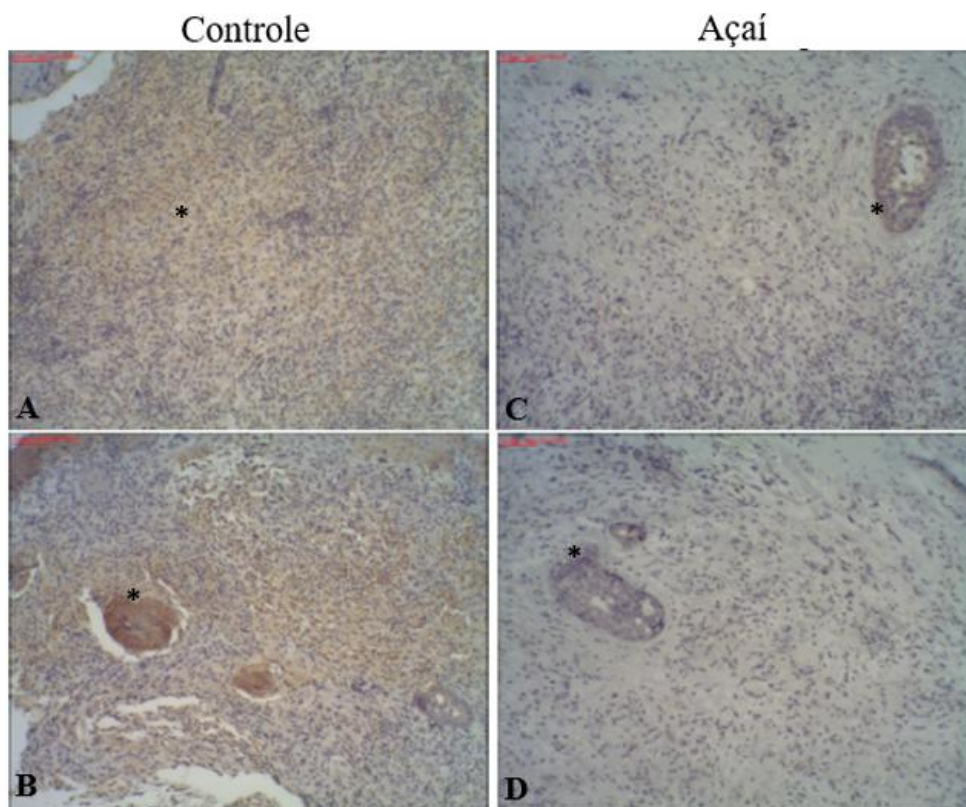


Figura 36: Imunomarcção para COX-2. (A e B) Nos animais controle (N = 7), observou-se uma forte marcação para COX-2 ao longo do estroma (*). (C e D) Nos animais tratados com (N = 7) houve uma menor imunoreatividade ao longo do estroma (*). Aumento de 40x.

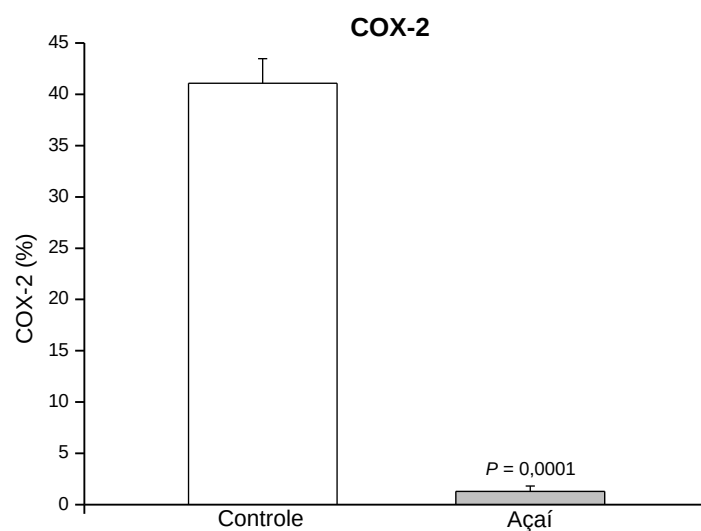


Figura 37: Quantificação da porcentagem de COX-2 nas amostras de tecido dos animais controle e tratado com o extrato de açai. Notou-se uma menor porcentagem de COX-2 nos animais tratados com açai ($P = 0,0001$, pelo teste T).

6.2.3.1 ELISA (PGE₂ e IL-10)

Os níveis séricos de PGE₂ foram quantificados e verificou-se que os animais tratados com o extrato de açaí tinham níveis significativamente mais baixos de PGE₂ do que os animais controles (Figura 38). A dosagem de PGE₂ nos animais controle variou entre 275,1 pg/mL e 316,25 pg/mL e, nos animais tratados com o açaí esses valores variaram entre 122,15 pg/mL e 237,75 pg/mL.

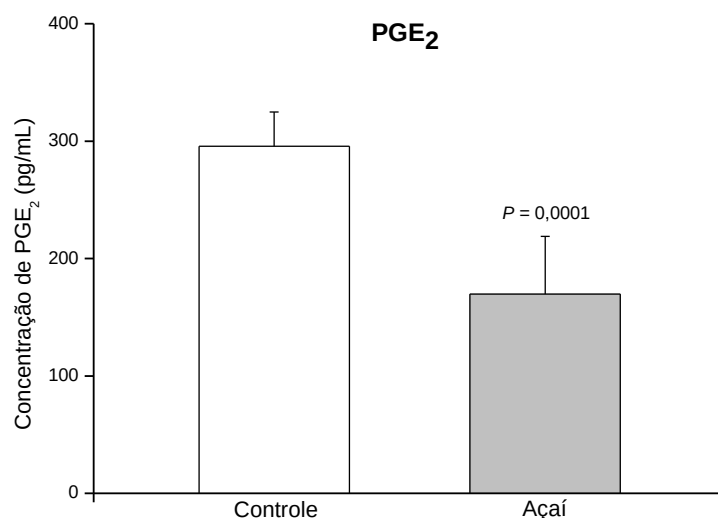


Figura 38: Dosagem dos níveis de PGE₂ pelo método de ELISA nas amostras de lavado peritoneal do grupo controle (N = 7) e tratado com açaí (N = 7). Observou-se menores níveis de PGE₂ nos animais tratados ($P = 0,0001$, pelo teste T).

Pelo mesmo método foi realizada também a dosagem dos níveis de IL-10 nos animais controle e tratado com açaí, verificando-se uma diminuição significativa das concentrações de IL-10 nas ratas tratadas com açaí em comparação com as ratas controles (Figura 39). Os níveis de IL-10 nos animais controle variou entre 592,37 pg/mL e 644,97 pg/mL e, nos animais tratados com o extrato de açaí esses valores variaram entre 485,06 pg/mL e 540 pg/mL.

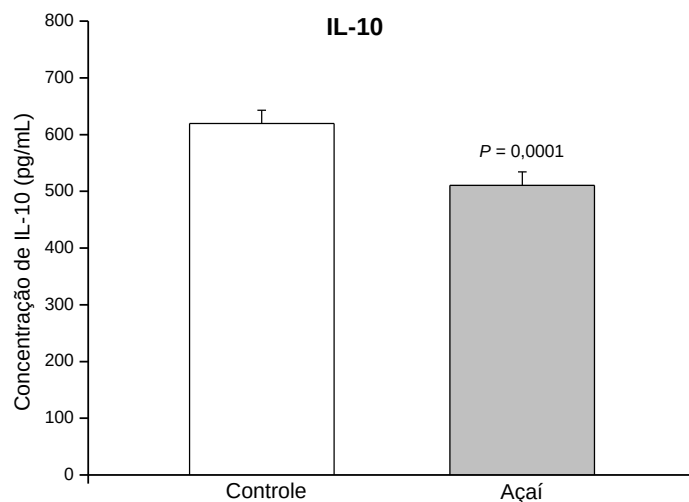


Figura 39: Dosagem dos níveis de IL-10 pelo método de ELISA nas amostras de lavado peritoneal das ratas controle (N = 7) e tratadas com o extrato de açaí (N = 7). Verificou-se uma maior concentração no grupo controle ($P = 0,0001$, pelo teste T).

6.2.3.2 Análise da produção de Óxido Nítrico

A avaliação da dosagem de NO foi realizada com amostras de lavado peritoneal de animais controle e tratado com açaí, utilizando-se para isso o reagente de Griess. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratados com açaí (Figura 40). Os animais controle tiveram os valores da dosagem de NO entre 2.070 μM e 3.160 μM e, nos animais tratados esses valores variaram entre 1.822 μM e 3.077 μM .

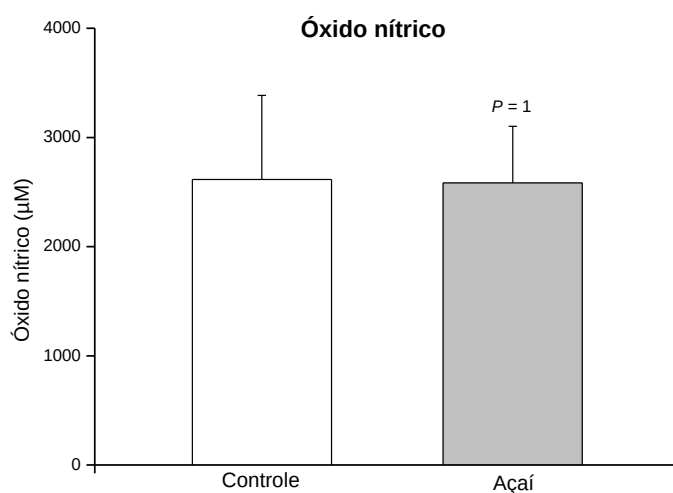


Figura 40: Dosagem de óxido nítrico pelo método colorimétrico em amostras de lavado peritoneal dos animais controle (N = 7) e tratado com açaí (N = 7). Não foi verificada diferença significativa na dosagem de NO comparando os dois grupos ($P = 1$, pelo teste T).

6.2.4 Avaliação da toxicidade

O peso dos animais foi mensurado durante todo o tratamento e verificou-se que os animais tratados com o extrato de açaí apresentaram um peso corporal maior do que os controle, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 41 e tabela 8).

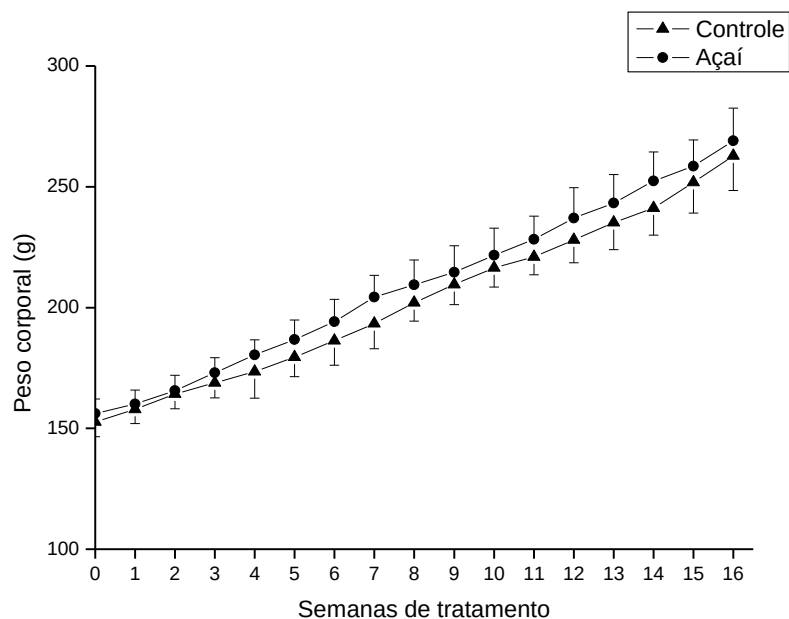


Figura 41: Peso corporal das ratas controle (N = 7) e tratados com açaí (N = 7) durante todo o período de indução e tratamento (16 semanas). Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado com açaí.

Tabela 8: Peso corporal dos grupos controle e tratado com açaí.

Semanas de Tratamento	Controle (N = 7)	Açaí (N = 7)	p-valor ^a
0	152,670 $\pm$ 6,112	156,161 $\pm$ 6,052	0,304
1	157,922 $\pm$ 5,979	160,042 $\pm$ 5,776	0,513
2	164,211 $\pm$ 6,112	165,627 $\pm$ 6,347	0,678
3	168,887 $\pm$ 6,271	172,993 $\pm$ 6,267	0,244
4	173,451 $\pm$ 10,992	180,364 $\pm$ 6,291	0,174
5	179,544 $\pm$ 8,183	186,754 $\pm$ 8,096	0,123
6	186,297 $\pm$ 10,161	194,109 $\pm$ 9,250	0,158
7	193,354 $\pm$ 10,339	204,335 $\pm$ 9,054	0,056

8	202,038 ± 7,672	209,394 ± 10,340	0,157
9	209,539 ± 8,291	214,662 ± 10,950	0,343
10	216,438 ± 7,963	221,643 ± 11,211	0,336
11	220,922 ± 7,335	228,251 ± 9,548	0,133
12	227,981 ± 9,453	237,068 ± 12,538	0,152
13	235,157 ± 11,130	243,278 ± 11,763	0,209
14	241,138 ± 11,189	252,381 ± 11,998	0,095
15	251,831 ± 12,759	258,539 ± 10,899	0,311
16	262,781 ± 14,294	269,042 ± 13,556	0,417

^a P-valor obtido com o teste T.

6.2.4.1 Níveis glicêmicos

Os níveis glicêmicos foram dosados utilizando sangue periférico dos animais em estudo, que tinham livre acesso a alimentação (animais não se encontravam em jejum). Nesta análise, verificou-se que os animais tratados com o extrato de açaí tiveram níveis séricos de glicose significativamente maiores quando comparados aos animais controles (Figura 42). Nos animais controle os níveis glicêmicos ficaram entre 190 mg/dL e 220 mg/dL e, nos animais tratados com açaí, variou entre 171 mg/dL e 343 mg/dL.

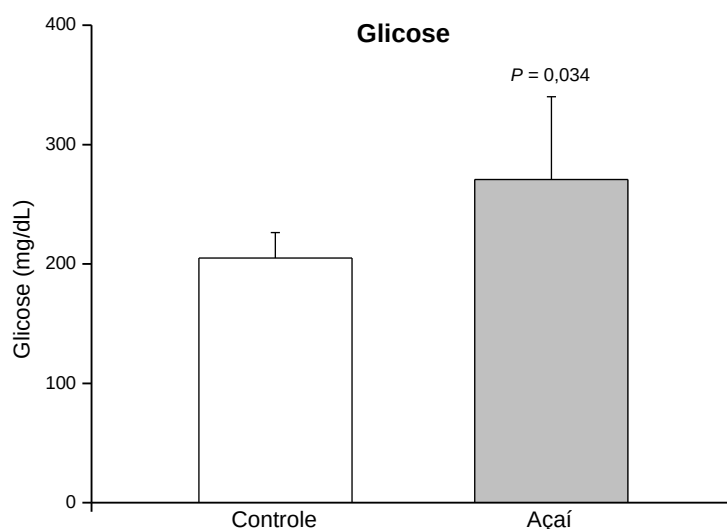


Figura 42: Dosagem de glicose no sangue dos animais dos grupos controle (N = 7) e tratados com açaí (N = 7). Os níveis glicêmicos foi significativamente maior nas ratas tratadas com açaí quando comparadas aos controles ($P = 0,034$, pelo teste T).

6.2.4.2 Análise dos órgãos

Foi realizada a avaliação macroscópica e histológica do coração, fígado e rins dos animais estudados para verificar a toxicidade nesses órgãos do DMBA e/ou do tratamento com o extrato de açaí.

Na avaliação do tamanho do coração, em relação ao comprimento, não foram observadas diferenças significativas em ambos os grupos, controle e tratado (Figura 43). O comprimento do coração nos animais controle variou entre 1,1 cm e 1,5 cm e nos animais tratados com açaí variou entre 1,1 cm e 1,6 cm. Contudo, considerando a largura do coração foi observado uma diminuição significativa no grupo tratado com açaí em comparação ao controle (Figura 43). A largura do coração nos animais controle variou entre 1,1 cm e 1,2 cm e nos animais tratados com açaí variou entre 0,6 cm e 1,1 cm.

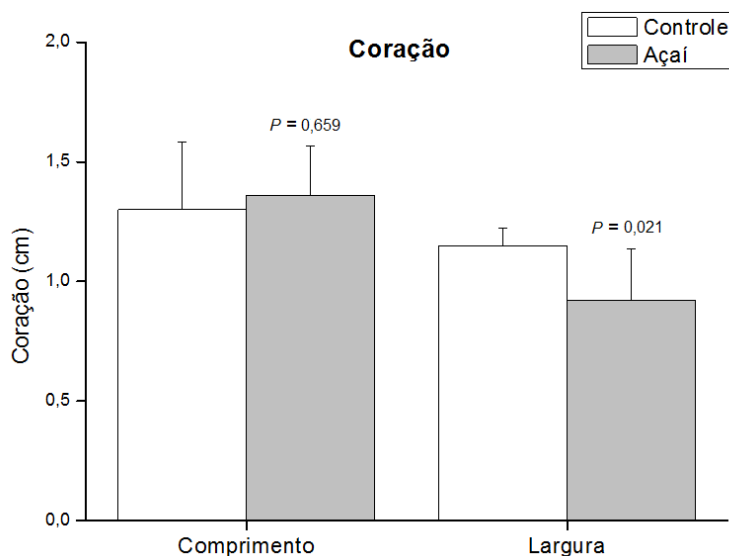


Figura 43: Comprimento e largura do coração dos animais controle (N = 7) e tratados com açaí (N = 7). Não foi observada diferença significativa no comprimento do coração entre os 2 grupos, contudo na largura foi observada uma diminuição significativa no comprimento do coração no grupo tratado comparado ao controle ($P = 0,659$ e $0,021$, pelo teste T).

Na análise histológica do coração não foram observadas diferenças entre os dois grupos. Verifica-se presença de tecido muscular estriado cardíaco preservado em ambos os grupos (Figura 44), mostrando que não houve efeitos tóxicos causados pelo indutor químico DMBA ou pelo extrato de açaí.

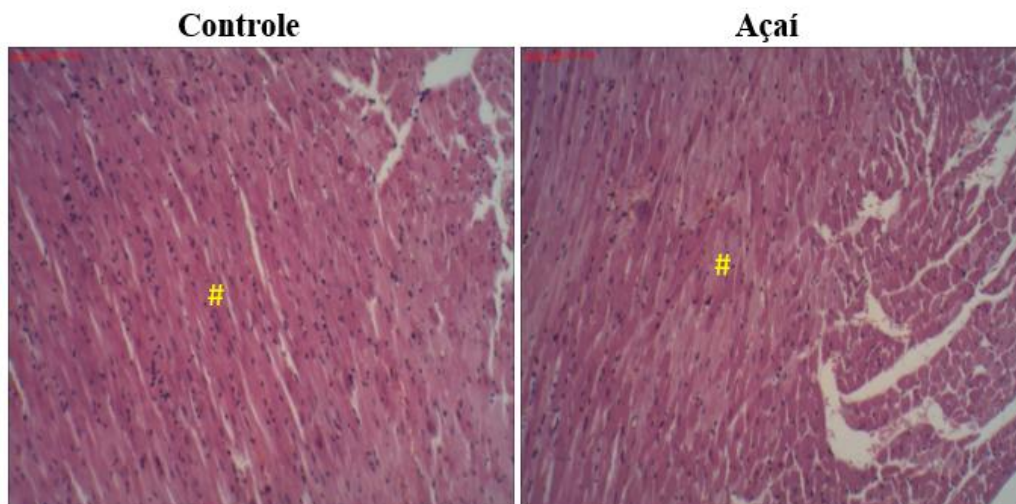


Figura 44: Avaliação histológica com coloração de HE em amostras de tecido do coração dos animais controles (N = 7) e tratados com extrato de açaí (N = 7). Verificou-se a presença de tecido muscular estriado cardíaco preservado (#) em ambos os grupos. Aumento 40x.

Em relação ao tamanho do fígado (comprimento e largura), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e tratado com extrato de açaí para ambos os parâmetros analisados (Figura 45). O comprimento do fígado nas ratas controle foi de 4,2 cm sem variação e a largura foi de 4 cm a 4,8 cm e, nas tratadas foi de 3,9 cm e 5,2 cm para o comprimento e 2,3 cm a 5,9 cm de largura.

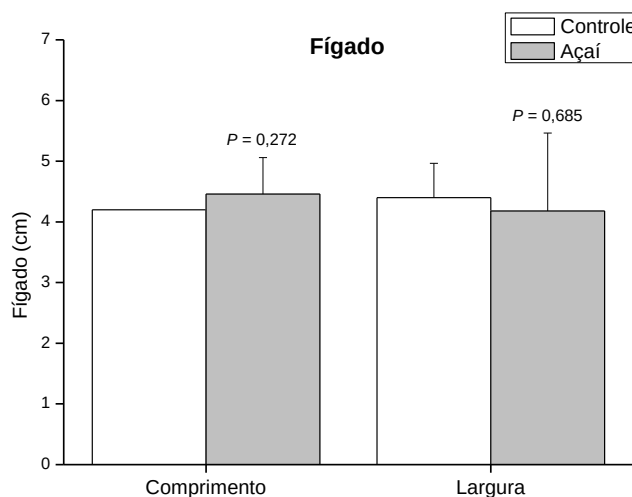


Figura 45: Comprimento e largura do fígado dos animais controles (N = 7) e tratados com extrato de açaí (N = 7). Não foi observada diferença significativa no comprimento e largura do fígado entre os 2 grupos ($P = 0,272$ e $0,685$, respectivamente pelo teste T).

Na avaliação histológica do fígado, é possível observar os efeitos tóxicos do DMBA nos animais controle, com presença de fibrose, atipia celular e microambiente hemorrágico. Já nos animais tratados com o extrato de açaí não foram observados

efeitos tóxicos, sendo visualizada a presença de veia centrolobular com cordões de hepatócitos, demonstrando tecido hepático normal (Figura 46).

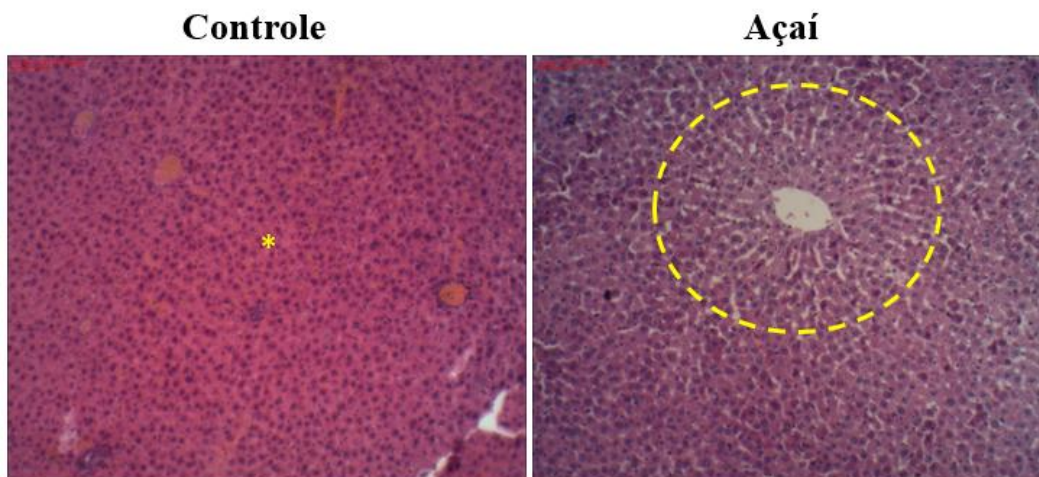


Figura 46: Análise microscópica com coloração de HE de amostras de tecido do fígado das ratas controle (N = 7) e tratadas com extrato de açaí (N = 7). Foi possível observar nos animais controle presença de fibrose, atipia celular e microambiente hemorrágico (*). Já nos animais tratados com extrato de açaí, nota-se a presença da veia centrolobular e cordões de hepatócitos (círculo), demonstrando tecido hepático normal. Aumento 40x.

Na mensuração do tamanho dos rins (comprimento e largura) não foram observadas diferenças em relação aos dois parâmetros avaliados entre os grupos controle e tratado com açaí (Figura 47). O comprimento dos rins nas ratas controle foi de 1,65 cm sem variação e a largura foi de 1,1 cm sem variação e nas ratas tratadas o comprimento variou entre 1,76 cm e 1,82 cm e a largura ficou entre 1,1 cm e 1,24 cm.

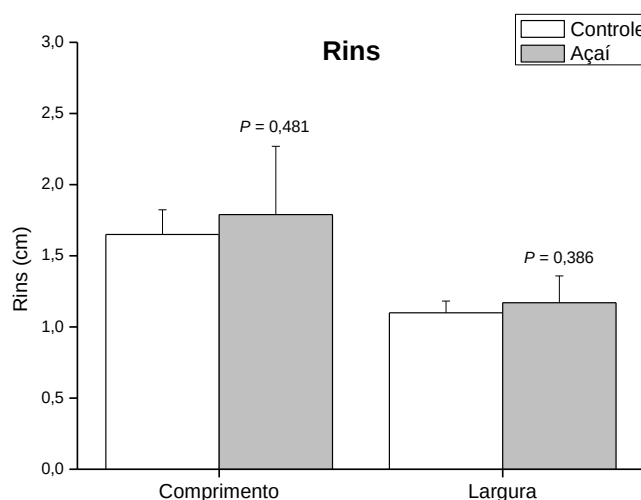


Figura 47: Comprimento e largura dos rins dos animais controles (N = 7) e tratados com extrato de açaí (N = 7). Não foi observada diferença significativa no comprimento e largura dos rins entre os 2 grupos ($P = 0,481$ e $0,386$, respectivamente pelo teste T).

Igualmente aos achados da avaliação histológica do fígado foram encontrados efeitos tóxicos na avaliação dos rins das ratas controle, observando-se a presença de fibrose, atipia celular e microambiente hemorrágico. Entretanto, nos animais tratados com o extrato de açaí observou-se a presença de glomérulos e túbulos distal, evidenciando tecido renal preservado (Figura 48).

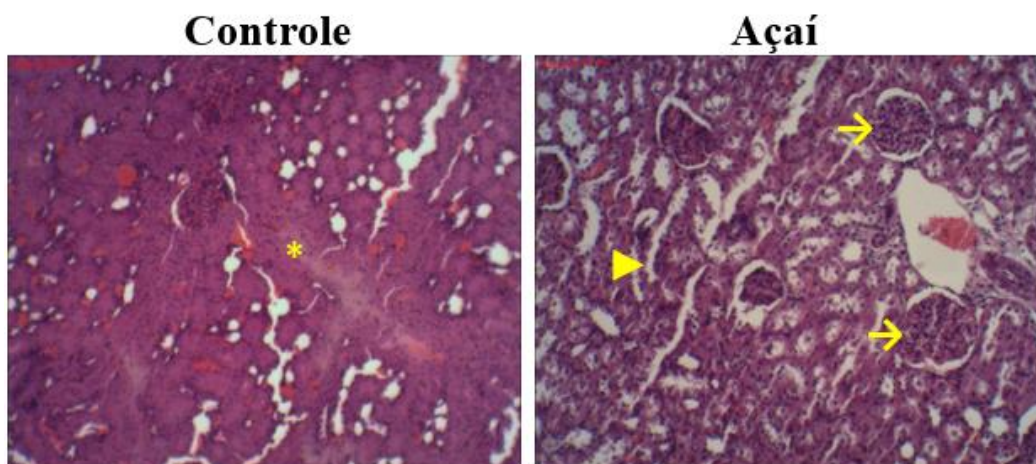


Figura 48: Análise histológica com coloração de HE em amostras de tecido dos rins dos grupos controle (N = 7) e tratado com extrato de açaí (N = 7). Observou-se a presença de fibrose, atipia celular e microambiente hemorrágico no grupo controle (*). Nos tratados com o açaí observou-se a presença de glomérulos (→) e túbulos distal (▶), evidenciando tecido renal preservado. Aumento de 40x.

7. DISCUSSÃO

O câncer de mama é um problema global de saúde pública, sendo a neoplasia com maior incidência e também a principal causa de morte por câncer em mulheres no Brasil e no mundo (IARC, 2012; ACS, 2015b; INCA, 2015). Apesar do grande número de tratamentos disponíveis, ainda, há recorrência loco regional em 12% das pacientes que se submeteram a mastectomia e em 20% das que passaram por cirurgia conservadora da mama (VAN DONGEN et al., 2000). Assim, a busca por novas terapias para o tratamento do câncer de mama continua sendo necessária.

A pesquisa translacional ressalta a necessidade premente de se converter em benefícios práticos para os pacientes os grandes investimentos em pesquisas. Os estudos pré-clínicos em modelos animais desempenham um papel importante no desenvolvimento de novas tecnologias e tratamentos. Assim, os modelos experimentais de doenças são cruciais para a pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias, servindo como base para gerar conhecimento e ferramentas em benefício da saúde humana (ALDHOUS, 1991; CRISSIUMA e ALMEIDA, 2006). Compostos candidatos a fármacos devem, obrigatoriamente, ser testados em estudos pré-clínicos, que precedem a autorização de pesquisas clínicas e epidemiológicas, devendo ser conduzidos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL) – OECD Principles of Good Laboratory Practice; HANDBOOK: GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP) /WHO (Quality practices for regulated non-clinical research and development) (HURSTING et al., 2005; ANVISA, 2013). Esses testes avaliam vários aspectos desses compostos, como: toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, além da avaliação da segurança farmacológica e da toxicocinética (ANVISA, 2013).

Os modelos experimentais de tumores mamários em roedores representam uma importante ferramenta para testes pré-clínicos, em grande parte porque, nestas espécies, o câncer de mama também é um processo complexo de múltiplos passos, podendo ser induzido tanto por radiação, vírus, fatores genéticos quanto por produtos químicos (RUSSO e RUSSO, 1996; MANNING, BUCK e COOK, 2016). Uma das melhores substâncias indutoras do carcinoma mamário, em modelo experimental, é o DMBA, que desde sua utilização por Huggins em 1961, vem sendo amplamente utilizado para o estabelecimento de modelos *in vivo* de carcinoma mamário, por apresentar uma melhor

caracterização das fases pré-malignas da doença, podendo ser utilizado para diferentes aplicações (RUSSO e RUSSO, 1996; THOMPSON e SINGH, 2000). Até o presente momento, na base de dados do PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) são encontrados 976 trabalhos científicos, utilizando os descritores: “breast cancer and DMBA” ou “*in vivo* model breast cancer and DMBA”. Ao estabelecermos o modelo experimental de câncer de mama, utilizando o carcinógeno DMBA, encontramos uma taxa de desenvolvimento de tumor mamário de aproximadamente 93%, após 16 semanas de indução. Além da confirmação histológica com a presença de carcinoma invasor, nós também observamos macroscopicamente o crescimento de uma massa cística com aderências e fibrose no local da indução tumoral. Estudos anteriores relataram uma taxa de indução tumoral, utilizando o DMBA, de 82% (BISHAYEE et al., 2013) e 100% (DEEPALAKSHMI e MIRUNALINI, 2013), também após 16 semanas de indução. Considerando 24 semanas de indução, a taxa de indução tumoral reduz para aproximadamente 73% (MA et al., 2014) e após 12 meses de indução para 87% (OUHTIT et al., 2014). A taxa de mortalidade que observamos após a indução com DMBA foi cerca de 44%, considerando 16 semanas de acompanhamento após a indução tumoral. Os nossos resultados estão de acordo com o que já foi descrito por Ojeswi et al. (2010) e Monga, Chauhan e Sharma (2012) que descreveram, em ambos os estudos, uma taxa de 40% de mortalidade, após 16 e 20 semanas de indução tumoral, respectivamente.

O câncer de mama é uma doença complexa e que envolve vários processos, incluindo a angiogênese e a inflamação, considerados eventos chaves para o desenvolvimento tumoral, invasão e metástase (FOLKMAN, 2007; HANAHAN e WEINBERG, 2011; YASMIN et al., 2015; CHEN et al., 2017). Nesse sentido, nós avaliamos marcadores dos processos angiogênico e inflamatório no estabelecimento do modelo experimental de câncer de mama e observamos níveis elevados de VEGF, bem como de PGE₂ e IL-10. Com a exposição prolongada a estímulos pró-inflamatórios, a enzima COX-2 permanece superexpressa, ocorrendo transição da inflamação aguda para inflamação crônica (HARRIS, 2014b). A produção sustentada de PGE₂ desempenha papel importante na sobrevivência e progressão tumoral, favorecendo maior proliferação celular, inibição da apoptose, indução de angiogênese e promoção da invasão tumoral (REGULSKI et al., 2016). Além disso, nós também observamos um número elevado de macrófagos nas amostras tumorais dos animais induzidos com

DMBA, confirmando a importância crucial dos macrófagos na angiogênese e na inflamação, estando abundantemente presentes na progressão tumoral (GAN et al., 2016; CHEN et al., 2017).

Com o estabelecimento de um modelo experimental de câncer de mama foi possível pesquisar as ações farmacológicas do extrato de açaí, um fruto encontrado abundantemente na região amazônica (LICHTENTHÄLER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006a), rico em polifenóis e flavonoides, apresentando atividade antioxidante, anti-inflamatória, efeitos cardioprotetores e anticancerígenos (HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; SILVA et al., 2014). Em um modelo de hipertensão em ratos Wistar, Da Costa et al. (2012), testaram o açaí na dose de 200mg/kg/dia, a mesma dose que utilizamos no nosso modelo de carcinoma mamário, e observaram que o açaí preveniu a hipertensão e a disfunção endotelial, possivelmente por suas ações antioxidantes, pela inibição da enzima Metaloproteinase de Matriz 2 (MMP-2) e ativação da via óxido nítrico sintase (NOS). Além disso, Silva et al. (2014) avaliaram o efeito do extrato de açaí em duas linhagens de células de câncer de mama humano e, observaram que nas células MCF-7, o açaí modificou as características morfológicas, diminuiu a viabilidade celular e induziu a autofagia, sugerindo um potencial antitumorigênico do açaí em células de câncer de mama (SILVA et al., 2014). Uma possível explicação para os efeitos citotóxicos do açaí sobre as células MCF-7 são as lignanas, um fitoquímico presente no açaí, que pode atuar como fitoestrógenos (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; SILVA et al., 2014). Dessa forma, com os resultados promissores em relação à atividade antitumoral do açaí *in vitro* e como na literatura não foram encontrados dados testando-o em modelos *in vivo*, nós avaliamos o potencial efeito do extrato de açaí em modelo experimental de câncer de mama.

O tratamento diário de 200 mg/kg de extrato do açaí reduziu em aproximadamente 4 vezes a taxa de mortalidade dos animais induzidos com o carcinógeno DMBA. Além disso, a taxa de desenvolvimento do tumor foi 2 vezes menor no grupo tratado com o extrato de açaí quando comparado ao grupo controle, que recebeu solução salina durante as 16 semanas. Nas análises histológicas foi observado que nas amostras dos animais controle houve um número elevado de células inflamatórias quando comparados aos animais tratados com o extrato de açaí. Ainda, em relação ao processo inflamatório, observamos que no grupo tratado com açaí houve uma menor imunomarcagem para COX-2 e níveis estatisticamente mais baixos de PGE₂ e IL-

10. Estudos têm demonstrado que a expressão de COX-2 está associada a parâmetros de agressividade tumoral, já conhecidos no câncer de mama humano, incluindo tamanho tumoral, status nodal positivo e menor sobrevida (XU et al., 2017), além de aumentar a microvascularização do tumor e estar associado a um pior prognóstico (HÖCKEL et al., 2001). Em conformidade com nossos achados, Abdel-Rahman et al. (2015), utilizando o DMBA para indução do tumor mamário em ratas Sprague-Dawley, observaram, nos animais tratados com 500 mg/kg de *Eruca sativa*, durante 4 semanas, a diminuição do processo inflamatório nas amostras de tumores mamários pela redução de 100% da expressão de COX-2, em comparação com o grupo controle. Mandal e Bishayee (2015), também utilizando um modelo de tumor mamário em ratas induzidas com DMBA, observaram uma menor imunomarcção para COX-2 nos animais que receberam 100 ou 200 mg/kg do extrato de *Trianthema portulacastrum*, durante 18 semanas, quando comparado ao grupo controle. Um outro extrato usado com sucesso em modelo de câncer de mama foi o *Rhus coriaria*. Nesse trabalho, os autores também demonstraram uma diminuição de PGE₂, COX-2 e MMP-9 *in vivo* e *in vitro*, que provavelmente diminuiu o processo de tumorigênese (EL HASASNA et al., 2016). Zhong et al. (2012), utilizando camundongos Balb/c nude induzidos com células de câncer de mama humano primário, observaram uma diminuição de COX-2 e IL-10 nos animais tratados com 80000 U/mL de ulinastatina ou ulinastatina e docetaxel (20 mg/kg), administrados intraperitoneal durante 20 dias, em comparação ao grupo controle. A ulinastatina também reduziu os níveis de PGE₂ e IL-10 no estudo *in vitro* com linhagens de células de câncer de mama humano primário (ZHONG et al., 2012). Além disso, uma menor imunomarcção para COX-2 e MMP-9 foi encontrada em amostras de tecido mamários dos animais que receberam durante 14 dias 200 mg/kg *Semecarpus anacardium* ou 300 mg/kg de *Kalpaamruthaa*, quando comparados ao controle (SATHISH, SHANTHI e SACHDANANDAM, 2011). A redução desses níveis podem estar relacionados à ação antioxidante desses compostos, que são ricos em flavonoides, vitamina C, ácido gálico, entre outros (SATHISH, SHANTHI e SACHDANANDAM, 2011). A inibição do processo inflamatório observada em nosso estudo, após tratamento com o extrato de açaí, possivelmente está relacionada aos seus constituintes fitoquímicos (flavonoides e polifenóis), que apresentam ação anti-inflamatória (SCHAUSS et al., 2006a; ULBRICHT et al., 2012).

O câncer de mama é uma doença sabidamente dependente de angiogênese (FOLKMAN, 2007) e, o VEGF, principal fator pró-angiogênico, encontra-se elevado em amostras de câncer de mama (GASPARINI, 2000; BYRNE, BOUCHIER-HAYES e HARMEY, 2005; LU et al., 2005; SAHARINEN et al., 2011). A superexpressão de VEGF também tem sido associada a mau prognóstico do câncer de mama, tais como o comportamento metastático e pior sobrevida livre de doença (ZHANG et al., 2014; LIU, SEMENZA e ZHANG, 2015). Em nosso estudo, a imunomarcagem de VEGF e seu receptor FLK, assim como os níveis séricos de VEGF das amostras de tumores mamários das ratas tratadas com o açaí foram significativamente menores quando comparados aos controles. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Mafuvadze et al. (2011), que observaram uma redução na quantificação de VEGF e FLK em ratas Sprague-Dawley induzidas com DMBA e acetato de medroxiprogesterona (MPA), tratadas com 50 mg/kg de apigenina por até 13 dias. A redução do processo de angiogênese, via VEGF-FLK, provavelmente ocorreu pela ação antiprogesterona dos flavonoides da apigenina (MAFUVADZE et al., 2011). Utilizando esse mesmo modelo, Cook et al. (2016), testaram a luteolina (1, 20 3 25 mg/kg) durante 10 dias consecutivos e mais 8 injeções com intervalos de 48 horas e observaram uma redução da distribuição de VEGF no grupo tratado quando comparado ao controle, confirmando a ação dos flavonoides como um antiestrogênio e antiprogesterona (COOK et al., 2016). Ainda, em modelo de carcinoma mamário induzido por DMBA, Mukhopadhyay et al. (2006), observaram pela técnica de Western blot, uma redução de VEGF nos animais que receberam 200 g/kg de proteína de soja na ração durante 147 dias quando comparados aos animais controles, que receberam caseína. Sathish, Shanthi e Sachdanandam (2011), utilizando o mesmo método e modelo, observaram uma redução de VEGF nos animais tratados com *Semecarpus anacardium* ou *Kalpaamruthaa* quando comparados ao grupo controle. Os níveis reduzidos de FLK foram também encontrados pelo estudo imunohistoquímico em camundongos com câncer de mama induzidos com células MDA-MB-231, tratados com 40 mg/kg melatonina (via intraperitoneal durante 5 dias da semana por 21 dias), quando comparados ao grupo controle (JARDIM-PERASSI et al., 2014). Em relação ao açaí, Dias et al. (2014), em um estudo *in vitro* com linhagens de células de carcinoma de cólon observaram uma diminuição do VEGF nessas células, sugerindo que os

flavonoides presentes no açaí provavelmente são os responsáveis pela atividade antiangiogênica, via VEGF (DIAS et al., 2014).

A promoção da angiogênese tumoral mediada pela enzima COX-2 pode ser explicada pela produção de prostaglandinas, principalmente a PGE₂, pelas células tumorais, que aumentam as concentrações de VEGF (EL HASASNA et al., 2016). Singh et al. (2007) demonstraram que o aumento da PGE₂ em tumores de mama estimulam a progressão de metástases ósseas em modelo animal e em pacientes. Os autores descreveram, ainda, que a diminuição da PGE₂ resulta na redução da migração e invasão de células de tumores mamários, e que antagonistas da PGE₂ podem ser utilizados na prevenção e tratamento do câncer de mama (SINGH et al., 2007).

A superexpressão de VEGF está relacionada ao aumento no número de macrófagos (LEWIS et al., 2000; BINGLE, BROWN e LEWIS, 2002; OBEID et al., 2013; LIN et al., 2015), que estão aumentados nos tumores mamários e parecem desempenhar um papel importante na secreção de citocinas pró-angiogênicas e pró-inflamatórias, no desenvolvimento tumoral e na metástase (BINGLE, BROWN e LEWIS, 2002; CARRON et al., 2017; CHEN et al., 2017). Em nosso estudo observamos um aumento do número de macrófagos peritoneais nos animais induzidos com DMBA, que desenvolveram tumor mamário, quando comparados aos animais não induzidos. Após tratamento com o extrato de açaí, observamos que o número de macrófagos peritoneais foi reduzido pela metade quando comparado ao grupo controle. Recentemente, nosso grupo, em um estudo *in vitro* com linhagem de macrófagos J774.G8, observou uma diminuição em 50% da viabilidade celular, utilizando as doses de 20 e 40 µg/mL de extrato de açaí (MACHADO et al., 2016). Nesse mesmo estudo, 200 mg/kg do extrato de açaí, administrado diariamente durante 30 dias, foi eficaz em reduzir lesões de endometriose peritoneal em modelo experimental, assim como o processo inflamatório, angiogênico e o número de macrófagos (MACHADO et al., 2016). A ação do açaí na redução do número de macrófagos nos modelos experimentais de câncer de mama e de endometriose, sugere que ele age nos processos angiogênico e inflamatório, diminuindo a expressão dos genes como o VEGF e COX-2, reprimindo a manutenção e o crescimento tumoral (MACHADO et al., 2016).

Em nosso estudo, o açaí demonstrou, ainda, um efeito protetor sobre o fígado e rim, após administração do DMBA, que é um agente altamente tóxico (HUGGINS; MORII, 1961). No grupo controle, induzido com DMBA, mas que recebeu apenas

solução salina durante 16 semanas, foi observado na análise histológica, formação de tecido fibroso e um ambiente hemorrágico, enquanto que no grupo tratado com extrato de açaí o tecido encontrava-se íntegro. Da mesma forma, Ribeiro et al. (2010), observou, em animais saudáveis, que o açaí na dose de 3, 33, 10 ou 16,67 g/kg quando administrado em conjunto com a doxorubicina, apresentou um efeito protetor à cardiotoxicidade causada por esse antineoplásico. Do mesmo modo, Marques et al. (2016), em seu estudo com camundongos Swiss saudáveis não observou efeitos genotóxicos do açaí nas 3 doses testadas (30, 100 e 300 mg/kg) nos tratamentos agudo (24h) ou subagudo (durante 14 dias) em leucócitos, células de fígado, testículo e medula óssea. Em função do efeito antigenotóxico do extrato de açaí, observado por nós e por Ribeiro et al. (2010) na presença dos agentes tóxicos DMBA e doxorubicina, respectivamente, sugere-se a utilização do açaí como um agente coadjuvante no tratamento do câncer, impactando na redução dos efeitos adversos provocados pelos quimioterápicos, conforme já proposto por Ribeiro et al., (2010).

Em nosso estudo não observamos diferença significativa no peso corporal dos animais tratados com o extrato de açaí quando comparados ao grupo controle. Contudo, observamos um aumento significativo nos níveis glicêmicos, após 16 semanas de tratamento com açaí, comparados ao grupo controle. Ressaltamos que os animais estavam com livre acesso à alimentação e que a glicose não foi dosada em jejum. O peso corporal de ratas também foi verificado por Souza et al. (2012) após administração de 2% de açaí (peso seco/peso) durante 6 semanas e não foram observadas diferenças significativas entre os animais que receberam o açaí e os animais controles. Nesse estudo, os animais que receberam o açaí tiveram níveis significativamente menores de colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), além de um aumento dos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL) quando comparados ao animais que receberam apenas a dieta hipercolesterolêmica, sugerindo um efeito hipocolesterolêmico do açaí (SOUZA et al., 2012). Apesar da diferença que encontramos, especialmente nos níveis glicêmicos, o açaí é composto de antocianinas como: cianidina 3-glicosídeo; cianidina 3-glucosídeo; cianidina 3-rutinosídeo (JENSEN et al., 2008; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; ULBRICHT et al., 2012); cianidina 3-sambubiosídeo (SCHAUSS et al., 2006b); peonidina 3-glicosídeo; peonidina 3-rutinosídeo (SCHAUSS et al., 2006b; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011), que ajudam a reduzir os níveis de colesterol (SOUZA et al.,

2012), atuam como antioxidantes (DEL POZO-INSFRAN, PERCIVAL e TALCOTT, 2006; JENSEN et al., 2008; ULBRICHT et al., 2012), anti-inflamatórios (ULBRICHT et al., 2012) e podem desempenhar um papel importante na prevenção e no tratamento do câncer (DEL POZO-INSFRAN, PERCIVAL e TALCOTT, 2006; HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; SILVA et al., 2014).

Além de ter sido o primeiro trabalho a avaliar o efeito terapêutico do extrato de açaí em modelo *in vivo* de carcinoma mamário, este estudo destaca-se pela via de administração do extrato (via gavagem), que além de ser por via oral (de fácil administração), também apresenta um controle exato da dose administrada. Alguns estudos não controlaram a quantidade de açaí administrada, deixando-o disponível na água ou ração dos animais (STONER et al., 2010; DA COSTA et al., 2012; FRAGOSO et al., 2012, 2013; SOUZA et al., 2012). Nós avaliamos, ainda, marcadores envolvidos no processo inflamatório e angiogênico do tumor, que são fatores sabidamente conhecidos e envolvidos no processo fisiopatológico do câncer de mama (HANAHAN e WEINBERG, 2011; CHEN et al., 2017). Contudo, nosso estudo apresentou algumas limitações, como o número amostral final obtido em cada grupo de comparação (tratado com açaí e controle); assim como o número de animais que desenvolveram tumor no grupo tratado com açaí (apenas 50% dos animais), não sendo possível determinar se os que não desenvolveram tumor neste grupo foram em função do efeito protetor do açaí ou pelo insucesso do estabelecimento do modelo com DMBA, que conforme verificamos pode ser de até 7%. Outra limitação do nosso estudo foi não ter dosado os níveis glicêmicos e o perfil colesterolêmico, em jejum e durante todo o período de tratamento com o extrato de açaí.

Com os resultados obtidos em nosso estudo, propomos uma possível via de sinalização para os efeitos terapêuticos do extrato de açaí no câncer de mama, tendo os macrófagos um papel chave nesse mecanismo (QIAN e POLLARD, 2010; SICA e MANTOVANI, 2012; CHEN et al., 2017). Sabemos que os macrófagos são de extrema importância na inflamação e na angiogênese, como também uma importante fonte de produção de VEGF, essencial para o estabelecimento e crescimento do tumor mamário (LEWIS et al., 2000; BINGLE, BROWN e LEWIS, 2002; OBEID et al., 2013; LIN et al., 2015). Dessa forma, a redução significativa no número de macrófagos em animais tratados com açaí pode levar a uma diminuição da sinalização VEGF/FLK e nos níveis de PGE₂, contribuindo para a redução ou o não desenvolvimento do tumor em nosso

modelo. Vale ressaltar, que vários estudos têm demonstrado a ação anticancerígena do açaí (STONER et al., 2010; FRAGOSO et al., 2012, 2013; DIAS et al., 2014), incluindo linhagens de células malignas de câncer de mama, MCF-7 (SILVA et al., 2014). Todos esses resultados podem estar relacionados ao alto teor de polifenóis, antocianina e flavonoides presentes no açaí, que parecem desempenhar essa atividade anticancerígena (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006; FRAGOSO et al., 2013; SILVA et al., 2014; MACHADO et al., 2016).

Por fim, como o câncer de mama é um problema global de saúde pública e apresenta diversos efeitos adversos aos tratamentos atuais, e levando em conta que o açaí tem um baixo custo aquisitivo, sendo facilmente encontrado, principalmente no Brasil, justifica-se a utilização deste extrato como um agente terapêutico coadjuvante para o tratamento do câncer de mama, visando a redução dos efeitos adversos.

8. CONCLUSÃO

O modelo experimental de câncer de mama em ratas Wistar induzidas com o carcinógeno DMBA foi estabelecido com êxito. Dessa forma, foi possível avaliar o efeito farmacológico e tóxico do extrato do açaí, que inibiu o processo inflamatório no microambiente tumoral, pela redução dos níveis de COX-2, PGE₂ e IL-10. Além disso, o açaí atuou sobre o processo angiogênico, outro importante processo para o desenvolvimento do câncer de mama, diminuindo níveis de VEGF e FLK, e a quantidade do número de macrófagos ativos. O açaí apresentou ainda, um efeito protetor na presença do DMBA, uma substância citotóxica utilizada para indução do carcinoma mamário.

9. PERSPECTIVAS

Realizar novos estudos com o açaí, em modelo experimental de câncer de mama, com o objetivo de elucidar o exato mecanismo de ação do extrato, além de realizar testes toxicológicos mais abrangentes. Além disso, testar o potencial efeito farmacológico do açaí em conjunto com os principais quimioterápicos antineoplásicos citotóxicos utilizados no tratamento convencional do câncer de mama para verificar o seu possível efeito protetor sobre os efeitos genotóxicos causados pelos quimioterápicos. O maior número possível de dados seguros e consistentes devem ser obtidos para que seja possível translacionar o uso do extrato de açaí, em testes clínicos e epidemiológicos, como uma terapia coadjuvante no tratamento do câncer de mama.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S.; SHABAN, N.; HAGGAG, A.; AWAD, D.; BASSIOUNY, A.; TALAAT, I. Inhibition of NF- κ B, Bcl-2 and COX-2 Gene Expression by an Extract of *Eruca sativa* Seeds during Rat Mammary Gland Carcinogenesis. **Asian Pac. J. Cancer Prev.** v 16, p 8411-8, 2015.

ACS, American Cancer Society. **Global cancer: facts & figures.** 3. ed. Atlanta: American Cancer Society, 2015a.

ACS, American Cancer Society. **Cancer facts & figures 2015.** Atlanta: American Cancer Society, 2015b.

ACS, American Cancer Society. **Breast cancer: facts & figures 2015-2016.** Atlanta: American Cancer Society, 2015c.

AEBI, S.; DAVIDSON, T.; GRUBER, G.; CASTIGLIONE, M.; ON BEHALF OF THE ESMO GUIDELINES WORKING GROUP. Primary Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. **Ann Oncol**, v 21, n S 5, p v9-14, 2010.

ALDHOUS, P. Animal Testing. Tide Turns against LD50. **Nature**, v 353, n 6344, p 489, 1991.

ANDERSON, K. N.; SCHWAB, R. B.; MARTINEZ, M. E. Reproductive Risk Factors and Breast Cancer Subtypes: A Review of the Literature. **Breast Cancer Res Treat**, v 144, n 1, p 1-10, 2014.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informações sobre eficácia e segurança de Avastin® (bevacizumabe)**, 2010.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**, 2013.

BAUER, S. M. Angiogenesis, Vasculogenesis, and Induction of Healing in Chronic Wounds. **Vasc Endovascular Surg.** v 39, n 4, p 293-306, 2005.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v 11, n 2, 2010.

BEDNARSKI, P.; DOBRUCH-SOBCZAK, K.; CHRAPOWICKI, E.; JAKUBOWSKI, W. Breast Ultrasound Scans - Surgeons' Expectations. **J Ultrason**, v 15, n 61, p 164-71, 2015.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The Role of Tumour-Associated Macrophages in Tumour Progression: Implications for New Anticancer Therapies. **J Pathol**, v 196, n 3, p 254-65, 2002.

BISHAYEE, A.; MANDAL, A.; THOPPIL, R. J.; DARVESH, A. S.; BHATIA, D. Chemopreventive effect of a novel oleanane triterpenoid in a chemically induced rodent model of breast cancer. **Int. J. Cancer**, v 133, p 1054-64, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de bases técnicas da oncologia - sia/sus - sistema de informações ambulatoriais**. 21 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BURSTEIN, H. J.; KUTER, I.; CAMPOS, S. M.; GELMAN, R. S.; TRIBOU, L.; PARKER, L. M.; et al. Clinical Activity of Trastuzumab and Vinorelbine in Women with HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. **J Clin Oncol**, v 19, n 10, p 2722-30, 2001.

BYRNE, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J.; HARMEY, J. H. Angiogenic and Cell Survival Functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). **J Cell Mol Med**, v 9, n 4, p 777-94, 2005.

CAO, Y.; PRESCOTT, S. M. Many Actions of Cyclooxygenase-2 in Cellular Dynamics and in Cancer. **J Cell Physiol**, v 190, n 3, p 279-86, 2002.

CARRON, E. C.; HOMRA, S.; ROSENBERG, J.; COFFELT, S. B.; KITTRELL, F.; ZHANG, Y.; et al. Macrophages promote the progression of premalignant mammary lesions to invasive cancer. **Oncotarget**, 2017.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, Refinamento E Substituição Do Uso de Animais Em Estudos Toxicológicos: Uma Abordagem Atual. **Rev Bras Ciênc Farm**, v 40, n 3, p 289-99, 2004.

CERQUEIRA-COUTINHO, C.; MISSAILIDIS, S.; ALESSANDRA-PERINI, J.; MACHADO, D. E.; PERINI, J. A.; SANTOS-OLIVEIRA, R. Comparison of biodistribution profile of monoclonal antibodies nanoparticles and aptamers in rats with breast cancer. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v 45, n 3, p 598-601, 2016.

CHALA, L. F.; BARROS, N. de. Avaliação Das Mamas Com Métodos de Imagem. **Radiologia Bras**, v 40, n 1, p 4-6, 2007.

CHEN, Y.; ZHANG, S.; WANG, Q.; ZHANG, X. Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. **J Hematol Oncol**, v 10, n 36, p 1-13, 2017.

CHIN, Y.-W.; CHAI, H.-B.; KELLER, W. J.; KINGHORN, A. D. Lignans and Other Constituents of the Fruits of Euterpe Oleracea (Acai) with Antioxidant and Cytoprotective Activities. **J Agric Food Chem**, v 56, n 17, p 7759-64, 2008.

CHU, H.; WANG, Y. Therapeutic Angiogenesis: Controlled Delivery of Angiogenic Factors. **Ther Deliv**, v 3, n 6, p 693-714, 2012.

CONWAY, E. M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovasc Res**, v 49, p 507-21, 2001.

COOK, M. T.; MAFUVADZE, B.; BESCH-WILLIFORD, C.; ELLERSIECK, M. R.; GOYETTE, S.; HYDER, S. M. Luteolin suppresses development of

medroxyprogesterone acetate-accelerated 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats. **Oncol Rep**, v 35, p 825-32, 2016.

CRISSIUMA, A. L.; ALMEIDA, E. C. P. de. Experimentação e bem estar animal – Artigo de revisão. **Saúde Amb Rev**, v 1, p 1-10, 2006.

DA COSTA, C. A.; DE OLIVEIRA, P. R. B.; DE BEM, G. F.; DE CAVALHO, L. C. R. M.; OGNIBENE, D. T.; DA SILVA, A. F. E.; et al. Euterpe Oleracea Mart.-Derived Polyphenols Prevent Endothelial Dysfunction and Vascular Structural Changes in Renovascular Hypertensive Rats: Role of Oxidative Stress. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v 385, n 12, p 1199-209, 2012.

DEEPALAKSHMI, K.; MIRUNALINI, S. Modulatory Effect of Ganoderma Lucidum on Expression of Xenobiotic Enzymes, Oxidant-Antioxidant and Hormonal Status in 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-Induced Mammary Carcinoma in Rats. **Pharmacogn Mag**, v 9, n 34, p 167, 2013.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Açai (Euterpe Oleracea Mart.) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells. **J Agric Food Chem**, v 54, n 4, p 1222-9, 2006.

DIAS, M. M. dos S.; NORATTO, G.; MARTINO, H. S. D.; ARBIZU, S.; PELUZIO, M. do C. G.; TALCOTT, S.; et al. Pro-Apoptotic Activities of Polyphenolics From Açai (Euterpe Oleracea Martius) in Human SW-480 Colon Cancer Cells. **Nutri Cancer**, v 66, n 8, p 1394-405, 2014.

EBCTCG, E. B. C. T. C. G. Effects of Chemotherapy and Hormonal Therapy for Early Breast Cancer on Recurrence and 15-Year Survival: An Overview of the Randomised Trials. **Lancet (London, England)**, v 365, n 9472, p 1687-717, 2005a.

EBCTCG, E. B. C. T. C. G. Effects of Radiotherapy and of Differences in the Extent of Surgery for Early Breast Cancer on Local Recurrence and 15-Year Survival: An Overview of the Randomised Trials. **The Lancet**, v 366, n 9503, p 2087-106, 2005b.

EL HASASNA, H.; SALEH, A.; AL SAMRI, H.; ATHAMNEH, K.; ATTOUB, S.; ARAFAT, K.; et al. Rhus Coriaria Suppresses Angiogenesis, Metastasis and Tumor Growth of Breast Cancer through Inhibition of STAT3, NFκB and Nitric Oxide Pathways. **Sci Rep**, v 6, p 21144, 2016.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: An Organizing Principle for Drug Discovery? **Nat Rev Drug Discov**, v 6, n 4, p 273-86, 2007.

FRAGOSO, M. F.; PRADO, M. G.; BARBOSA, L.; ROCHA, N. S.; BARBISAN, L. F. Inhibition of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by Açai Fruit (Euterpe Oleraceae Martius) Intake. **Plant Foods Hum Nutri**, v 67, n 3, p 235-41, 2012.

FRAGOSO, M. F.; ROMUALDO, G. R.; RIBEIRO, D. A.; BARBISAN, L. F. Açai (Euterpe Oleracea Mart.) Feeding Attenuates Dimethylhydrazine-Induced Rat Colon Carcinogenesis. **Food Chem Toxicol**, v 58, p 68-76, 2013.

GAN, L.; QIU, Z.; HUANG, J.; LI, Y.; HUANG, H.; XIANG, T.; et al. Cyclooxygenase-2 in Tumor-Associated Macrophages Promotes Metastatic Potential of Breast Cancer Cells through Akt Pathway. **Int J Biol Sci**, v 12, n 12, p 1533-43, 2016.

GASPARINI, G. Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer. **Oncologist**, v 5 S 1, p 37-44, 2000.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **J Bras Patol Med Lab**, v 48, n 6, p 463-74, 2012.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N]nitrate in Biological Fluids. **Anal Biochem**, v 126, n 1, p 131-8, 1982.

GUSSO, G.; LOPES, J. M. C. **Tratado de medicina de família e comunidade: princípios, formação e práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. **Cell**, v 144, n 5, p 646-74, 2011.

HARRIS, R. E.; CASTO, B. C.; HARRIS, Z. M. Cyclooxygenase-2 and the Inflammogenesis of Breast Cancer. **World J Clin Oncol**, v 5, n 4, p 677, 2014.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe Oleracea Mart.*)—A Phytochemical and Pharmacological Assessment of the Species' Health Claims. **Phytochem Lett**, v 4, n 1, p 10-21, 2011.

HÖCKEL, S.; SCHLENGER, K.; VAUPEL, P.; HÖCKEL, M. Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer. **Int J Oncol**, v 19, n 4, p. 827-32, 2001.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; et al. Antiproliferative and Antioxidant Properties of Anthocyanin-Rich Extract from Açai. **Food Chem**, v 118, n 2, p 208-14, 2010.

HORIGUCHI, T.; ISHIGURO, N.; CHIHARA, K.; OGI, K.; NAKASHIMA, K.; SADA, K.; et al. Inhibitory Effect of Açai (*Euterpe Oleracea Mart.*) Pulp on IgE-Mediated Mast Cell Activation. **J Agric Food Chem**, v 59, n 10, p 5595-601, 2011.

HUGGINS, C.; MORII, S. Selective Adrenal Necrosis and Apoplexy Induced by 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene. **J Exp Med**, v 114, p 741-60, 1961.

HURSTING, S. D.; NUNEZ, N.; PATEL, A.; PERKINS, S. N.; LUBET, R.; BARRET, J. C. The utility of genetically altered mouse models for nutrition and cancer chemoprevention research. **Mutat Res**, v 576, p 80-92, 2005.

IARC, International Agency for Research on Cancer. **Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012.

ICESP, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira. **Manual de condutas em oncologia**. São Paulo, 2010.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Coordenação- Geral de Prevenção e Vigilância, 2014.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Coordenação- Geral de Prevenção e Vigilância, 2015.

IWASE, H. Current Topics and Perspectives on the Use of Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. **Breast Cancer**, v 15, n 4, p 278-90, 2008.

JAGER, N. G. L.; LINN, S. C.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H. Tailored Tamoxifen Treatment for Breast Cancer Patients: A Perspective. **Clin Breast Cancer**, v 15, n 4, p 241-4, 2015.

JARDIM-PERASSI, B. V.; ARBAB, A. S.; FERREIRA, L. C.; BORIN, T. F.; VARMA, N. R. S.; ISKANDER, A. S. M.; et al. Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer. **PLoS ONE**, v 9, n 1, p 1-11, 2014.

JENSEN, G. S.; WU, X.; PATTERSON, K. M.; BARNES, J.; CARTER, S. G.; SCHERWITZ, L.; et al. In Vitro and in Vivo Antioxidant and Anti-Inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich Fruit and Berry Juice Blend. Results of a Pilot and Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Crossover Study. **J Agric Food Chem**, v 56, n 18, p 8326-33, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G. S.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Anti-Oxidant Capacities of Flavonoid Compounds Isolated from Acai Pulp (*Euterpe Oleracea* Mart.). **Food Chem**, v 122, n 3, p 610-7, 2010.

KINGHORN, A. D.; CHAI, H.; SUNG, C. K.; KELLER, W. J. The Classical Drug Discovery Approach to Defining Bioactive Constituents of Botanicals. **Fitoterapia**, v 82, n 1, p 71-9, 2011.

KUMAR, V.; PERKINS, J. A. **Robbins & cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KÜMLER, I.; CHRISTIANSEN, O. G.; NIELSEN, D. L. A Systematic Review of Bevacizumab Efficacy in Breast Cancer. **Cancer Treat Rev**, v 40, n 8, p 960-73, 2014.

LEE, B. L.; LIEDKE, P. E.; BARRIOS, C. H.; SIMON, S. D.; FINKELSTEIN, D. M.; GOSS, P. E. Breast Cancer in Brazil: Present Status and Future Goals. **Lancet Oncol**, v 13, n 3, p e95-e102, 2012.

LEWIS, J. S.; LANDERS, R. J.; UNDERWOOD, J. C.; HARRIS, A. L.; LEWIS, C. E. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor by Macrophages Is up-Regulated in Poorly Vascularized Areas of Breast Carcinomas. **J Pathol**, v 192, n 2, p 150-8, 2000.

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total Oxidant Scavenging Capacities of *Euterpe Oleracea* Mart. (Açaí) Fruits. **Int J Food Sci Nutr**, v 56, n 1, p 53-64, 2005.

LIN, L.; CHEN, Y.-S.; YAO, Y.-D.; CHEN, J.-Q.; CHEN, J.-N.; HUANG, S.-Y.; et al. CCL18 from Tumor-Associated Macrophages Promotes Angiogenesis in Breast Cancer. **Oncotarget**, v 6, n 33, p 34758-73, 2015.

LIU, Z.-J.; SEMENZA, G. L.; ZHANG, H.-F. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Breast Cancer Metastasis. **J Zhejiang Univ Sci B**, v 16, n 1, p 32-43, 2015.

LU, H.; SHU, X.-O.; CUI, Y.; KATAOKA, N.; WEN, W.; CAI, Q.; et al. Association of Genetic Polymorphisms in the VEGF Gene with Breast Cancer Survival. **Cancer Res**, v 65, n 12, p 5015-9, 2005.

MA, D.; ZHANG, Y.; YANG, T.; XUE, Y.; WANG, P. Isoflavone intake inhibits the development of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA)-induced mammary tumors in normal and ovariectomized rats. **J Clin Biochem Nutr**, v 54, n 1, p 31-8, 2014.

MACHADO, D. E.; PALUMBO, A. J.; SANTOS, J. M.; MATTOS, R. M.; DOS SANTOS, T. A.; SEABRA, S. H.; et al. A GFP Endometriosis Model Reveals Important Morphological Characteristics of the Angiogenic Process That Govern Benign and Malignant Diseases. **Histol Histopathol**, n 29, p 903-12, 2014.

MACHADO, D. E.; RODRIGUES-BAPTISTA, K. C.; ALESSANDRA-PERINI, J.; SOARES DE MOURA, R.; SANTOS, T. A. dos; PEREIRA, K. G.; et al. *Euterpe Oleracea* Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis. **PLOS ONE**, v 11, n 11, p e0166059, 2016.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary Gland Development. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v 1, n 4, p 533-57, 2012.

MACON, M. B.; FENTON, S. E. Endocrine Disruptors and the Breast: Early Life Effects and Later Life Disease. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v 18, n 1, p 43-61, 2013.

MAFUVADZE, B.; BENAKANAKERE, I.; LOPEZ, F.; BESCH-WILLIFORD, C.; ELLERSIECK, M. R.; HYDER, S. M. Apigenin prevents development of medroxyprogesterone acetate-accelerated 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats. **Cancer Prev Res (Phila)**, v 4, n 8, p 1316-24, 2011.

MANDAL, A.; BISHAYEE, A. *Trianthema portulacastrum* Linn. Displays Anti-Inflammatory Responses during Chemically Induced Rat Mammary Tumorigenesis through Simultaneous and Differential Regulation of NF- κ B and Nrf2 Signaling Pathways. **Int J Mol Sci**, v 16, p 2426-45, 2015.

MANNING, H. C.; BUCK, J. R.; COOK, R. S. Mouse Models of Breast Cancer: Platforms for Discovering Precision Imaging Diagnostics and Future Cancer Medicine. **J Nucl Med**, v 57 S 1, p 60S-8S, 2016.

MARQUES, E. S.; FRODER, J. G.; CARVALHO, J. C. T.; ROSA, P. C. P.; PERAZZO, F. F.; MAISTRO, E. L. Evaluation of the Genotoxicity of Euterpe *Oleraceae* Mart. (*Arecaceae*) Fruit Oil (Açaí), in Mammalian Cells in Vivo. **Food Chem Toxicol**, v 93, p 13-9, 2016.

MIGLIETTA, A.; TOSELLI, M.; RAVARINO, N.; VENCIA, W.; CHIECCHIO, A.; BOZZO, F.; et al. COX-2 Expression in Human Breast Carcinomas: Correlation with Clinicopathological Features and Prognostic Molecular Markers. **Expert Opin Ther Targets**, v 14, n 7, p 655-64, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. 2013.

MONGA, J.; CHAUHAN, C. S.; SHARMA, M. Human Breast Adenocarcinoma Cytotoxicity and Modulation of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Mammary Carcinoma in Balb/c Mice by *Acacia catechu* (L.f.) Wild Heartwood. **Integr Cancer Ther**, v 12, n 4, p 347-62, 2012.

MUKHOPADHYAY, S.; BALLARD, B. R.; MUKHERJEE, S.; KABIR, S. M.; DAS, S. K. Beneficial effects of soy protein in the initiation and progression against dimethylbenz [a] anthracene-induced breast tumors in female rats. **Mol Cell Biochem**, v 290, p 169-76, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **PDQ adult treatment editorial board. breast cancer treatment (pdq®): health professional version**. Bethesda: 2002-2015.

NOUNOU, M.; ELAMRAWY, F.; HELAL, N.; ABDELRAOUF, K.; GODA, S.; SYED-SHA-QHATTAL, H. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. **Breast Cancer (Auckl)**, p 17, 2015.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. **Immunity**, v 41, n 1, p 49-61, 2014.

OBEID, E.; NANDA, R.; FU, Y.-X.; OLOPADE, O. I. The Role of Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer Progression (Review). **Int J Oncol**, v 43, n 1, p 5-12, 2013.

OJESWI, B. K.; KHOOBCHANDANI, M.; HAZRA, D. K.; SRIVASTAVA, M. M. Protective effect of *Thuja occidentalis* against DMBA-induced breast cancer with reference to oxidative stress. **Hum Exp Toxicol**, v 29, n 5, p 369-75, 2010.

OSTUNI, R.; KRATOCHVILL, F.; MURRAY, P. J.; NATOLI, G. Macrophages and Cancer: From Mechanisms to Therapeutic Implications. **Trends Immunol**, v 36, n 4, p 229-39, 2015.

OUHTIT, A.; ISMAIL, M. F.; OTHMAN, A.; FERNANDO, A.; ABDRABOH, M. E.; EL-KOTT, A. F.; et al. Chemoprevention of Rat Mammary Carcinogenesis by *Spirulina*. **Am J Pathol**, v 184, n 1, 2014.

QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v 141, p 39-51, 2010.

REGULSKI, M.; REGULSKA, K.; PRUKAŁA, W.; PIOTROWSKA, H.; STANISZ, B.; MURIAS, M. COX-2 Inhibitors: A Novel Strategy in the Management of Breast Cancer. **Drug Discov Today**, v 21, n 4, p 598-615, 2016.

RIBEIRO, J. C.; ANTUNES, L. M. G.; AISSA, A. F.; DARIN, J. D. C.; DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; et al. Evaluation of the Genotoxic and Antigenotoxic Effects after Acute and Subacute Treatments with Açai Pulp (*Euterpe Oleracea Mart.*) on Mice Using the Erythrocytes Micronucleus Test and the Comet Assay. **Muta Res**, v 695, n 1-2, p 22-8, 2010.

RUNOWICZ, C. D.; LEACH, C. R.; HENRY, N. L.; HENRY, K. S.; MACKEY, H. T.; COWENS-ALVARADO, R. L.; CANNADY, R. S.; et al. American Cancer Society/American Society of Clinical Oncology Breast Cancer Survivorship Care Guideline. **CA Cancer J Clin**, 2015.

RUSSO, I. H.; RUSSO, J. Mammary Gland Neoplasia in Long-Term Rodent Studies. **Environ Health Perspect**, v 104, p 938-67, 1996.

SAHARINEN, P.; EKLUND, L.; PULKKI, K.; BONO, P.; ALITALO, K. VEGF and Angiopoietin Signaling in Tumor Angiogenesis and Metastasis. **Trends Mol Med**, v 17, n 7, p 347-62, 2011.

SANTA-MARIA, C. A.; CAMP, M.; CIMINO-MATHEWS, A.; HARVEY, S.; WRIGHT, J.; STEARNS, V. Neoadjuvant Therapy for Early-Stage Breast Cancer: Current Practice, Controversies, and Future Directions. **Oncology (Williston Park)**, v 29, n 11, p 828-38, 2015.

SATHISH, S.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. Mitigation of DMBA-Induced Mammary Carcinoma in Experimental Rats by Antiangiogenic Property of Kalpaamruthaa. **J Diet Suppl**, v 8, n 2, p 144-57, 2011.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; et al. Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe Oleraceae* Mart. (Acai). **J Agric Food Chem**, v 54, n 22, p 8604-10, 2006a.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; et al. Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe Oleraceae* Mart. (Acai). **J Agric Food Chem**, v 54, n 22, p 8598-603, 2006b.

SETIA, S.; VAISH, V.; SANYAL, S. N. Chemopreventive Effects of NSAIDs as Inhibitors of Cyclooxygenase-2 and Inducers of Apoptosis in Experimental Lung Carcinogenesis. **Mol Cell Biochem**, v 366, n 1-2, p 89-99, 2012.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, v 22, p 787-95, 2012.

SILVA, D.; VIDAL, F. C.; SANTOS, D.; COSTA, M. C.; MORGADO-DÍAZ, J.; DO DESTERRO SOARES BRANDÃO NASCIMENTO, M.; DE MOURA, R. Cytotoxic Effects of *Euterpe Oleracea* Mart. in Malignant Cell Lines. **BMC Complement Altern Med**, v 14, n 1, p 175, 2014.

SIMON, S.; BINES, J.; BARRIOS, C.; NUNES, J.; GOMES, E.; PACHECO, F.; et al. Clinical Characteristics and Outcome of Treatment of Brazilian Women with Breast Cancer Treated at Public and Private Institutions – The AMAZONE Project of the Brazilian Breast Cancer Study Group (GBECAM). **Cancer Res**, v 69, n 24S, p 3082, 2009.

SINGH, B.; BERRY, J. A.; SHOHER, A.; AYERS, G. D.; WEI, C.; LUCCI, A. COX-2 Involvement in Breast Cancer Metastasis to Bone. **Oncogene**, v 26, n 26, p 3789-96, 2007.

SINGH, B.; LUCCI, A. Role of Cyclooxygenase-2 in Breast Cancer. **J Surgical Res**, v 108, n 1, p 173-9, 2002.

SOUZA, M. O. de; SILVA, L. S. e; MAGALHÃES, C. L. de B.; FIGUEIREDO, B. B. de; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; et al. The hypocholesterolemic activity of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutr Res**, v 32, p 976-84, 2012.

SPIZZO, G.; GASTL, G.; WOLF, D.; GUNSILIUS, E.; STEURER, M.; FONG, D.; et al. Correlation of COX-2 and Ep-CAM Overexpression in Human Invasive Breast Cancer and Its Impact on Survival. **Br J Cancer**, v 88, n 4, p 574-8, 2003.

STONER, G. D.; WANG, L.-S.; SEGUIN, C.; ROCHA, C.; STONER, K.; CHIU, S.; et al. Multiple Berry Types Prevent N-Nitrosomethylbenzylamine-Induced Esophageal Cancer in Rats. **Pharm Res**, v 27, n 6, p 1138-45, 2010.

THOMPSON, H. J.; SINGH, M. Rat Models of Premalignant Breast Disease. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v 5, n 4, p 409-20, 2000.

THULER, L. C. S.; MENDONÇA, G. A. Estadiamento Inicial Dos Casos de Câncer de Mama E Colo Do Útero Em Mulheres Brasileiras. **Rev Bras Ginecol Obst**, v 27, n 11, p 656-60, 2005.

TONINI, T.; ROSSI, F.; CLAUDIO, P. P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. **Oncogene**, v 22, n 42, p 6549-56, 2003.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v 65, n 2, p 87-108, 2015.

UENO, N. T.; ITO, T. D.; GRIGSBY, R. K.; BLACK, M. V.; APTED, J. ABC Conceptual Model of Effective Multidisciplinary Cancer Care. **Nat Rev Clin Oncol**, v 7, n 9, p 544-7, 2010.

UICC, Union for International Cancer Control. **TNM classification of malignant tumours**. 2002.

ULAS, A.; KOS, T.; AVCI, N.; CUBUKCU, E.; OLMEZ, O. F.; BULUT, N.; et al. Patients with HER2-Positive Early Breast Cancer Receiving Adjuvant Trastuzumab: Clinicopathological Features, Efficacy, and Factors Affecting Survival. **Asian Pac J Cancer Prev**, v 16, n 4, p 1643-9, 2015.

ULBRICHT, C.; BRIGHAM, A.; BURKE, D.; COSTA, D.; GIESE, N.; IOVIN, R.; et al. An Evidence-Based Systematic Review of Acai (*Euterpe Oleracea*) by the Natural Standard Research Collaboration. **J Diet Suppl**, v 9, n 2, p 128-47, 2012.

VAN DONGEN, J. A.; VOOGD, A. C.; FENTIMAN, I. S.; LEGRAND, C.; SYLVESTER, R. J.; TONG, D.; et al. Long-Term Results of a Randomized Trial Comparing Breast-Conserving Therapy with Mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 Trial. **J Natl Cancer Inst**, v 92, n 14, p 1143-50, 2000.

WANG, Y.; SUN, T.; WAN, D.; SHENG, L.; LI, W.; ZHU, H.; et al. Hormone Receptor Status Predicts the Clinical Outcome of Human Epidermal Growth Factor 2-Positive Metastatic Breast Cancer Patients Receiving Trastuzumab Therapy: A Multicenter Retrospective Study. **Onco Targets Ther**, v 8, p 3337-48, 2015.

WELTI, J.; LOGES, S.; DIMMELER, S.; CARMELIET, P. Recent Molecular Discoveries in Angiogenesis and Antiangiogenic Therapies in Cancer. **J Clin Invest**, v 123, n 8, p 3190-200, 2013.

XU, B.; HU, X.; JIANG, Z.; LI, H.; CHEN, J.; CUI, S.; et al. National Consensus in China on Diagnosis and Treatment of Patients with Advanced Breast Cancer. **Ann Transl Med**, v 3, n 17, p 242, 2015.

XU, F.; LI, M.; ZHANG, C.; CUI, J.; LIU, J.; LI, J.; et al. Clinicopathological and Prognostic Significance of COX-2 Immunohistochemical Expression in Breast Cancer: A Meta-Analysis. **Oncotarget**, v 8, n 4, p 6003-12, 2017.

YASMIN, R.; SIRAJ, S.; HASSAN, A.; KHAN, A. R.; ABBASI, R.; AHMAD, N. Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokines and Associated Genes in Human Malignancies. **Mediators Inflamm**, v 2015, p 201703, 2015.

ZHANG, Y.; WANG, P.; ZHOU, X.-C.; BAO, G.-Q.; LYU, Z.-M.; LIU, X.-N.; et al. Genetic Variations in the HIF1A Gene Modulate Response to Adjuvant Chemotherapy after Surgery in Patients with Colorectal Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v 15, n 11, p 4637-42, 2014.

ZHONG, B.; SHEN, H.; SUN, X.; WANG, H.; ZHANG, Y.; ZHIJUN, S. Additive Effects of Ulinastatin and Docetaxel on Growth of Breast Cancer Xenograft in Nude Mice and Expression of PGE2, IL-10, and IL-2 in Primary Breast Cancer Cells. **Cancer Biother Radiopharm**, v 27, n 4, p 252-8, 2012.

Anexo I

Tipos de tumores epiteliais segundo a 4ª edição da Classificação Histológica de Tumores da Mama da OMS

Carcinoma microinvasor
Carcinoma mamário invasor
Carcinoma ductal invasivo, SOE
Carcinoma tipo misto
Carcinoma pleomórfico
Carcinoma com células gigantes tipo osteoclasto
Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos
Carcinoma com elementos melanóticos
Carcinoma lobular invasivo
Carcinoma lobular clássico
Carcinoma lobular sólido
Carcinoma lobular alveolar
Carcinoma lobular pleomórfico
Carcinoma túbulo-lobular
Carcinoma lobular misto
Carcinoma tubular
Carcinoma cribriforme invasivo
Carcinoma com elementos medulares
Carcinoma medular
Carcinoma medular atípico
Carcinoma invasivo SOE com elementos medulares
Carcinoma mucinoso
Carcinoma com diferenciação em células em anel de sinete
Carcinoma micropapilar invasivo
Carcinoma com diferenciação apócrina
Carcinoma metaplásico sem tipo especial
Carcinoma adenoescamoso de baixo grau
Carcinoma metaplásico fibromatose-símile
Carcinoma de células escamosas
Carcinoma de células fusiformes
Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimal
Diferenciação condroide
Diferenciação óssea
Diferenciação em outros tipos mesenquimais
Carcinoma metaplásico misto
Carcinoma mioepitelial

OMS: Organização Mundial da Saúde. SOE: sem outra especificação.

Fonte: Gobbi, 2012.

Anexo II

Classificação clínica e histopatológica do câncer de mama pelo sistema TNM

T - Tamanho tumoral

- Tx - O tumor primário não pode ser avaliado
- T0 - Sem evidência de tumor primário doença de Paget
- T1 - Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
 - T1a - tumor com 0,5 cm ou menos em sua maior dimensão
 - T1b - tumor com mais de 0,5 cm e até 1 cm em sua maior dimensão
 - T1c - tumor com mais de 1 cm e até 2 cm em sua maior dimensão
- T2 - Tumor com mais de 2 cm e até 5 cm em sua maior dimensão
- T3 - Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
- T4 - Tumor de qualquer tamanho, com extensão direta à parede torácica ou à pele
 - T4a - extensão para parede torácica
 - T4b - edema (incluindo peau d'orange) ou ulceração da pele da mama ou nódulos cutâneos satélites, confinados à mesma mama
 - T4c - T4a e T4b associados
 - T4d - carcinoma inflamatório

N - Linfonodos regionais

- Nx - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
- cN0 - Ausência de metástases nos linfonodos regionais
- cN1 - Crescimento tumoral ipsilateral, sem acometimento dos linfonodos axilares
- cN2 - Crescimento tumoral ipsilateral, acometendo linfonodos axilares ou internos
- cN3 - Acometimento linfonodos supraclavicular ou ambos axilares ipsilateral e internos
- pN0 - Sem acometimento dos linfonodos
- pN1 - Acometimento de 1 a 3 linfonodos
- pN1mi - Tumor no linfonodo com tamanho $\leq 2,0$
- pN2 - Acometimento de 4 a 9 linfonodos
- pN3 - Acometimento ≥ 10 linfonodos

M - metástases a distância

- Mx - A presença de metástases a distância não pode ser avaliada
- M0 - Ausência de metástases à distância
- M1 - Metástases à distância (incluindo as metástases nos linfonodos supraclaviculares)

A categoria N (linfonodos regionais) têm duas classificações, a clínica, representada pela letra "c" e a patológica, representada pela letra "p".

Fonte: Sociedade Brasileira de Mastologia, 2004.

Anexo III



Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEZO)



Parecer nº 008

Pesquisador Responsável: Prof. Jamila Alessandra Perini Machado

Tipo de Pesquisa: Pesquisa, Extensão/Treinamento

Instituição onde será desenvolvido: UEZO

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: “Estabelecimento de modelo experimental de câncer de mama e endometriose para testar biofármacos inibidores do processo angiogênico”, considero que o projeto se encontra adequado e satisfatório de acordo com as exigências das Resoluções que regem esta Comissão.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável a realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Norma de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste.

Rio de Janeiro, 06 de novembro de 2014

Prof. Michel Alexandre Villani Gantus

Coordenador da CEUA-UEZO

Anexo IV

ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE, AND BIOTECHNOLOGY, 2016
http://dx.doi.org/10.3109/21691401.2016.1163717



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Comparison of biodistribution profile of monoclonal antibodies nanoparticles and aptamers in rats with breast cancer

Cristal Cerqueira-Coutinho^a, Sotiris Missailidis^b, Jéssica Alessandra-Perini^{b,c}, Daniel Escorsim Machado^b, Jamila Alessandra Perini^{b,c,d} and Ralph Santos-Oliveira^e

^aRio de Janeiro Federal University, Eloisa Mano Macromolecules Institute, Rio de Janeiro, Brazil; ^bLaboratory of Research in Pharmaceutical Sciences, Zona Oeste State University, Rio de Janeiro, Brazil; ^cGraduate Program in Public Health and Environment National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; ^dNational Institute of Traumatology and Orthopedics, Rio de Janeiro, Brazil; ^eLaboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Zona Oeste State University, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

The use of monoclonal antibodies and aptamers is growing every single day, as the use of nanoparticle systems. Although most of the products are under investigation, there are a few commercialized products available at the market, for human consume. In this study, we have compared three formulations (aptamer anti-MUC1, monoclonal antibody – Trastuzumab and monoclonal antibodies nanoparticles – PLA/PVA/MMT trastuzumab) to identify their profile as also to understand their behavior into an alive biological system. In this direction the radiolabeling of the products were done and they were all tested in animals (*in vivo*) in two conditions: healthy rats and breast cancer induced animals. The results showed that the nanoparticle has the better biodistribution profile, followed by the aptamer. We conclude that more studies and a global effort to elucidate the biological behavior of drugs and especially nano-drugs are necessary.

ARTICLE HISTORY

Received 9 October 2015
Accepted 6 March 2016
Published online 25 March 2016

KEYWORDS

Aptamers; nanoparticles;
nano-radiopharmaceuticals;
radiopharmaceuticals

Introduction

Breast cancer is a complex heterogeneous disease and remains the first cause of death by cancer among women worldwide, it presents a great variability on the histopathological and molecular profile (Ferlay et al. 2010, Guiu et al. 2012, Sorlie et al. 2001). The therapeutic regimen of breast cancer can be based on the tumor status of the epidermal growth factor receptor 2 (HER2) (Huober et al. 2010), which is a predictive of treatment responses in trastuzumab (Goldhirsch et al. 2001).

Conventional histopathological characteristics remain relevant to the prognostic of survival (Soerjomataram et al. 2008), however, new methods of diagnosis are searched, in effort to advance diagnosis, prognostic and guide therapy selection.

Trastuzumab is a monoclonal antibody that interferes with the HER2 receptor and it could be used to treat HER2-positive breast cancer (Hudis 2007). This drug enhanced overall survival in the metastatic stage from 20 months to 25 months (Nahta and Esteva 2003). In addition, there are molecules such as aptamers, chemically synthesized oligonucleotides that could recognize peptides and proteins, thus being applicable for therapeutics and diagnostics (Iliuk et al. 2011, Thivyanathan and Gorenstein 2012). Aptamers bind to wide range of relevant proteins with affinities and specificities that are comparable to antibodies (Keefe et al. 2010).

In this sense, polymeric nanoparticles could be used to deliver drugs in cancer therapy and diagnostics. Poly(lactic

acid) (PLA) is a biodegradable polymer widely applied to biological purposes since it is non-toxic and easily eliminated from the body (Liang et al. 2015, Wang et al. 2010).

The present study aimed to investigate and compare the biodistribution profiles of a monoclonal antibody PLA nanoparticle and the aptamer anti-MUC1, both labeled with technetium-99m (^{99m}Tc) in experimental breast cancer model induced in animals.

Study design

In this study, three different formulations were used to test the better option of a radiopharmaceutical for breast cancer imaging. Thus, trastuzumab (Roche Laboratories, Basel, Switzerland), Aptamer Anti-MUC1 (produced by Dr. Sotiris Missailidis Rio de Janeiro, Brazil), and PLA/PVA/MMT trastuzumab nanoparticle were tested in induced animals with breast cancer (three animals for each sample).

Materials

PLA (MW 40–100 kDa) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Polyvinyl alcohol (PVA, MW 18 kDa, 85% hydrolyzed), a surfactant, was also purchased from Sigma Aldrich. Trastuzumab was purchased from Roche Laboratories. The aptamer anti-MUC1 was given by Dr. Sotiris Missailidis.

CONTACT Dr Ralph Santos-Oliveira ralph.uezo@gmail.com Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Zona Oeste State University, Rua Helio de Almeida 75, Rio de Janeiro 21941906, Brazil

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Production of PLA/PVA/MMT/trastuzumab nanoparticles

To formulate the nanoparticles, 50 mg of PLA was dissolved in 2 mL of dichloromethane. Then, this solution was poured into 200 μ L of a 0.1% aqueous solution of a PVA solution (aqueous phase 1), thereby forming a water/oil emulsion. This process was carried out under stirring using a sonicator, and an ice bath was used to prevent heating of the sample and inappropriate premature evaporation of the solvent. Two cycles of sonication (45 W power) for 30 s were used with a 10 s interval between them.

Subsequently, the formed emulsion was then re-emulsified with 4 mL of a 0.7% aqueous solution of PVA and 0.042% clay (second aqueous phase), forming a water/oil/water emulsion. This procedure was performed using two cycles of sonication for 1 min with a 10 s-interval between them. The dichloromethane was evaporated under reduced pressure at room temperature on a rotary evaporator for 20 min. Finally, the nanoparticles were concentrated by ultracentrifugation at 20,000 rpm at 25 °C for 20 min. The nanoparticles were re-suspended in purified water and re-centrifuged twice more in order to remove possible residues of the polymer, surfactant, and organic solvent.

Labeling with Technetium-99 m

Trastuzumab, Aptamer Anti-MUC1, and PLA/PVA/MMT trastuzumab (150 μ L of each) were labeled with technetium-99 m (^{99m}Tc) in an 80 μ g/mL solution of stannous chloride (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) for 20 min at room temperature. This mixture was then incubated with a solution of 3.7 MBq (0.3 mL ^{99m}Tc in sodium chloride 0.9%) for 10 min at room temperature.

The quality of labeling process of each single labeling was confirmed by TLC (thin layer chromatography) using acetone as mobile phase (Albernaz et al. 2014, Carvalho Patricio et al. 2013, Leite Diniz et al. 2010).

Induced animals – breast cancer model

Nine female Wistar rats, eight week-old and weighing ~250–300 g were induced with breast cancer. The rats were purchased from Zona Oeste State University (UEZO), Rio de Janeiro, Brazil and the protocols were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee – UEZO (Protocol no. 008/14). The animals were maintained under standard conditions of light (12 h light/12 h dark cycle), humidity, temperature, and were fed a standard diet and water *ad libitum*.

For induction of breast cancer, the animals received a single subcutaneous injection of 25 mg/kg DMBA in the breast region (7,12-dimethyl benzo anthracene, Sigma Chemicals) in vehicle (0.5 mL of sunflower oil and 0.5 mL of saline). After 16 weeks, macroscopic and microscopic analyses were performed for tumor confirmation (Di Pasqua et al. 2012, Di Pasqua et al. 2013).

Biodistribution of labeled compounds – pharmacokinetic evaluation

The biodistribution was evaluated in nine female Wistar rats. Three different samples were prepared for injection into

Table 1. Percentage of labeled PLA/PVA/MMT trastuzumab observed over time, after ascending chromatograms of ^{99m}Tc compared with free pertechnetate ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$)

Time (h)	Labeling (%)
0	99.4 $\pm$ 0.4%
1	99.0 $\pm$ 0.9%
2	98.9 $\pm$ 0.8%
3	98.9 $\pm$ 1.2%
4	98.5 $\pm$ 0.5%

Table 2. Percentage of labeled Aptamer Anti-MUC1 observed over time, after ascending chromatograms of ^{99m}Tc compared with free pertechnetate ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$)

Time (h)	Labeling (%)
0	98.8 $\pm$ 0.4%
1	98.5 $\pm$ 0.9%
2	97.9 $\pm$ 0.8%
3	98.3 $\pm$ 1.2%
4	98.5 $\pm$ 0.5%

Table 3. Percentage of labeled trastuzumab observed over time, after ascending chromatograms of ^{99m}Tc compared with free pertechnetate ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$)

Time (h)	Labeling (%)
0	99.2 $\pm$ 0.4%
1	98.7 $\pm$ 0.9%
2	98.9 $\pm$ 0.8%
3	97.3 $\pm$ 1.2%
4	97.5 $\pm$ 0.5%

animals: PLA/PVA/MMT trastuzumab nanoparticles labeled with ^{99m}Tc , Aptamer Anti-MUC1 labeled with ^{99m}Tc , and free trastuzumab labeled with ^{99m}Tc (control). Labeled samples (1.2 MBq per 0.2 mL) were injected by retro-orbital via (Patricio et al. 2015, Wasserman et al. 2014).

Animals were sacrificed after 120 min and their organs were removed and weighed. Radioactivity uptake was assessed using a gamma counter. Results were expressed as dose per organ (%ID/organ). The Institutional Review Board and the Animal Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (no. 23076.002362/2010–37) approved all studies (Cerqueira-Coutinho et al. 2015, Pinto et al. 2014).

Results and discussion

Labeling process

All particles (PLA/PVA/MMT trastuzumab and Aptamer Anti-MUC1) and the free trastuzumab were successfully labeled (>90%) (Tables 1–3).

Induced animals – breast cancer model

After 16 weeks, a tumor was found in the breast region of female rats with a cystic pattern, vascularized and fibrotic (Figure 1A). These lesions were confirmed through the histological analysis, and they display atypical tumor cells rather grouped with hyperchromasia separated by fibrovascular tissue.

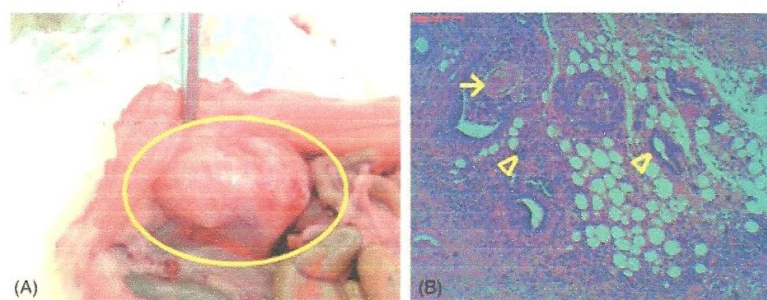


Figure 1. Morphological characteristics of rat mammary carcinoma lesions. (A) Macroscopic observation; (B) histological confirmation revealed by hematoxylin and eosin coloration. Most of the lesions were well vascularized, cystic, and very fibrotic (circle). Histologically, observed area of invasive carcinoma with neoplastic structures with well-stained cells, spreading the mammary stroma and infiltrating the adjacent adipose tissue (arrowheads). The arrow points neoplastic tissue with the presence of squamous cells and keratin deposit. Magnification $\times 200$

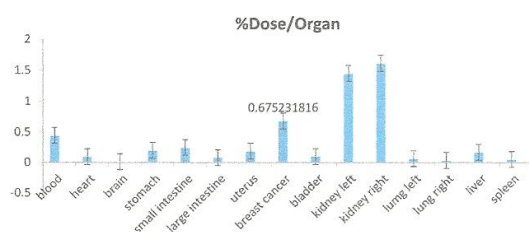


Figure 2. Biodistribution of aptamer anti-MUC1 labeled with ^{99m}Tc in induced animal with breast cancer

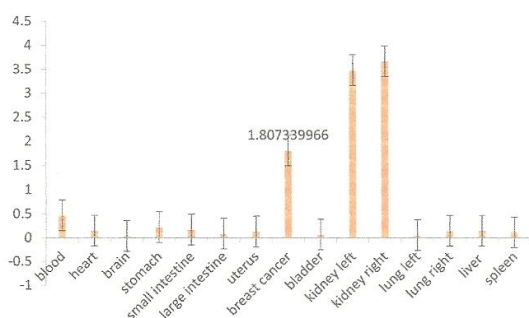


Figure 3. Biodistribution of PLA/PVA/MMT trastuzumab nanoparticles labelled with ^{99m}Tc in induced animal with breast cancer

We also observed neoplastic cells infiltrating the adjacent adipose tissue with the presence of squamous cells and keratin deposit (Rodriguez et al. 2012) (Figure 1B).

Biodistribution

The biodistribution assays were performed and the results are expressed in Figures 2–4.

According to results of biodistribution, it is possible to observe that the higher uptake was associated to the nanoparticle (over the double of the uptake of the aptamer Anti-MUC1 and the free monoclonal antibody, trastuzumab), confirming that nanoparticles have better biodistribution and biodirection than the free drug. It is also important to notice that aptamer Anti-MUC1 has higher affinity than the

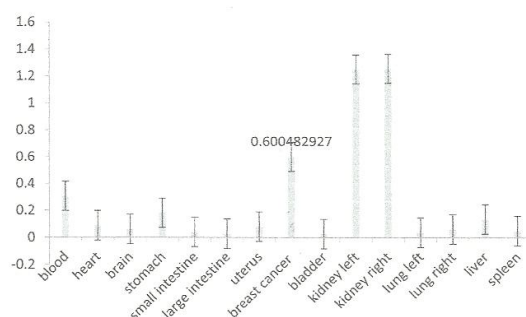


Figure 4. Biodistribution of free trastuzumab labelled with ^{99m}Tc in induced animals with breast cancer

monoclonal antibody, confirming that this class of drug should be more studied, especially to breast cancer. All the three formulations showed an excellent clearance and, subsequently, a low biological half-life of the remaining particles in blood. The presence in blood and heart may be very meaningful because it is normally related to affinity by blood proteins (albumin mostly). In this case, all showed a good affinity. Regarding the recognition by the immunological system, both nanoparticle and aptamer showed the lower levels of recognition which is very desirable on drug delivery system, and corroborates the findings in blood and heart (Carvalho Patricio et al. 2013). The results are excellent for brain uptake, with exception of the free drug. In most cases, only 0.6% of radiopharmaceutical crosses brain barriers, which is required for imaging. In the case of free trastuzumab, 2% crossed the brain barrier and reached the brain, which means that for imaging or therapeutic radiopharmaceutical great areas of the brain (mostly healthy) would receive unnecessary radiation during the examination, which is not recommended. It is also important to notice that although there are many vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in intestine (small and large) the uptake in this region was lower than the cancer region, confirming the over-expression of these ligands on cancer state. Also the nanoparticle was more effective to dribble those receptors than aptamers and free drug, confirming that the drug delivery system (nanoparticle) may be better than the conventional treatment.

Conclusions

The results showed that nanoparticles presented a better bio-distribution than free drugs as well as aptamers in breast cancer model. Also it is possible to think the use of the nanoparticle as a drug delivery system of radiopharmaceuticals for breast cancer imaging.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

Funding information

The authors would like to thank the National Scientific and Technological Research Council (CNPQ) and the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ) for funding.

References

- Albernaz M, Ospina CA, Rossi AA, Santos-Oliveira R. 2014. Radiolabelled nanohydroxyapatite with ^{99m}Tc : perspectives to nanoradiopharmaceuticals construction. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 42:88–91.
- Carvalho Patrício BF, Albernaz MS, Santos-Oliveira R. 2013. Development of nanoradiopharmaceuticals by labeling polymer nanoparticles with ^{99m}Tc . *World J Nucl Med*. 12:24–26.
- Cerqueira-Coutinho C, Santos-Oliveira R, dos Santos E, Mansur CR. 2015. Development of a photoprotective and antioxidant nanoemulsion containing chitosan as an agent for improving skin retention. *Eng Life Sci*. 1:1–12.
- Di Pasqua AJ, Miller ML, Lu X, Peng L, Jay M. 2012. Tumor accumulation of neutron-activatable holmium-containing mesoporous silica nanoparticles in an orthotopic non-small cell lung cancer mouse model. *Inorg Chim Acta*. 393:334–336.
- Di Pasqua AJ, Yuan H, Chung Y, Kim J-K, Huckle JE, Li C, et al. 2013. Neutron-activatable holmium-containing mesoporous silica nanoparticles as a potential radionuclide therapeutic agent for ovarian cancer. *J Nucl Med*. 54:1111–1116.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 127:2893–2917.
- Goldhirsch A, Gelber RD, Yothers G, Gray RJ, Green S, Bryant J, et al. 2001. Adjuvant therapy for very young women with breast cancer: need for tailored treatments. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 30:44–51.
- Guiu S, Michiels S, Andre F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, et al. 2012. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol*. 23:2997–3006.
- Hudis CA. 2007. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 357:39–51.
- Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. 2010. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat*. 124:133–140.
- Iliuk AB, Hu L, Tao WA. 2011. Aptamer in bioanalytical applications. *Anal Chem*. 83:4440–4452.
- Keefe AD, Pai S, Ellington A. 2010. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 9:537–550.
- Leite Diniz C, DaPieve C, Perkins A, Haddleton DM, Bernardo-Filho M, Santos-Oliveira R, et al. 2010. 227 Pharmacokinetic and biodistribution studies of anti MUC1 PEGylated aptamers with potential in the targeted radiotherapy of breast cancer. *Eur J Cancer Suppl*. 8:59–60.
- Liang Z, Yang N, Jiang Y, Hou C, Zheng J, Shi J, et al. 2015. Targeting docetaxel-PLA nanoparticles simultaneously inhibit tumor growth and liver metastases of small cell lung cancer. *Int J Pharm*. 494:337–345.
- Nahta R, Esteva FJ. 2003. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin Cancer Res*. 9:5078–5084.
- Patrício B, Neto O, Albernaz M, Santos-Oliveira R. 2015. Behavior of EDTMP (ethylene-diaminetetramethylene-phosphonate)-nanoparticles in blood. *Consid Site Inject*. 10:323–325.
- Pinto SR, Sarcinelle MA, de Souza Albernaz M, da Silva FM, Seabra SH, Almeida do Nascimento P, et al. 2014. In vivo studies: comparing the administration via and the impact on the biodistribution of radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol*. 41:772–774.
- Rodriguez FJ, Orr BA, Ligon KL, Eberhart CG. 2012. Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget*. 3:98–106.
- Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. 2008. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treatment*. 107:309–330.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:10869–10874.
- Thiviyanathan V, Gorenstein DG. 2012. Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. *Proteom Clin Appl*. 6:563–573.
- Wang T, Petrenko VA, Torchilin VP. 2010. Paclitaxel-loaded polymeric micelles modified with MCF-7 cell-specific phage protein: enhanced binding to target cancer cells and increased cytotoxicity. *Mol Pharm*. 7:1007–1014.
- Wasserman MAV, Orlando MMC, Zubillaga M, Sousa-Batista AJ, Al-Qahtani M, Santos-Oliveira R. 2014. Nanoradiopharmaceuticals for nanomedicine: building the future. *Recent Pat Nanomed*. 4:1–6.

Anexo V



RESEARCH ARTICLE

Euterpe oleracea Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis

Daniel Escorsim Machado¹, Karina Cristina Rodrigues-Baptista^{1,2}, Jessica Alessandra-Perini^{1,2}, Roberto Soares de Moura³, Thiago Alves dos Santos^{1,4}, Kariny Gomes Pereira¹, Yasmin Marinho da Silva¹, Pergentino José Cunha Souza⁵, Luiz Eurico Nasciutti⁶, JAMILA ALESSANDRA PERINI^{1,2*}

1 Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **2** Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **3** Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **4** Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, **5** Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil, **6** Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* jamilaperini@yahoo.com.br



OPEN ACCESS

Citation: Machado DE, Rodrigues-Baptista KC, Alessandra-Perini J, Soares de Moura R, Santos TAd, Pereira KG, et al. (2016) *Euterpe oleracea* Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis. PLoS ONE 11(11): e0166059. doi:10.1371/journal.pone.0166059

Editor: Shengtao Zhou, West China Second Hospital, Sichuan University, CHINA

Received: May 5, 2016

Accepted: October 21, 2016

Published: November 16, 2016

Copyright: © 2016 Machado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, Brazil (E-26/010.002619/2014 and E-26/010.002644/2014).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

This study investigated the therapeutic potential of *Euterpe oleracea* extract (açaí) on the growth and survival of endometriotic lesions using an experimental model. Twenty female Sprague-Dawley rats were randomized into two groups after the implantation and establishment of autologous endometrium onto the peritoneum abdominal wall and treated with 200 mg/kg hydroalcoholic solution extract from açaí stone or vehicle via gastric tube for 30 consecutive days. Body weight, lesion surface areas, histological and immunohistochemistry analyses of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor-2 (VEGFR-2), metalloproteinase-9 (MMP-9), cyclooxygenase-2 (COX-2) and F4-80 were performed. Levels of VEGF, VEGFR-2, MMP-9 and COX-2 mRNA were measured. Flow cytometry of F4-80 was performed, and ELISA immunoassays measured prostaglandin E₂ (PGE₂), VEGF and nitric oxide (NO) and concentrations. Macrophage cell line J774.G8 was treated with 10, 20, and 40 µg/mL of açaí for 24, 48 and 72 h, and cell viability was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. Açaí treatment significantly decreased the implant size, and histological examination indicated atrophy and regression. A reduction in immunostaining and mRNA expression of VEGF, MMP-9 and COX-2 was observed, and F4-80 was lower in the treated group than the control group. The treated group also exhibited lower concentrations of PGE₂, VEGF and NO compared to the control group. Macrophages cells treated with 20 and 40 µg/ml of açaí reduced cell viability in about 50% after 24, 48 and 72 h. Our results suggest that açaí effectively suppressed the establishment and growth of endometriotic lesions, and this agent is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for endometriosis.

Introduction

Endometriosis is defined as the presence of functional endometrium outside the uterine cavity that consists of proliferating functional endometrial glands and stroma [1]. It is an inflammatory disease associated with chronic pelvic pain and infertility, and it results in a markedly reduced quality of life [2]. The prevalence of the disease is in 5–10% of women of reproductive age [3].

The exact pathogenic mechanisms of endometriosis are not known, but several studies demonstrated that the development of a new vascular supply was essential for the establishment and growth of endometriotic lesions [4–6]. Various lines of evidence indicate that growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF), cytokines and prostaglandins promote the development of endometriosis [7–9]. Notably, endometriotic lesions exhibit increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression compared to eutopic endometrium [10]. COX-2 and VEGF studies are associated with endometriosis and reinforce the hypothesis that the angiogenesis process and inflammation are crucial to the pathophysiology of this disease [8,11,12].

The current treatment for endometriosis is medical and/or surgical. Hormone therapy is the commonly used medical treatment, and it involves oral contraceptives, progestogens and gonadotropin-releasing hormone agonists, which induce a hypoestrogenic state [13]. However, these therapies can only be prescribed for a short time because of serious adverse effects, such as pseudomenopause, massive hemorrhage and bone density loss. The disease recurs within 3–5 years in 30–50% of women after surgical removal of endometriosis lesions [14]. Therefore, the search for additional strategies to effectively treat endometriosis is fundamental.

Euterpe oleracea Mart. (Arecaceae), popularly known as “açaí”, is an economically important plant that is found widely in the Amazon region of Brazil. Chemical studies demonstrated that açaí exhibits a diverse composition of hydroxybenzoic acids, antioxidant polyphenolics, flavan-3-ols, and anthocyanins, predominantly cyanidin 3-O-rutinoside and cyanidin 3-O-glucuronide [15–19]. Açaí exhibits antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory and anticancer activities because of its high level of phytochemicals [20–26]. Açaí exhibits exceptional activity against superoxides, inhibits reactive oxygen species (ROS) formation and may inhibit COX-2 [27]. A significant antinociceptive effect of açaí was observed in a spinal nerve ligation model in rats, which suggests the possible development of a new analgesic drug [26]. Recently, Marques *et al.* conducted cytogenetic tests with three doses of açaí in rat cells, and showed that açaí had no significant genotoxic effects in the analyzed cells [28].

Endometriosis is an inflammatory disease and açaí extract may be an effective treatment strategy. The present study investigated the pharmacological effects of açaí on the establishment and growth of endometriotic lesions using an experimental model. We used several assays to investigate anti-inflammatory functions, including an activated macrophage study and nitric oxide (NO) assay. We also investigated whether açaí modulated the angiogenesis process to better understand the mechanisms of action of the extract in the development of endometriosis.

Materials and Methods

Preparation of açaí extract

Açaí fruits were obtained from the Amazon Bay (Belém do Pará, Pará, Brazil), excicata number 29052 Museu Goeldi–Belém do Pará, and these study has been authorized by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (Authorization: 010564/2015-2). We used in our study the hydroalcoholic solution extracted from açaí stones, as previously

described [22,23,26]. Briefly, 200 g of açaí stone were boiled in 400 ml of distilled water for 10 min with mixed for 2 min. The decoction was cooled to room temperature and extracted by addition of 400 ml of ethanol with shaking for 2 h. The hydroalcoholic extract was stored (4°C) for 10 days and filtered through Whatman filter paper. Ethanol was evaporated under low pressure at 55°C. The extract was lyophilized (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda São Paulo) at temperatures from -30 to -40°C and under a vacuum of 200 mmHg, and frozen at -20°C.

Experimental animal model

Animals were treated in accordance with protocols approved by the State University of West Zone (UEZO) Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA), protocol code CEUA-UEZO-002/2013, and all experiments were conducted in accordance with the ethical guidelines from the CEUA and the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>, 8th Edition; 2011).

Twenty female Sprague-Dawley rats (250–300 g) were used after reaching maturity at 8 weeks of age and were housed in polyethylene cages in the Bioterium of UEZO, and were kept at a constant temperature (25°C) under a 12-h light/dark cycle with free access to food and water.

With use of the method described by Vernon and Wilson [29], the animals were anesthetized with intramuscular injection of ketamine and xylazine. The abdomen was opened through a 3-cm midline incision to expose the uterus. One uterine horn was removed and the segment was placed in phosphate-buffered saline at 37°C and split longitudinally, 5×5mm pieces were sectioned and anchored with the endometrium side onto the peritoneum of the ventral abdominal wall by nonadsorbable polypropylene sutures (6–0 Prolene, Ethicon, Piscataway, NJ). Then, the abdomen was closed and the animals were allowed to recover from anesthesia.

Animal Treatment

Two weeks after the initial implant, ventral midline laparotomy was performed to determine the attachment and viability of endometrial explants. The animals were divided randomly into two groups of each ten animals: açaí group was treated with daily 200 mg/kg body weight, dissolved in saline, by gastric tube for 30 consecutive days, and control group received saline as vehicle by gastric tube for 30 consecutive days. Body weight was measured every three days. After treatment, the rats were euthanized by anesthesia overdose, the peritoneal fluid was collected to flow cytometry, ELISA immunoassay and NO dosage, and the surface areas of the explant (length x width) were evaluated using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MN). Each sample was dissected and immediately divided into one piece that was fixed in 10% buffered formalin and paraffin embedded for histologic and immunohistochemical studies, and another piece that was frozen in liquid nitrogen for RNA extraction.

Histology and Immunohistochemistry

Formalin-fixed tissues were paraffin-embedded and cut into 4-micrometers-thick sections. Part of the sections were stained with Harris hematoxylin and eosin (HE), and examined microscopically at 200× magnification for the presence of histological hallmarks of endometriosis, such as endometrial glands and stroma. The other paraffin-embedded tissue sections were placed on silane-treated slides, and maintained at room temperature, as previously described [30]. Sections were incubated with the following antibodies: monoclonal antibody against VEGF SC-57496 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:100 dilution,

monoclonal antibody against Flk-1 SC-6251 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:100 dilution, polyclonal antibody against metalloproteinase-9 (MMP-9) SC-6840 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:200 dilution, polyclonal antibody against COX-2 SC-1747 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:100 dilution, and monoclonal antibody against F4-80 macrophage antigen SC-26642 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:200 dilution. Incubations were carried out overnight and then revealed using LSAB2 Kit HRP, rat (Dako-Cytomation, Carpinteria, CA) with diaminobenzidine (3,3'-diaminobenzidine tablets; Sigma, St. Louis, MO) as the chromogen and counterstained with hematoxylin. For each case, negative control slides consisted of sections incubated with antibody vehicle or no immune rabbit or mouse serum.

Morphometric analysis

All tissues were examined by two blinded observers using a 400× magnification on light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) connected to a digital camera (Coolpix 990; Nikon). Ten fields of an immunostained section (VEGF, VEGFR-2, MMP-9, COX-2 and F4-80) were chosen at random and captured from each specimen. Quantification was assessed on captured high-quality images (2048 × 1536 pixels buffer) using the Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Data were stored in Adobe Photoshop, version 3.0, to enable uneven illumination and background color to be corrected. Histologic scores (H) for VEGF, VEGFR-2, MMP-9, COX-2 and F4-80 were calculated using the formula $H = \Sigma Pi$, where I is the intensity ranging from 0 (negative cells) to 3 (deeply staining cells) and P is the percentage of staining cells for each given i , with P values of 1, 2, 3, 4, and 5 indicating <15%, 15–50%, 50–85%, >85%, and 100% positive-staining cells, respectively. The staining result was expressed as mean ± standard deviations.

TaqMan real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

The m-RNA levels were quantified by TaqMan real-time polymerase chain reaction. RNA from endometriosis samples was isolated using the Trizol[®] reagent according to the manufacturer's instructions, and quantified by the Nanodrop[®] spectrophotometer. Two micrograms of total RNA was used as a template for cDNA synthesis, using the SuperScript II[®] reverse transcriptase kit (Invitrogen[®]). TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]) and a validated TaqMan assay was purchased from Applied Biosystems, and were used to quantify mouse *VEGF* (Mm01281449_m1), kinase insert domain receptor (*KDR*), gene which encodes VEGFR-2 (Mm01222421_m1), *MMP-9* (Mm004422991_m1) and *PTGS*, gene which encodes COX-2 (Mm00478374_m1) expression levels, with *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* (Mm99999915_g1) as an endogenous control. Triplicate TaqMan PCR assays for each gene target were performed in cDNA samples. Real-time reactions were conducted in a 7500 Real-Time thermocycler (Applied Biosystems[®]). The relative quantification of the target genes was performed using the Delta-Delta Ct method.

ELISA Immunoassay

Peritoneal fluid was collected by rinsing the abdominal cavity with 10 mL of PBS and immediately centrifuged at 1500 rpm during 10 min. Supernatants were stored at -70°C until assayed for VEGF and PGE₂ by use of an enzyme immunoassay kit (Boster Biological Technology, Pleasanton, CA and Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), according to manufacturer's instructions. The concentrations were calculated from standard curves and all samples were assessed in triplicate. The VEGF and PGE₂ measurement were performed by an automatic plate reader

(Spectra Max; Molecular Devices, Sunnyvale, Calif) controlled by SoftMax software (Molecular Devices).

Flow cytometry

Peritoneal fluid was obtained *ex vivo* from rat after the treatments by washing twice with PBS, pH 7.2 containing 3% Fetal Bovine Serum (FBS) for flow cytometry analysis. For the control group, the same procedure was conducted. The cells were incubated with Fc blocking (clone 2.4G2) for 10 min. Before, the cells were incubated with monoclonal antibody FITC anti-F4/-80 (BD Biosciences, USA). Samples were analyzed on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, USA), 10,000 events were counted for each animal sample and the data was analyzed using CellQuest (BD Biosciences, USA) and WinMDI 2.9 software packages.

Nitric oxide analysis

The production of NO was performed as described by Green *et al.* [31]. Supernatants were mixed in a ratio of 1:1 with the Griess reagent (1:1 volume 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid in deionized water with an equal volume of 0.1% N-[1-naphthyl]-ethylenediamine in deionized water). After 10 minutes, the mixture was read in an ELISA reader (540 nm) and quantification of NO production was based on a sodium nitrite standard curve.

Cell Culture and viability assay

The mouse macrophage cell line J774.G8 were grown in plastic bottles in a RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO-Life Technologies, Rockville, MD), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), glutamine (2 mM) and HEPES (15 mM; Biochrom AG) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ (S1 Fig).

When cultures formed a confluent, monolayer cells were scrapped, centrifuged and put to adhere in 96 wells plate with RPMI at a density of 2×10^4 cell/ml. The cultured cells were treated with 10, 20, and 40 µg/ml of the Açaí extracts for 24, 48 and 72 h. The supernatant was removed, and 10 µl of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) in RPMI medium was added to each well. Cells were incubated in a CO₂ chamber for 3 h with protection from light. After the medium were aspirated, 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cells to dissolve the formazan. The absorbance at 538 nm was measured with a Spectra Max 190 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviations (SD). Statistical comparisons between treated group and control were performed with Student t-test. For VEGF, VEGFR-2, MMP-9, COX-2 and F4-80 morphometric analysis, statistical calculations were carried out with use of the Stat-Xact-5 software program (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA). The relative quantification of the target genes was carried out using Delta-Delta Ct method. Cell culture and viability assay experiments were performed in triplicate ($n = 3$) and the data were expressed as mean $\pm$ SD. The Student-Newman-Keuls test was used to assess the presence of statistical differences between the groups when a statistically significant association was described by ANOVA. The level of significance for significant difference between groups was set at $P < 0.05$ in all analyses.

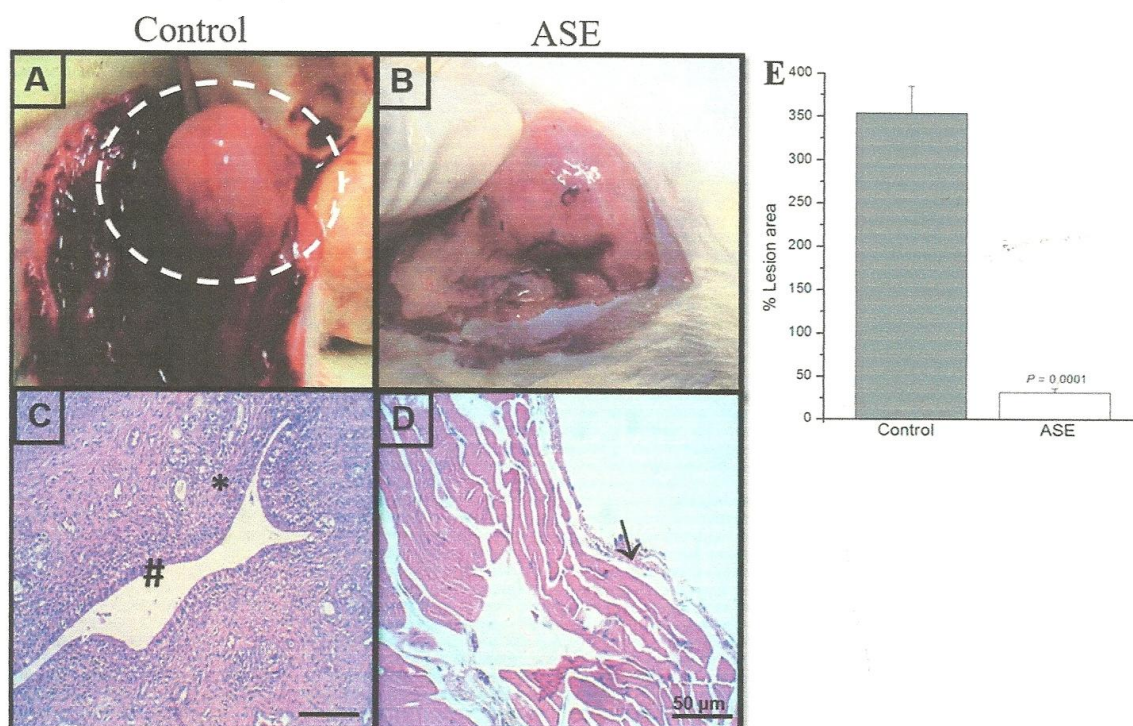


Fig 1. Morphological characteristics of rat peritoneal endometriotic lesions in control and açaí treated groups. In the control group (A), the lesions were cystic and vascularized and resembled human peritoneal endometriosis. In the açaí group (B), a drastic reduction in the growth of the lesions was visualized. Histologically, the control group (C) showed the presence of endometrial glands (#) and stroma cells (*), which confirmed the viability of lesions. In the açaí group (D), there was tissue atrophy and regression of lesions (→). Measurements of the lesion area demonstrated a statistically significant difference between the groups (E).

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g001

Results

Açaí Suppresses Endometriosis Growth

The endometrial explants formed viable cystic and well-vascularized lesions after 15 days in all 20 animals (Fig 1A). The histopathological results revealed typical endometrial components, such as glands and stroma, which confirmed the viability of the lesions (Fig 1C). The maintenance and growth of the lesions were suppressed in the treated animals group, and an important decrease in implant size was observed (Fig 1B). The histological analyses revealed atrophy and regression of the lesion areas (Fig 1D). Measurements of the lesions area confirmed these observations, which were significantly different between the two groups (Fig 1E). There was no significant difference in weight over time between the treated açaí group and the control group (data not shown).

Açaí Inhibits Angiogenesis in Experimental Endometriosis

The angiogenesis process was investigated using mRNA expression, immunostaining and ELISA immunoassays based on MMP-9, VEGF and its receptor VEGFR-2 (S1 Table).

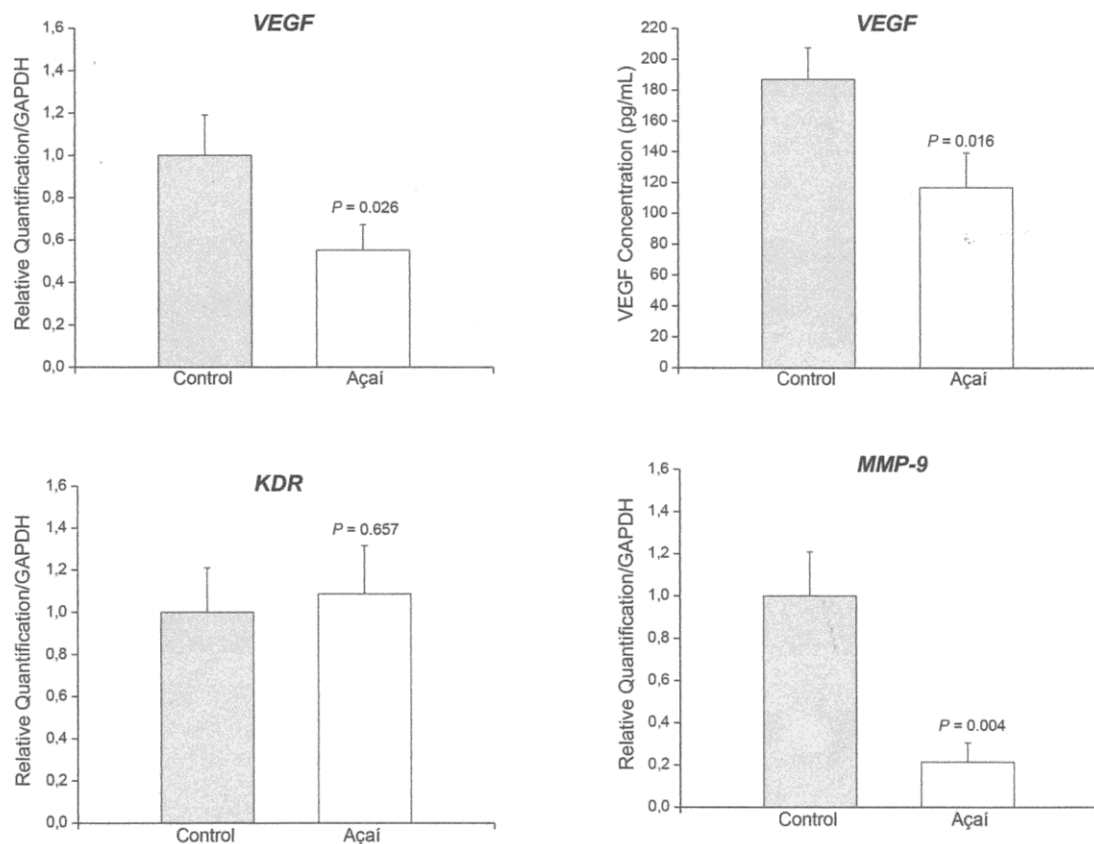


Fig 2. Açaí inhibits angiogenesis in experimental endometriosis. Expression of mRNA encoding for VEGF (A), KDR (C) and MMP-9 (D) assayed using RT-PCR. VEGF concentrations (B) were measured using ELISA immunoassays in control endometriosis lesions and lesions treated with açaí. The levels of VEGF and MMP-9 mRNA transcripts and VEGF concentrations in the treated endometriotic lesions were significantly lower than the levels in the control lesions.

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g002

Quantitative real-time PCR demonstrated suppression of the levels of VEGF (Fig 2A) and MMP-9 (Fig 2D) mRNA transcripts, and ELISA revealed a decrease in VEGF concentration (Fig 2B) in the endometriotic lesions treated compared to the control group. However, KDR mRNA transcripts were not different among the two groups (Fig 2C). VEGF, VEGFR-2 and MMP-9 immunoreactivity was detected in the lesions, predominantly in the stroma, around the glands, and in the cytoplasm of endothelial cells in non-treated endometriosis. The distribution of these three angiogenic markers decreased in endometriosis animals treated with açaí (Fig 3D, 3E and 3F) compared to the control group (Fig 3A, 3B and 3C). Histomorphometry evaluations of VEGF, VEGFR-2 and MMP-9 confirmed the observation of significant decreases ($P = .0001$) in these markers in endometriosis animals treated with açaí (2.5 ± 0.9 , 2.8 ± 0.6 and 4.2 ± 0.8 , respectively) compared to the control group (22.1 ± 1.1 , 25.4 ± 2.5 and 27.5 ± 2.4 , respectively).

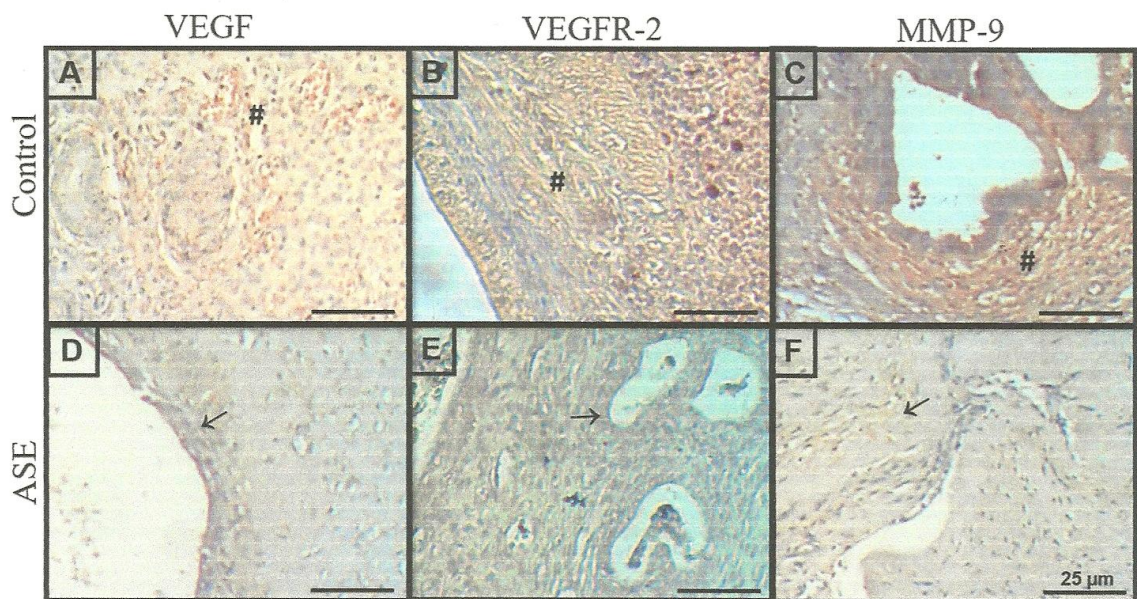


Fig 3. Açaí decreased angiogenesis markers immunodistribution in endometriosis. The immunoreactivity of VEGF, VEGFR-2 and MMP-9 was detected predominantly in the stroma (#), primarily around the glands in untreated endometriosis (A, B, C). Treated endometriotic lesions (D, E, F) exhibited a significant decrease in reaction intensity (→).

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g003

Anti-inflammatory effect of açaí on endometriotic lesions

The inflammatory profile of endometriotic lesions was analyzed using COX-2 mRNA expression, COX-2 immunostaining, and an ELISA immunoassay of prostaglandin 2 (PGE₂) (S2 Table). The level of COX-2 mRNA transcripts (Fig 4A) and the intensity of the COX-2 reaction (Fig 4C) were reduced in endometriotic lesions treated with açaí compared to the control group (Fig 4B). Histomorphometry evaluation of COX-2 was significantly smaller ($P = .0001$) in endometriosis animals treated with açaí (5.9 ± 0.5) compared to the control group (30.8 ± 1.7). PGE₂ (Fig 4D) and NO (Fig 4E) concentrations were significantly higher in the control group compared to the açaí group, which demonstrated the anti-inflammatory potential of the extract.

Açaí decreased levels of macrophages

We analyzed the presence of F4/80-positive cells in the endometriotic lesions of both groups because of the role of macrophages in angiogenesis and inflammation. We identified a decrease in the number of macrophage-positive cells in treated endometriotic lesions (Fig 5B) compared to the control group (Fig 5A). We analyzed the presence of these cells in endometriotic tissue using immunostaining of a macrophage activation marker to confirm these observations. We observed an important decrease in the number of positive cells in the stroma compartment in the treated group (Fig 5D) compared to the control group (Fig 5C). The histological scores of F4-80 immunostaining (S3 Table) confirmed these results (control, 49.3 ± 2.1 versus açaí 15.3 ± 1.0 , $P = .0001$). We also performed the viability assay using macrophage cell

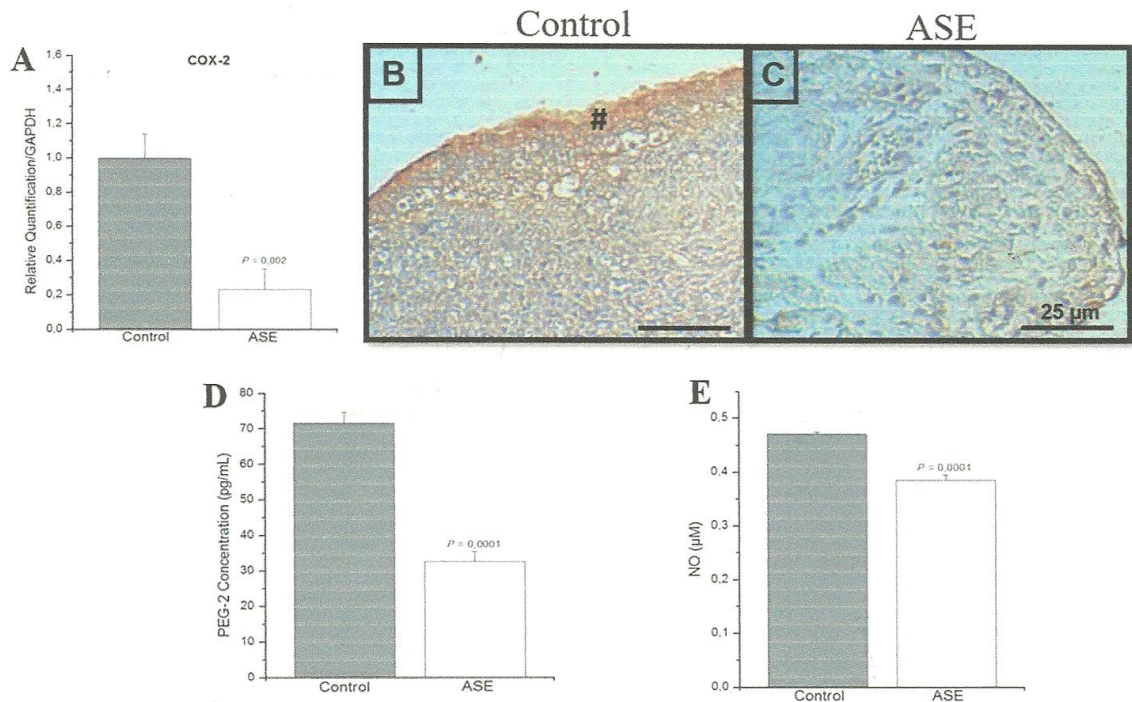


Fig 4. Anti-inflammatory effect of açaí on endometriotic lesions. COX-2 mRNA transcripts in the control group were higher than the açaí group (A). COX-2 immunoreactivity was detected predominantly in the glandular epithelial cells (#) in the control group (B) compared to lesions treated with açaí (C). PGE₂ levels (D) and NO production (E) were higher in the control group than in the açaí group.

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g004

line J774.G8 treated with 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of açaí after 24, 48 and 72 h, and observed the significantly decreased the viability of macrophages cells in all açaí-treated, except treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 h (Fig 5D). Macrophages cells treated with 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of açaí reduced cell viability in about 50% after all times, reinforcing the hypothesis that the açaí acts directly in the macrophage decrease. In addition, we made hematological analyses and observed a marked lymphocytosis in control animals compared to the açaí group (S3 Table). A recovery of leukocyte numbers to normal parameters was observed in the açaí group compared to the group of animals without endometriosis (data not shown).

Discussion

Endometriosis frequently produces serious effects on professional, social and marital life because it is associated with infertility and severe and incapacitating painful symptoms, including chronic pelvic pain, dysmenorrhea and dyspareunia [3,32]. Therefore, pharmacological treatments for endometriosis maintain a hypoestrogenic environment and relieve pelvic pain, but the side effects of these therapies limit their long-term use. Natural therapies were used recently for the treatment of various inflammatory diseases, and these therapies may be an effective treatment strategy for endometriosis [33,34].

Several studies demonstrated that açaí possesses high levels of phytochemicals with antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory, hypocholesterolemic, and anticancer activities

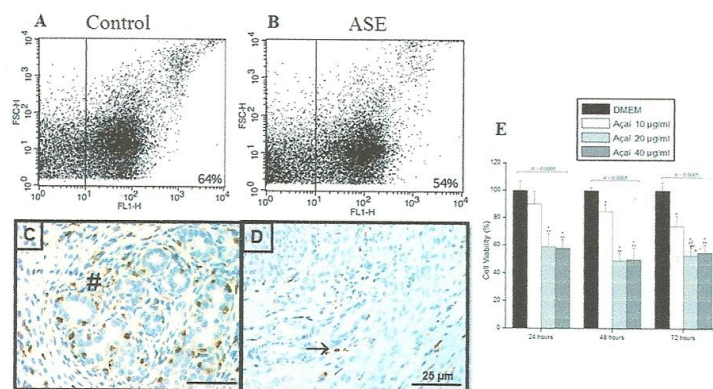


Fig 5. Açaí decreased levels of macrophages *in vivo* and *in vitro*. FACS analysis (A and B) of the macrophage phenotype (FL1-H) revealed fewer macrophages in the treated group than the control group population. F4-80 immunoreactivity (C and D) revealed that the higher number of positive macrophages in the stroma, primarily around the glands in control endometriosis (#) was drastically reduced in açaí treated lesions (→). Similarly, the MTT assay showed that the extract of açaí caused significant reduction in macrophage cell line viability after 24, 48 and 72 h of treatment (E). Values are mean $\pm$ standard deviations, and $P =$ ANOVA test. *Significant difference compared to DMEM group and **significant difference compared to açaí 10 μ g/ml group (Student-Newman-Keuls test, $P < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g005

[20–26,35,36]. To our knowledge, this report is the first study to evaluate the anti-inflammatory and antiangiogenic effects of açaí in endometriotic implants. Notably, our study used the hydro-alcoholic extract from açaí stones because this extract was previously described to be more active than the pulp extract [25,37].

An important decrease in the implant size was observed in the animals treated with açaí, and the histopathological findings revealed marked atrophy and lesion regression. Other phytochemicals also suppressed endometriosis in a murine model. Ergenoglu *et al.* used the natural polyphenol resveratrol and demonstrated a significant reduction in implant size and considerable histological changes in endometrial foci at the end of the treatment period [38]. Another study examined the effects of a plant polyphenol extracted from the traditional Chinese medicine turmeric, curcumin, on endometriosis. Curcumin treatment decreased the ectopic endometrial glands and narrowed the lumen [39]. These studies support the potential application of phytochemicals as endometriosis treatments.

Angiogenesis is pivotally important in the development of endometriosis [40,41], and anti-angiogenic agents from different substance groups are discussed as possible candidates for a new therapeutic approach [42–44]. Açaí treated animals in our study exhibited reduced VEGF expression, which is the most prominent pro-angiogenic factor in endometriosis. Similar results of reduced VEGF expression were reported in endometriosis models treated with a pro-drug of green tea and epigallocatechin-3-gallate [45–48]. We also demonstrated that the açaí extract decreased VEGFR-2 distribution. These results are important because the binding of VEGF to VEGFR-2 enhances endothelial cell migration, proliferation and the release of various proteolytic enzymes [49].

Endometriosis is considered a benign disease, but it often presents characteristics of malignancy [40,50]. Women with endometriosis also exhibit an increased risk of cancer, especially ovarian cancer [50,51], which primarily occurs because both conditions require angiogenesis for maintenance and growth [52]. Some studies demonstrated an anti-tumorigenic activity of

açaí in HL-60 leukemia cells and attenuation of colon carcinogenesis in rats [53,54]. Silva *et al.* demonstrated the anticancer activity of açaí in different malignant cell lines [25]. These authors concluded that the extract exhibited anti-tumorigenic potential in the human breast cancer MCF-7 cells and reduced viability and morphological alterations [25]. These results may be attributed to the rich content of polyphenols, anthocyanin and flavonoids in açaí because these substances possess anticancer activity [25,53,54].

The invasive properties of endometriotic tissue are also related to the increased proteolytic activity and matrix remodeling. MMPs are essential for the degradation of the extracellular matrix, which contributes to endometriosis development [55,56]. Our study demonstrated that açaí played an important role in reducing the MMP-9 levels in endometriotic lesions. Similar studies using curcumin also demonstrated reduced MMP expression in the intrinsic apoptotic pathway [57,58]. Some authors reported that the increase in ROS was a major factor that increased MMP expression and activity [59,60]. Costa *et al.* demonstrated that açaí treatment downregulated MMPs in experimental hypertension, and suggested that this downregulation was the result of the antioxidant activity of açaí [35].

High levels of ROS are generated in endometriosis and induce cell damage and proliferation [61], which supports the important role of peritoneal macrophages in the secretion of pro-inflammatory/proangiogenic cytokines [56,62]. Our findings demonstrated that the presence of F4/80-positive macrophages and NO concentrations were higher in endometriotic lesions and statistically reduced in animals treated with açaí. These results support the role of flavonoids as the major polyphenols in açaí that exhibit large anti-oxidant activity [19]. Several studies described the pivotal importance of macrophages in pathophysiology of endometriosis [4,8,40,56] and we also demonstrated that açaí decreased the viability of macrophages line cells *in vitro*. Therefore, we suggest that açaí decrease of macrophages hence reduced ROS production and decreased the inflammatory and angiogenesis processes in endometriotic lesions.

We also investigated COX-2 and PGE₂ signals to elucidate the mechanisms of action of açaí in the endometriosis inflammatory process. Several authors previously described that PGE₂ induced VEGF and played an important role in the pathogenesis of endometriosis [56,63,64]. We observed reduced COX-2 and PGE₂ levels in animals treated with açaí, and this result was likely due to the high levels of anthocyanin in açaí [65]. Notably, the suppression of COX-2 expression by açaí may be a prerequisite for the effective control of endometriosis-related pain. This hypothesis is supported by the significant and potent antinociceptive effect of this extract in rodent models of acute and neuropathic pain [26].

Considerable evidence supports that a diet rich in polyphenols reduces the risk for many pathological conditions, including cardiovascular disease and cancer [66]. However, studies demonstrated an effect of fruits and vegetables on the risk of cancer, and many of the tested extracts have genotoxic potential [67,68]. Ribeiro *et al.* investigated the genotoxicity of açaí in bone marrow, peripheral blood, liver and kidney cells of mice using the micronuclei test and comet assay [69]. The results demonstrated that gavage administration of açaí was not genotoxic in mice, and its components may be exploited as a promoter of good health [69].

Finally, based on the results of this study and the previous ones, we propose a mechanism for the therapeutic effects of açaí for endometriosis (Fig 6). Macrophages play a key role in inflammatory and angiogenesis of endometriosis. We know that the macrophages are an important source of VEGF and it is essential in the establishment and growth of endometriotic lesion [4,40,70]. High concentration of VEGF returns to activated macrophage and bind with VEGFR-2. This signaling upregulating the MMP-9 transcription induces the extracellular matrix remodeling promoting the increase of the vascular density [71]. Moreover, the

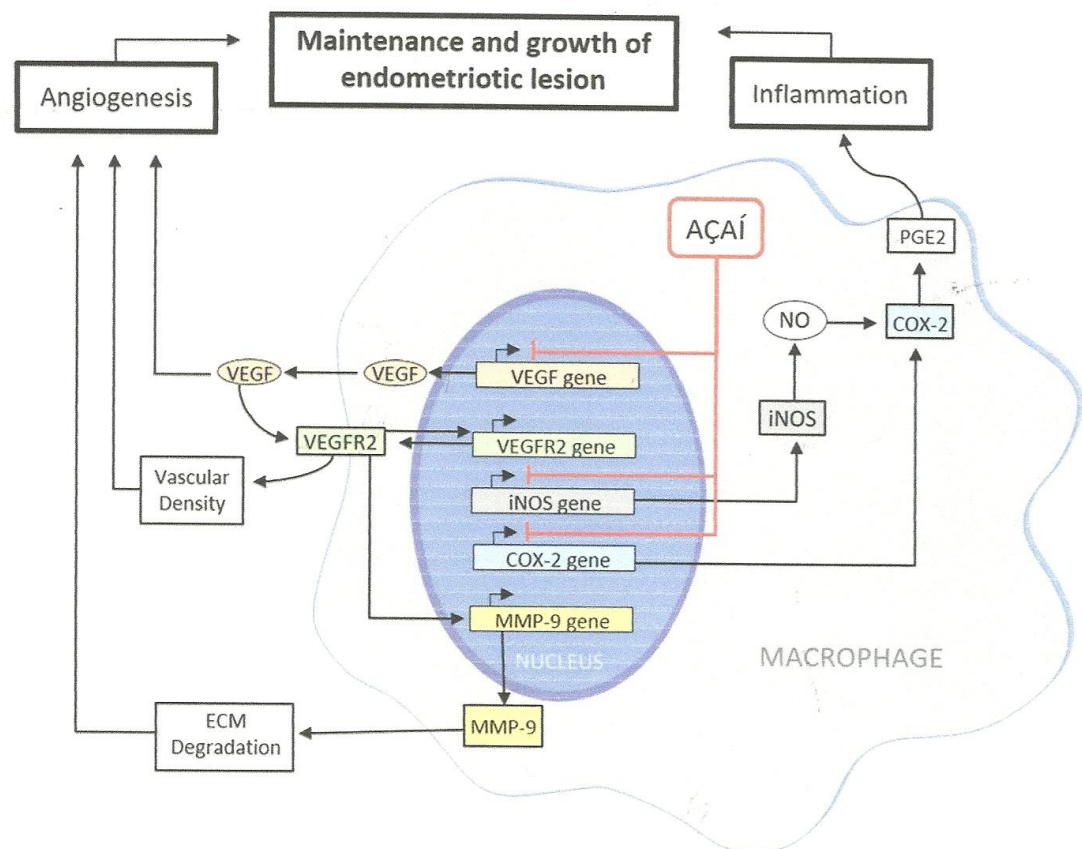


Fig 6. Açaí signaling pathways in endometriosis. In the endometriotic microenvironment, the macrophages are essential to promote the angiogenesis process and inflammation because it leads to increase the VEGF, iNOS and COX-2 genes expression. Açaí acts in this pathway and decreases the number of activated macrophages resulting in the reduction of the target genes expression, suppressing the maintenance and growth of endometriotic lesion.

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g006

activated macrophages synthesize high concentration of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and generate NO [61]. On the other hand, this process increased the COX-2 and PGE2 levels to enhance the inflammatory process and angiogenesis [56,63,64]. Therefore, we propose that açaí decreases the number of activated macrophages resulting in the reduction of the target genes expression, such as VEGF, iNOS and COX-2 suppressing the maintenance and growth of endometriotic lesion.

Conclusions

In conclusion, the results of this study demonstrated the antiangiogenic and anti-inflammatory potential of açaí, which produced morphological alterations in endometriotic lesions. Açaí may also modulate the progress of endometriosis and suppress the symptoms related to pain, which supports the possible development of a novel and effective drug. The actual

mechanisms of the beneficial effects of açaí on endometriotic lesions are not completely understood, but we are optimistic that these effects will be reproducible in clinical tests, and we will continue our research of this extract.

Supporting Information

S1 Fig. Macrophage cell line. Morphology observations by phase-contrast microscopy of macrophage cell line J774.G8 in plastic bottles cultivated in a RPMI 1640 medium (A and B). (TIF)

S1 Table. Immunostaining and ELISA immunoassays based on MMP-9, VEGF and its receptor VEGFR-2. (XLS)

S2 Table. COX-2 immunostaining, and an ELISA immunoassay of PGE₂. (XLS)

S3 Table. F4-80 immunostaining, and hematological analyses. (XLS)

Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ, Brazil (E-26/010.002619/2014 and E-26/010.002644/2014).

Author Contributions

Conceptualization: DEM JAP RSM LEN.

Formal analysis: DEM JAP JA-P.

Funding acquisition: DEM JAP RSM LEN.

Investigation: DEM JAP RSM KCR-B JA-P TAS KGP YMS.

Methodology: DEM JAP RSM KCR-B JA-P.

Project administration: DEM JAP RSM LEN.

Resources: DEM JAP RSM TAS PJCS LEN.

Supervision: DEM JAP.

Validation: DEM JAP RSM LEN.

Visualization: DEM TAS LEN.

Writing – original draft: DEM JAP KCR-B JA-P.

Writing – review & editing: DEM JAP RSM KCR-B JA-P TAS LEN.

References

1. Galle PC. Clinical presentation and diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1989; 16: 29–42. PMID: [2664621](#)
2. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod.* 2012; 27: 1292–9. doi: [10.1093/humrep/des073](#) PMID: [22422778](#)

3. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009; 360: 268–79. doi: [10.1056/NEJMra0804690](#) PMID: [19144942](#)
4. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update*. 2000; 6: 45–55. PMID: [10711829](#)
5. Gilabert-Estelles J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Vila V, Réganon E, et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum Reprod*. 2007; 22: 2120–7. doi: [10.1093/humrep/dem149](#) PMID: [17609243](#)
6. Machado DE, Abrão MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril*. 2008; 90: 148–55. doi: [10.1016/j.fertnstert.2007.05.076](#) PMID: [17765237](#)
7. Wu MH, Shoji Y, Chuang PC, Tsai SJ. Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. *Expert Rev Mol Med*. 2007; 9: 1–20.
8. Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2007a; 13: 331–42.
9. Podgaec S, Abrão MS, Dias JA Jr, Rizzo LV, Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod*. 2007; 22: 1373–9. doi: [10.1093/humrep/del516](#) PMID: [17234676](#)
10. Chishima F, Hayakawa S, Sugita K, Kinukawa N, Aleemuzzaman S, Nemoto N, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol*. 2002; 48: 50–6. PMID: [12322896](#)
11. Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod*. 2001; 16: 561–6. PMID: [11228229](#)
12. Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Wattiez A, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertil Steril*. 2004; 82: 1309–15. doi: [10.1016/j.fertnstert.2004.03.059](#) PMID: [15533352](#)
13. Ruhland B, Agic A, Krampe J, Diedrich K, Hornung D. Innovations in conservative endometriosis treatment: an updated review. *Minerva Ginecol*. 2011; 63: 247–59. PMID: [21654610](#)
14. Guo SW, Olive DL. Two unsuccessful clinical trials on endometriosis and a few lessons learned. *Gynecol Obstet Invest*. 2007; 64: 24–35. doi: [10.1159/000098413](#) PMID: [17202821](#)
15. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 1539–45. doi: [10.1021/jf035189n](#) PMID: [15030208](#)
16. Lichtenthaler R, Rodrigues RB, Maia JG, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. *Int J Food Sci Nutr*. 2005; 56: 53–64. doi: [10.1080/09637480500082082](#) PMID: [16019315](#)
17. Rodrigues RB, Lichtenthaler R, Zimmermann BF, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F, et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2006; 54: 4162–7. doi: [10.1021/jf058169p](#) PMID: [16756342](#)
18. Pacheco-Palencia LA, Duncan CE, Talcott ST. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açaí species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food Chem*. 2009; 115: 1199–205.
19. Kang J, Zhimin L, Wub T, Jensen GS, Schauss AG, Wua X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry*. 2010; 122: 610–7.
20. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (açaí). *J Agric Food Chem*. 2006a; 54: 8598–603. doi: [10.1021/jf060976g](#) PMID: [17061839](#)
21. Stoner GD. Foodstuffs for preventing cancer: the preclinical and clinical development of berries. *Cancer Prev Res*. 2009; 2: 187–94.
22. de Moura RS, Pires KM, Santos Ferreira T, Lopes AA, Nesi RT, Resende AC, et al. Addition of açaí (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49: 855–63. doi: [10.1016/j.fct.2010.12.007](#) PMID: [21147193](#)
23. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*. 2012; 19: 262–9. doi: [10.1016/j.phymed.2011.11.004](#) PMID: [22138278](#)
24. Poulouse SM, Fisher DR, Larson J, Bielinski DF, Rimando AM, Carey AN, et al. Anthocyanin-rich açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse

- brain BV-2 microglial cells. *J Agric Food Chem*. 2012; 60: 1084–93. doi: [10.1021/jf203989k](https://doi.org/10.1021/jf203989k) PMID: [22224493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22224493/)
25. Silva DF, Vidal FC, Santos D, Costa MC, Morgado-Díaz JA, do Desterro MNBS, et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14: 175. doi: [10.1186/1472-6882-14-175](https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-175) PMID: [24886139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24886139/)
 26. Sudo RT, Neto ML, Monteiro CE, Amaral RV, Resende AC, Souza PJ, et al. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) in a rodent model of acute and neuropathic pain. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15: 208. doi: [10.1186/s12906-015-0724-2](https://doi.org/10.1186/s12906-015-0724-2) PMID: [26134625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26134625/)
 27. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). *J Agric Food Chem*. 2006b; 54: 8604–10.
 28. Marques ES, Froder JG, Carvalho JCT, Rosa PCP, Perazzo FF, Maistro EL. Evaluation of the genotoxicity of *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae) fruit oil (açaí), in mammalian cells in vivo. *Food Chem Toxicol*. 2016; 93: 13–19. doi: [10.1016/j.fct.2016.04.018](https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.018) PMID: [27125964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27125964/)
 29. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril*. 1985; 44: 684–94. PMID: [4054348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4054348/)
 30. Perini JA, Angeli-Gamba T, Alessandra-Perini J, Ferreira LC, Nasciutti LE, Machado DE. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 30: 203.
 31. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrite in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126: 131–8. PMID: [7181105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7181105/)
 32. Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT, Vianna-Jorge R, Nasciutti LE, Bellodi-Privato M, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A, -460 T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health*. 2014; 14: 117. doi: [10.1186/1472-6874-14-117](https://doi.org/10.1186/1472-6874-14-117) PMID: [25255852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255852/)
 33. Kong S, Zhang YH, Liu CF, Tsui I, Guo Y, Ai BB, et al. The complementary and alternative medicine for endometriosis: a review of utilization and mechanisms. *Evid Based Complement and Alternat Med*. 2014; 2014: 146383.
 34. Tekin YB, Guven S, Kirbas A, Kalkan Y, Tumkaya L, Guvendag Guven ES. Is resveratrol a potential substitute for leuprolide acetate in experimental endometriosis? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015; 184: 1–6. doi: [10.1016/j.ejogrb.2014.10.041](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.10.041) PMID: [25462211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25462211/)
 35. da Costa CA, de Oliveira PR, de Bem GF, de Cavalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, et al. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2012; 385: 1199–209. doi: [10.1007/s00210-012-0798-z](https://doi.org/10.1007/s00210-012-0798-z) PMID: [23052352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23052352/)
 36. de Souza MO, Souza ESL, de Brito Magalhães CL, de Figueiredo BB, Costa DC, Silva ME, et al. The hypocholesterolemic activity of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutr Res*. 2012; 32: 976–84. doi: [10.1016/j.nutres.2012.10.001](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.10.001) PMID: [23244543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23244543/)
 37. Rocha AP, Carvalho LC, Sousa MA, Madeira SV, Sousa PJ, Tano T, et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol*. 2007; 46: 97–104. doi: [10.1016/j.vph.2006.08.411](https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.08.411) PMID: [17049314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17049314/)
 38. Ergenoglu AM, Yeniel AO, Erbas O, Aktug H, Yildirim N, Ulukus M, et al. Regression of endometrial implants by resveratrol in an experimentally induced endometriosis model in rats. *Reprod Sci*. 2013; 20: 1230–6. doi: [10.1177/1933719113483014](https://doi.org/10.1177/1933719113483014) PMID: [23536571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23536571/)
 39. Zhang Y, Cao H, Hu YY, Wang H, Zhang CJ. Inhibitory effect of curcumin on angiogenesis in ectopic endometrium of rats with experimental endometriosis. *Int J Mol Med*. 2011; 27: 87–94. doi: [10.3892/ijmm.2010.552](https://doi.org/10.3892/ijmm.2010.552) PMID: [21069258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21069258/)
 40. Machado DE, Palumbo A Jr, Santos JM, Mattos RM, dos Santos TA, Seabra SH, et al. A GFP endometriosis model reveals important morphological characteristics of the angiogenic process that govern benign and malignant diseases. *Histol Histopathol*. 2014; 29: 903–12. PMID: [24385307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24385307/)
 41. Machado DE, Perini JA, Orlando MM, Santos-Oliveira R. Developing a Noninvasive Procedure Using Labeled Monoclonal Antibody Anti-VEGF (Bevacizumab) for Detection of Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 751460. doi: [10.1155/2015/751460](https://doi.org/10.1155/2015/751460) PMID: [26240826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26240826/)
 42. Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, Bouma-Ter Steege JC, Thijssen VL, Evers JL, et al. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 1089–95. doi: [10.1210/jc.2003-031406](https://doi.org/10.1210/jc.2003-031406) PMID: [15001592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15001592/)
 43. Taylor RN, Mueller MD. Anti-angiogenic treatment of endometriosis: biochemical aspects. *Gynecol Obstet Invest*. 2004; 57: 54–6. PMID: [14974461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14974461/)

44. Becker CM, D'Amato RJ. Angiogenesis and antiangiogenesis therapy in endometriosis. *Microvasc Res*. 2007; 74: 121–30. doi: [10.1016/j.mvr.2007.04.008](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.04.008) PMID: [17574280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17574280/)
45. Laschke MW, Schwender C, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD. Epigallocatechin-3-gallate inhibits estrogen-induced activation of endometrial cells in vitro and causes regression of endometriotic lesions in vivo. *Hum Reprod*. 2008; 23: 2308–18. doi: [10.1093/humrep/den245](https://doi.org/10.1093/humrep/den245) PMID: [18603648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18603648/)
46. Xu H, Lui WT, Chu CY, Ng PS, Wang CC, Rogers MS. Anti-angiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. *Hum Reprod*. 2009; 24: 608–18. doi: [10.1093/humrep/den417](https://doi.org/10.1093/humrep/den417) PMID: [19088106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19088106/)
47. Xu H, Becker CM, Lui WT, Chu CY, Davis TN, Kung AL, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenesis and suppresses vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and signaling in experimental endometriosis in vivo. *Fertil Steril*. 2011; 96: 1021–8. doi: [10.1016/j.fertnstert.2011.07.008](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.008) PMID: [21821246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21821246/)
48. Wang CC, Xu H, Man GC, Zhang T, Chu KO, Chu CY, et al. Prodrug of green tea epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) as a potent anti-angiogenesis agent for endometriosis in mice. *Angiogenesis*. 2013; 16: 59–69. doi: [10.1007/s10456-012-9299-4](https://doi.org/10.1007/s10456-012-9299-4) PMID: [22948799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22948799/)
49. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*. 1992; 13: 18–32. doi: [10.1210/edrv-13-1-18](https://doi.org/10.1210/edrv-13-1-18) PMID: [1372863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1372863/)
50. Kumar S, Munkarah A, Arabi H, Bandyopadhyay S, Semaan A, Hayek K, et al. Prognostic analysis of ovarian cancer associated with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2011; 204: 63. doi: [10.1016/j.ajog.2010.08.017](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.017) PMID: [21074136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21074136/)
51. Melin A, Sparen P, Persson I, Bergqvist A. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. *Hum Reprod*. 2006; 21: 1237–42. doi: [10.1093/humrep/dei462](https://doi.org/10.1093/humrep/dei462) PMID: [16431901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16431901/)
52. Becker CM, Beaudry P, Funakoshi T, Benny O, Zaslavsky A, Zurakowski D, et al. Circulating endothelial progenitor cells are up-regulated in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol*. 2011; 178: 1782–91. doi: [10.1016/j.ajpath.2010.12.037](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.037) PMID: [21435458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21435458/)
53. Del Pozo-Insfran D, Percival SS, Talcott ST. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *J Agric Food Chem*. 2006; 54: 1222–9. doi: [10.1021/jf052132n](https://doi.org/10.1021/jf052132n) PMID: [16478240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16478240/)
54. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro DA, Barbisan LF. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*. 2013; 58: 68–76. doi: [10.1016/j.fct.2013.04.011](https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.011) PMID: [23597449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23597449/)
55. Di Carlo C, Bonifacio M, Tommaselli GA, Bifulco G, Guerra G, Nappi C. Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril*. 2009; 91: 2315–23. doi: [10.1016/j.fertnstert.2008.03.079](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.03.079) PMID: [18644593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18644593/)
56. Machado DE, Berardo PT, Landgraf RG, Fernandes PD, Palmero C, Alves LM, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril*. 2010; 93: 2674–9. doi: [10.1016/j.fertnstert.2009.11.037](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.11.037) PMID: [20056215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056215/)
57. Swarnakar S, Paul S. Curcumin arrests endometriosis by downregulation of matrix metalloproteinase-9 activity. *Indian J Biochem Biophys*. 2009; 46: 59–65. PMID: [19374255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19374255/)
58. Jana S, Paul S, Swarnakar S. Curcumin as anti-endometriotic agent: implication of MMP-3 and intrinsic apoptotic pathway. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83: 797–804. doi: [10.1016/j.bcp.2011.12.030](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.030) PMID: [22227273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22227273/)
59. Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, et al. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive species. *Circ Res*. 2003; 92: e80–6. doi: [10.1161/01.RES.0000077044.60138.7C](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000077044.60138.7C) PMID: [12750313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12750313/)
60. Castro MM, Rizzi E, Rodrigues GJ, Ceron CS, Bendhack LM, Gerlach RF, et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46: 1298–307. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.011](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.011) PMID: [19248829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19248829/)
61. Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D. Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod*. 2005; 20: 2014–20. doi: [10.1093/humrep/dei001](https://doi.org/10.1093/humrep/dei001) PMID: [15817589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15817589/)
62. Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic Mechanisms of Deep Infiltrating Endometriosis. *Reprod Sci*. 2015; 22: 1053–9. doi: [10.1177/1933719115592713](https://doi.org/10.1177/1933719115592713) PMID: [26169038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26169038/)
63. Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD. Selective cyclooxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by downregulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril*. 2007b; 87: 163–71.

64. Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, Tesone M, et al. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 2008; 23: 2701–8. doi: [10.1093/humrep/den315](https://doi.org/10.1093/humrep/den315) PMID: [18716040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716040/)
65. Heinrich M, Dhanji T, Casselman I. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) A phytochemical and pharmacological assessment of the species health claims. *Phytochemistry Letters*. 2011; 4: 10–21.
66. Ghosh D, Scheepens A. Vascular action of polyphenols. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53: 322–31. doi: [10.1002/mnfr.200800182](https://doi.org/10.1002/mnfr.200800182) PMID: [19051188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19051188/)
67. Fang X, Wei J, He X, An P, Wang H, Jiang L, et al. Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer*. 2015; 51: 2820–32. doi: [10.1016/j.ejca.2015.09.010](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.09.010) PMID: [26589974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26589974/)
68. Zanini S, Marzotto M, Giovinazzo F, Bassi C, Bellavite P. Effects of dietary components on cancer of the digestive system. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015; 55: 1870–85. doi: [10.1080/10408398.2012.732126](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.732126) PMID: [24841279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24841279/)
69. Ribeiro JC, Antunes LM, Aissa AF, Darin JD, De Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res*. 2010; 695: 22–8. doi: [10.1016/j.mrgentox.2009.10.009](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.10.009) PMID: [19892033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19892033/)
70. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LYC. Neutrophils and Macrophages Promote Angiogenesis in the Early Stage of Endometriosis in a Mouse Model. *Endocrinology*. 2006; 147(3):1278–1286. doi: [10.1210/en.2005-0790](https://doi.org/10.1210/en.2005-0790) PMID: [16306083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16306083/)
71. Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, et al. Mechanisms underlying TGF-1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2007; 81(2):557–66. doi: [10.1189/jlb.0806517](https://doi.org/10.1189/jlb.0806517) PMID: [17053163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17053163/)