

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

MARIA CAROLINA STIPP

**EFEITOS ANTITUMORAIS *IN VIVO* DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE
POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE VINHO TINTO NO CARCINOSSARCOMA
WALKER-256**

CURITIBA
2016

MARIA CAROLINA STIPP

**EFEITOS ANTITUMORAIS *IN VIVO* DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE
POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE VINHO TINTO NO CARCINOSSARCOMA
WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alexandra Acco

CURITIBA
2016




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

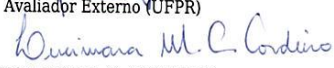
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MARIA CAROLINA STIPP**, intitulada: "**EFEITOS ANTITUMORAIS IN VIVO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE VINHO TINTO NO CARCINOSSARCOMA WALKER-256**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

Curitiba, 26 de Setembro de 2016.


ALEXANDRA ACCO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


EDVALDO DA SILVA TRINDADE
Avaliador Externo (UFPR)


LUCIMARA M. C. CORDEIRO
Avaliador Externo (UFPR)

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação tem os principais resultados apresentados na forma de artigo científico, sendo constituída, portanto, por introdução, um artigo científico e considerações finais. Este formato está de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha avó e ao meu esposo por todo apoio, paciência, auxílio, carinho, compreensão e dedicação que tiveram comigo durante todo esse período.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Sem Ele nada seria possível. Obrigada Deus por ter proporcionado bons períodos de experimentos, pela força, sabedoria e proteção durante os momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus pais, por todo amor, carinho, paciência e apoio nesse período. Obrigada pela confiança que depositaram em mim, e por me darem forças desde o início. Não conseguiria sem vocês.

Agradeço ao meu esposo, por seu amor incondicional, companheirismo, apoio, atenção e amizade de sempre. Sem sua força e dedicação, não seria possível finalizar esse mestrado.

Agradeço à minha querida orientadora e “mãe científica”, Professora Dra. Alexandra Acco, pelos ensinamentos e dedicação. Sou imensamente grata por me auxiliar e inspirar tanto na vida profissional, quanto na pessoal. Você é um exemplo para todos os seus alunos. Obrigada por permitir que o meu trabalho fosse conciliado com o mestrado, e por sempre ser uma pessoa imensamente compreensiva.

Agradeço aos meus colegas de trabalho e amigos do Laboratório de Farmacologia & Metabolismo, por facilitarem essa jornada de dois anos, tornando o nosso local de trabalho um ambiente harmonioso e alegre, durante os experimentos. Às minhas grandes amigas Francislaine e Claudia, pelos ensinamentos, paciência, confiança, amizade e estímulo.

Agradeço às meninas do Laboratório da Dor, Renata e Carol, pela paciência ao compartilharem comigo suas técnicas e pela ajuda durante os repiques. Vocês foram essenciais.

Agradeço a todos os colaboradores e co-autores deste trabalho. Vocês permitiram que todas as etapas fossem cumpridas.

Agradeço aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, por todo conhecimento científico.

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

"Eu as abençoarei e abençoarei os lugares em torno da minha colina. Na estação própria, farei descer chuva; e farei descer a chuva a seu tempo; chuvas de bênçãos serão." (Ezequiel 34:26)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da fração solúvel de polissacarídeos extraídos de vinho tinto (SFP) contra o carcinossarcoma Walker–256. Para isso foram utilizados ratos Wistar machos, que receberam 30 ou 60 mg/kg de SFP ou veículo por via oral durante 14 dias, ou metotrexato (MTX, controle positivo) na dose de 5 mg/kg, via intraperitoneal, a cada 5 dias, após a inoculação subcutânea de 10^7 células tumorais no membro pélvico direito. Grupos de ratos sem tumor receberam as mesmas doses da SFP, para avaliar seus efeitos adversos. O desenvolvimento do tumor foi acompanhado e, posteriormente, foram realizados hemograma e bioquímica plasmática, avaliação no tecido tumoral de parâmetros inflamatórios e expressão gênica. A SFP nas doses de 30 e 60 mg/kg reduziu de modo significativo tanto o peso quanto o volume tumoral. O tratamento interferiu de modo direto nos parâmetros leucocitários e inflamatórios, sendo possível observar uma imunomodulação importante, com redução da contagem relativa de monócitos e neutrófilos no sangue, e redução da atividade tumoral de NAG e MPO, provenientes destas células, respectivamente, associada à diminuição dos níveis de NO tumoral. Contudo, a contagem relativa de linfócitos sanguíneos e a dosagem de TNF- α tumoral apresentaram-se aumentadas. A expressão de genes relacionados à via apoptótica (*Bax*, *Bcl-2*, *caspase-3* e *p53*) e à angiogênese (*Vegf*) no tecido tumoral não apresentou diferenças pelo tratamento, enquanto a expressão de genes da via de necroptose, como *Rip1* e *Rip3*, elevou-se nos animais tratados com a SFP. Não foram observados efeitos adversos durante o tratamento com SFP. Sendo assim, a SFP demonstrou atividade antitumoral contra o carcinossarcoma Walker–256, com atuação direta sobre o sistema imunológico, controlando o microambiente inflamatório do tumor e estimulando a produção de TNF- α , ativando assim a via de necroptose, que induz à morte celular.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vivo* antitumor activity of the soluble fraction of polysaccharides (SFP) from red wine against the Walker-256 carcinosarcoma. After the subcutaneous inoculation of 10^7 tumor cells in the right hind limb of male Wistar rats, the animals daily received 30 or 60 mg/kg SFP or vehicle, by gavage, or 5 mg/kg methotrexate (MTX, positive control) intraperitoneally, every 3 days, during 14 days. Other group of rats, without tumor, received the same doses of SFP for evaluating its adverse effects. The tumor development was accompanied and further analysis of hematology, plasma biochemistry, and tumor inflammation, histology and gene expression was performed. SFP in both doses reduced significantly the tumor volume and weight. The treatment directly interfered in blood leucocytes and inflammatory parameters. Thus a possible SFP immunomodulation was observed, evidenced by reduction in relative count of blood monocytes and neutrophils, and reduction of tumor activity of NAG and MPO, enzymes preventive of these cells, respectively, associated with a decreased tumor NO levels. However, the blood count of relative lymphocytes and the tumor TNF- α level were increased. The expression of genes related with apoptosis (*Bax*, *Bcl-2*, *caspase-3* e *p53*) and angiogenesis (*Vegf*) in tumor tissue was not different among the groups. However, the expression of *Rip1* and *Rip3*, both genes related with necroptosis, was increased by the SFP treatment. Thus, the SFP demonstrate antitumor activity against the Walker-256 carcinosarcoma and act directly in the immune system, controlling the inflammation and stimulating the TNF- α production in the tumor microenvironment, inducing necroptosis, which cause tumor cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tipos de inflamação e sua influência na carcinogênese ou tumor instalado. Adaptado de : Grivennikov et al., 2010.....	20
Figura 2 – Processo de iniciação tumoral, demonstrando células inflamatórias produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies intermediárias de nitrogênio (RNI), levando a mutações. Adaptado de: Grivennikov et al., 2010.	23
Figura 3 – Sinalização mediada por TNF- α induzindo apoptose ou necroptose. FONTE: SU et al., 2016.....	26
Figura 4 – Tumor Walker-256 no membro pélvico direito de rato Wistar, 14 dias após a inoculação de 10^7 células. Observa-se o centro tumoral com tecido necrosado. FONTE: O autor (2016).	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Papel dos diferentes subtipos de células com atividade imune antitumoral e inflamação promotora de tumor.....	21
Tabela 2 – Principais agentes antineoplásicos e seus mecanismos de ação.	28

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 - ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) HSQC spectrum in D_2O . Chemical shifts expressed in ppm at 30°C . Glycosyl units were labeled as follows: A ($\alpha\text{-L-Araf}$); B ($\beta\text{-D-Galp}$); C ($\alpha\text{-L-Rhap}$); D ($\alpha\text{-D-GalpA}$); E ($\alpha\text{-D-Manp}$); F ($\alpha\text{-D-Glcp}$). _____	47
Figure 2 - Tumor volume (A) and weight (B) of Walker-256 tumor bearing-rats treated with SFP 30 mg/kg (SFP30), SFP 60 mg/kg (SFP60), MTX (methotrexate) or Vehicle (Veh) during 14 days. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 7–10 rats. In (A) every treatment is different statistically of Vehicle group ($p < 0.05$) after the 11 th day, analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. In (B) the analysis was performed with one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison teste. Symbols: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ as compared to the Vehicle group. _____	48
Figure 3 - Inflammatory parameters evaluated in tumor tissue of rats treated for 14 days with Vehicle (Veh), SFP 30 mg/kg (SFP30) or SFP 60 mg/kg (SFP60): Nitrite (A), MPO (B), NAG (C) and TNF- α (D). Values are expressed as mean \pm S.E.M ($n = 5-7$). The blood relative count (%) of lymphocyte (D), granulocyte (B) and monocyte (C) are represented in %, since these cells are responsible for the respective inflammatory mediators' production. Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test, and differences between groups were considered when $p < 0.05$. Symbols: * when compared with Tumor Vehicle group. _____	52
Figure 4 – Histology of tumor tissue after 14 days of treatment with vehicle (A, D, G), SFP 30 mg/Kg (B,E, H) or SFP60 mg/Kg (C, F, I), stained by HE. White area circled	

indicate viable tumor cells, black area circled indicate areas of necrosis, in which empty spaces indicate areas of death cells. _____ 53

Figure 5 – Gene expression of *Rip1* (A), *Rip3* (B) and *Mkl1* (C) in tumor tissue of rats treated with vehicle (Veh), SFP 30 mg/kg (SFP30) or SFP 60 mg/kg (SFP60) during 14 days. Values are expressed as mean \pm S.E.M (n=5). Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test, and differences between groups were considered significant with $p < 0.05$. Symbols: * when compared with Vehicle group. _____ 54

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 - Monosaccharide composition of the red wine polysaccharides. _____ 46

Table 2 - Plasmatic parameters evaluated in healthy and tumor-bearing rats. _____ 49

Table 3 - Hematological parameters evaluated in healthy and tumor-bearing rats. _ 51

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: Alanina aminotransferase

ANOVA: Análise estatística de variância

AST: Aspartato aminotransferase

Bax: Bcl-2 associada à proteína X

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

Cat: Catalase

CTL: Linfócitos T helper citotóxicos

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino (ethylenediaminetetraacetic acid)

EGFR: Fator de crescimento de receptor epidérmico

FADD: Fas-associado ao domínio de morte

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GSH: Glutathiona reduzida

GPx: Glutathiona peroxidase

GST: Glutathiona-S-transferase

GR: Glutathiona Redutase

HE: Hematoxilina e eosina.

HIF-1: Fator de hipóxia induzível

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IFN- γ : Interferon gama

IGF-2: fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL- 8: Interleucina 8

IL-12: Interleucina 12

LPO: Peroxidação lipídica

MIF: Fator inibidor da migração de macrófagos

MLKL: Proteína quinase de domínio de linhagem mista

MPO: Mieloperoxidase

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

MTX: Metotrexato

NAG: N-acetil- β -D-glicosaminidase

NaOAc: Acetato de sódio

NF- κ B: Fator nuclear Kappa B

NO: Óxido nítrico

O₂^{•-}: Ânion superóxido

OH[•]: Radical hidroxila

OMS: Organização Mundial da Saúde.

p53: Proteína 53

PGE₂: Prostaglandina E₂

SOD: Superóxido dismutase

SFP: Fração solúvel do polissacarídeo

RIP-1: Proteína quinase de interação ao receptor 1

RIP-3: Proteína quinase de interação ao receptor 3

RNI: Espécies intermediárias de nitrogênio

RO[•]: Radical alcóxil

ROO[•]: Radical peróxil

ROOH[•]: Radical hidroperóxil

ROS: Espécies reativas de oxigênio

TAM: Macrófagos associados ao tumor

TGF- β : Fator de crescimento transformante β

Th1: Linfócito T helper 1

Th2: Linfócito T helper 2

Th17: Linfócito T helper 17

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

VEGF: Fator de crescimento vascular epidérmico

W256: Tumor Walker-256

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1	Câncer: definição e incidência	16
1.2	Carcinogênese e seus moduladores	17
1.3	Morte celular programa: Apoptose e Necroptose	23
1.4	Tratamentos antineoplásicos	27
1.5	Extrato solúvel de polissacarídeos extraído do vinho	28
1.6	Tumor Walker-256	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	ARTIGO CIENTÍFICO	34
3.1	INTRODUCTION	36
3.2	MATERIAL AND METHODS	38
3.2.1	Polysaccharides preparation	38
3.2.1.1	Monosaccharide composition by NMR and GC-MS	39
3.2.1.2	Structural Identification by NMR	39
3.2.2	Animal model and Walker-256 tumor inoculation	40
3.2.3	Experimental design	40
3.2.4	Biochemical and hematological assays	42
3.2.5	Evaluation of inflammatory parameters in tumor tissue	42
3.2.5.1	Determination of the enzymatic activity of myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG)	42
3.2.5.2	Determination of nitrite levels in tumor tissue	42
3.2.5.3	Quantification of TNF-alfa	43
3.2.6	Histopathology	43
3.2.7	Gene expression by qPCR (quantitative PCR analysis)	44
3.2.8	Statistical analysis	45
3.3	RESULTS	45
3.3.1	Isolation and chemical analysis of the polysaccharide	45
3.3.1.1	NMR data	46
3.3.2	SFP treatment reduced the tumor development	47
3.3.3	Plasma biochemistry	49

3.3.4	Hematological assays _____	50
3.3.5	Inflammatory parameters in tumor tissue _____	51
3.3.6	Histological analysis of tumor and liver _____	52
3.3.7	Gene expression in tumor _____	53
3.4	DISCUSSION _____	54
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	69
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	70

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Câncer: definição e incidência

Segundo Feitelson et al (2015), o câncer é uma doença maligna desencadeada por meio de mutação nas células normais do organismo, incorporando características que promovem a sobrevivência das células para além do seu período de vida, dando origem a uma proliferação desordenada.

O projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou um total de 14,1 milhões de novos casos de câncer, e 8,2 milhões de óbitos, em 2012, em nível mundial. Esses números devem aumentar em 2030, onde são esperados 21,4 milhões de novos casos de câncer e cerca de 13,2 milhões de mortes por câncer, devido ao crescimento e ao envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento.

Segundo Zaidman et al. (2005), o neoplasia corresponde a uma massa anormal ou colônia de células, as quais são responsáveis por originar um crescimento diferente e relativamente autônomo de tecido. Na grande maioria dos casos, ocorre a expansão clonal de uma única célula, a qual passou por uma transformação neoplásica, ou estresse celular, que podem ser consequências de influências externas ou internas, como hipóxia (MAJMUNDAR et al., 2010), ativação de oncogenes (HAIGIS & SWEET-CORDERO, 2011), estresse oxidativo (BARZILAI et al., 2004 apud PFLAUM et al., 2014; ROTBLAT et al., 2013; GARG et al., 2014), agentes cancerígenos como aflatoxina (BRESSAC et al., 1991; HSUL et al., 1991), fumaça do cigarro (ITOH et al., 2014), radiação ultravioleta (CLYDESDALE et al., 2001; KAMB et al., 1994; ZIEGLER et al., 1994) e radiação ionizante (RILEY et al., 1994 apud PFLAUM et al., 2014), que atuam de modo indireto ou direto sob o genoma da célula normal, transformando-a em uma célula neoplásica. As principais características destas células se referem à perda de determinadas funções especializadas, associadas à aquisição de novas e marcantes propriedades biológicas, como por exemplo, a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, evasão de apoptose, ilimitado potencial replicativo, angiogênese sustentada, invasão de tecido e,

por fim, metástase. Essas características são hereditárias, de modo que as células da progênie as recebem (ZAIDMAN et al., 2005), e desde modo as células neoplásicas passam a possuir uma elevada capacidade proliferativa, com perda de diferenciação celular, proporcionando malignidade das células nos tecidos (WONGTRAKOONGATE, 2015).

1.2 Carcinogênese e seus moduladores

A carcinogênese é um processo composto por múltiplos passos, cujo resultado são alterações na arquitetura do tecido em conjunto com a formação de nódulos neoplásicos, que por sua vez, irão preceder o aparecimento do câncer (FEITELSON et al., 2015). Além disso, o processo ocorre de modo lento, sendo possível que demore anos para que a célula alterada dê origem a um tumor visível. O processo de formação do tumor pode ser dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão. Durante o primeiro estágio, a iniciação, as células entram em contato com agentes cancerígenos, os quais, por sua vez, irão provocar mutações irreversíveis no DNA da célula, fazendo com que a célula fique "iniciada" para os próximos estágios da carcinogênese. O segundo estágio envolve mecanismos epigenéticos, assim como a seleção e proliferação de células iniciadas, sendo uma etapa que ocupa a maior parte do período de latência, além de geralmente ser irreversível. E por fim, a progressão, onde mecanismos genéticos levam à multiplicação descontrolada e irreversível das células mutadas. Neste último estágio, o câncer já está instalado, e evolui para o surgimento dos primeiros sinais clínicos, podendo evoluir para metástases (INCA, 2014; TSAO et al., 2004).

Os processos de mutações podem ocorrer em alguns genes-chave, os quais são responsáveis por desempenhar um importante papel na carcinogênese, dentre eles os genes supressores de tumor e proto-oncogenes, responsáveis por codificar proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, na transdução de sinal e regulação de transcrição (TSAO et al., 2004). Por exemplo, a proteína p53, um gene supressor de tumor, é descrita como "guardião do genoma", tendo importante papel de promover controle do ciclo celular em G2/M e G1, reconhecimento de danos no DNA, indução de apoptose e senescência (LEVINE et al., 2009). Caso essa proteína se apresente alterada, os resultados são desregulação no controle do ciclo celular associada à

proliferação celular descontrolada de células mutadas. Portanto, a expressão de genes que controlam proliferação celular, apoptose, auto-renovação e diferenciação é de extrema importância, e é o ponto chave para o início de qualquer processo carcinogênico, pois estes necessitam sofrer mutações epigenéticas ou genéticas, para que não promovam suas funções adequadamente (WONGTRAKOONGATE, 2015). Além de mutações em nível de genes supressores de tumor, tem-se essencial envolvimento dos proto-oncogenes, que normalmente codificam proteínas que estimulam a divisão celular, inibem diferenciação celular e param a morte celular. Mas quando ativados (mutados) são denominados oncogenes, que irão aumentar a produção das proteínas, conduzindo a um aumento na divisão celular, redução da diferenciação celular, e inibição de morte celular, favorecendo o crescimento do tumor (CHIAL, 2008).

Por apresentar atividade celular desordenada, os pacientes portadores de câncer frequentemente desenvolvem uma síndrome chamada de caquexia, sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer em estágio avançado. A caquexia cancerosa é uma síndrome complexa e multifatorial caracterizada por um intenso consumo generalizado dos tecidos corporais, muscular e adiposo, com uma perda progressiva e involuntária de peso, anemia, astenia, balanço nitrogenado negativo, disfunção imune e alterações metabólicas, geralmente associadas à anorexia. A anorexia é intensificada pelas alterações no metabolismo dos nutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios), alterações hormonais, além do aumento das citocinas circulantes (TNF α , IL-1, IL-6, IFN- γ) (SILVA, 2006).

O desenvolvimento do câncer é resultado da seleção de células cujas alterações fornecem sobrevivência e vantagens proliferativas. As células clones passam a se adaptar a um microambiente hostil sempre em mudança, onde a tensão de oxigênio é baixa, assim como os níveis de glicose e o pH extracelular se encontram abaixo do normal, proporcionando instabilidade genética. Em resultado a essas condições, os fatores induzíveis por hipóxia, HIF-1 e HIF-2, estão regulados, sendo os responsáveis por ativar genes que medeiam proliferação tumoral, angiogênese (origem de novos vasos sanguíneos, permitindo a nutrição tumoral), o metabolismo intermediário (glicólise) e regulação do pH, promovendo assim o desenvolvimento do tumor (FEITELSON et al., 2015).

HIF-1 α é responsável por estimular a produção de fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante β (TGF- β), o fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF-2), a interleucina (IL)-6 e a IL-8, o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), o fator de crescimento e receptores, e ainda, o fator de crescimento de receptor epidérmico (EGFR), proporcionando assim sinalização para uma proliferação contínua (FEITELSON et al., 2015).

Na carcinogênese, a arquitetura do tecido encontra-se alterada como resultado do processo necrótico e do desenvolvimento de respostas à hipóxia, que por sua vez, vão atrair células inflamatórias (SHAY et al., 2012). Isto inclui normalmente macrófagos associados ao tumor (TAM), responsáveis por estimular a proliferação tumoral através da promoção de processo angiogênico; assim como pela progressão tumoral, por promover invasão e metástase, por meio da secreção de citocinas e fatores de crescimento (QIAN et al., 2010; JEDINAK et al., 2010).

Dentre os fatores supracitados, o microambiente tumoral é constituído de modo importante por mediadores inflamatórios, sendo que em alguns casos as doenças inflamatórias precedem e promovem a alteração maligna; enquanto em outros a alteração neoplásica induz um ambiente inflamatório, resultando no desenvolvimento tumoral. Portanto, em ambos os casos o ambiente inflamatório para o tumor proporciona a progressão das células malignas, e promove proliferação, sobrevivência, angiogênese e metástase (MANTOVANI et al., 2008). Para demonstrar a influência da inflamação no desenvolvimento tumoral, Rodrigues Viana et al., (2015) utilizaram um modelo de tumor mamário de camundongos, onde foram observados altos níveis de MPO (mieloperoxidase) e NAG (N-acetil- β -D-glucosaminidase) tanto na inflamação aguda quanto na crônica. Este resultado pode ser relacionado com o crescimento tumoral, já que os grupos estimulados pelos implantes a desenvolver um processo inflamatório, elevando os parâmetros inflamatórios, apresentaram um desenvolvimento tumoral superior do que o grupo portador unicamente do tumor. Além disso, o grupo portador de tumor com inflamação crônica foi mais eficaz para favorecer a progressão tumoral do que o exposto à inflamação aguda (RODRIGUES VIANA et al., 2015).

Processos inflamatórios crônicos associados com infecções ou doenças autoimunes são um dos fatores que precedem o desenvolvimento tumoral, a partir da

mutação em oncogenes, promoção de instabilidade genômica e angiogênese, resultando em promoção tumoral inicial. Além disso, respostas inflamatórias podem promover processos metastáticos, levando à imunossupressão. A terapia antitumoral causa respostas inflamatórias, podendo levar à trauma, necrose e injúria tecidual, o que estimula a reinstalação do tumor e resistência à terapia. No entanto, em alguns casos, a terapia inflamatória, pode levar à apresentação de antígeno, por exemplo, promovendo à erradicação do tumor (Figura 1) (GRIVENNIKOV et al., 2010).

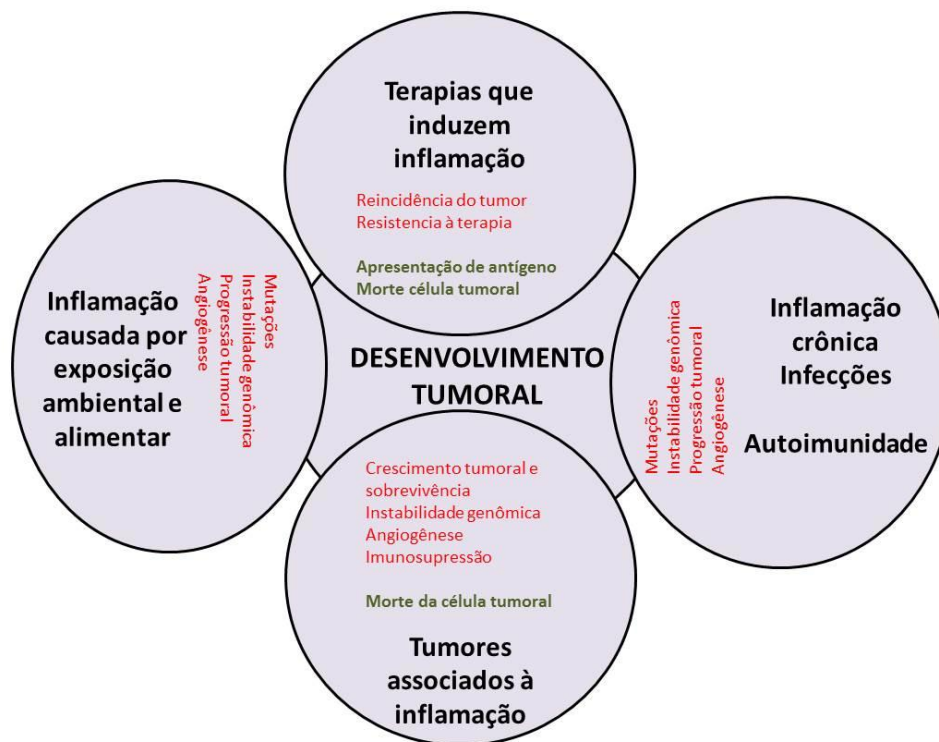


Figura 1- Tipos de inflamação e sua influência na carcinogênese ou tumor instalado. Adaptado de : Grivennikov et al., 2010.

A Tabela 1 resume a função essencial dos componentes inflamatórios no desenvolvimento tumoral, e como podem agir para obter um mecanismo antitumoral.

Tabela 1 – Papel dos diferentes subtipos de células com atividade imune antitumoral e inflamação promotora de tumor.

Tipo celular	Ação antitumoral	Promoção do Tumor
Macrófagos, células dendríticas, supressor de células derivadas mieloides	Apresentação de antígeno, Produção de citocinas (IL-12 e IFN tipo I)	Imunossupressão, Produção de citocinas, quimiocinas, proteases
Mastócitos		Produção de citocinas
Células B	Produção de anticorpos específicos contra o tumor?	Produção de citocinas, Ativação de mastócitos, Imunossupressão
Células T CD8 ⁺	Lise direta de células cancerígenas, Produção de citocinas citotóxicas	Produção de citocinas?
Células Th2 CD4 ⁺		“Educação” de macrófagos, Produção de citocinas, Ativação de células B
Células Th1 CD4 ⁺	Linfócitos T help citotóxicos (CTLs) na rejeição do tumor	Produção de citocinas
Células Th17 CD4 ⁺	Ativação de CTLs	Produção de citocinas
Células T regulatórias	Supressão da inflamação (citocinas e outros mecanismos de supressão)	
Células Natural Killer	Citotoxicidade direta em direção à célula cancerígena, Produção de citocinas citotóxicas	
Células T Natural Killer	Citotoxicidade direta em direção à célula	

	cancerígena, Produção de citocinas citotóxicas	
Neutrófilos	Direta citotoxicidade, Regulação de resposta à CTL	Produção de citocinas, proteases e ROS

Tabela adaptada de Grivennikov et al., 2010. Legenda: IFN: Interferon; IL-12: interleucina-12; CTL: Linfócitos T helper citotóxicos; ROS: Espécies reativas de oxigênio.

Estima-se que aproximadamente 20% dos cânceres são atribuídos a doenças inflamatórias, as quais por meio da produção de citocinas podem induzir à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies intermediárias de nitrogênio (RNI) (Figura 2). Essa produção excessiva resulta em mutações no DNA da célula normal, transformando-a em uma célula neoplásica. Quando o tumor já está instalado, alguns mecanismos podem levar ao estresse oxidativo no paciente com câncer, como o metabolismo energético alterado, devido à anorexia/caquexia, náuseas e vômitos, que impedem uma nutrição normal, promovendo assim, um suprimento anormal de nutrientes como glicose, proteínas e vitaminas. Além disso, a ativação crônica não-específica de citocinas pró-inflamatórias e o uso de drogas antineoplásicas, particularmente agentes alquilantes e cisplatina, também são capazes de produzir ROS em excesso, levando ao estresse oxidativo (MANTOVANI et al., 2002). Os principais radicais livres encontrados nas células são: o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o hidroxil (OH^{\bullet}), o alcoxil (RO^{\bullet}), o peroxil (ROO^{\bullet}) e o hidroperoxil ($ROOH^{\bullet}$) (ROSA & COIMBRA, 2009).

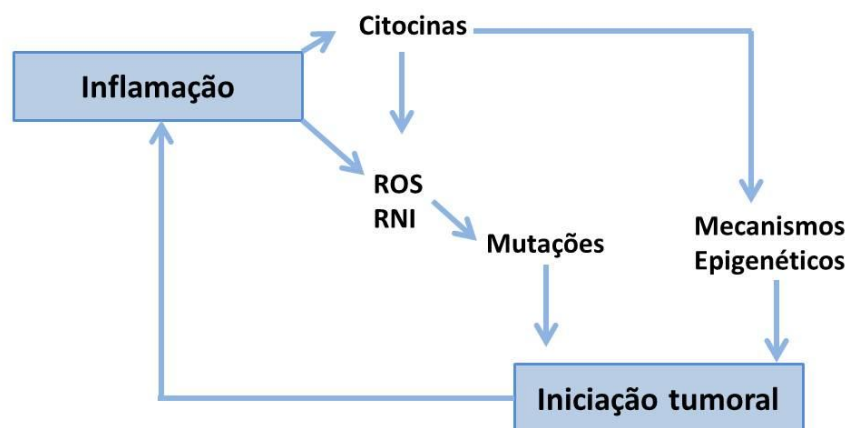


Figura 2 – Processo de iniciação tumoral, demonstrando células inflamatórias produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies intermediárias de nitrogênio (RNI), levando a mutações. Adaptado de: Grivennikov et al., 2010.

A geração de radicais livres é um fenômeno celular constante, impossível de ser totalmente prevenido. No entanto, existem vários mecanismos de controle formados por antioxidantes fisiológicos. Essas moléculas são capazes de competir com substratos oxidáveis e, conseqüentemente, inibem ou atrasam o processo de oxidação. Dentro deste aparato de defesa celular, destacam-se algumas enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (Cat), a glutaciona peroxidase (GPx) e a glutaciona redutase (GR), e algumas substâncias não enzimáticas, como a glutaciona, as vitaminas C e E, os flavonóides, o caroteno e o ácido lipóico (GATÉ et al., 1999). Ainda, a glutaciona S-transferase (GST) é o principal grupo de proteínas solúveis do fígado, envolvida na detoxificação celular de compostos eletrolíticos, pois metaboliza carcinógenos, poluentes ambientais, e outros xenobióticos. Sua ação detoxificante é importante na proteção contra estresse oxidativo, câncer e outras doenças degenerativas, incluindo aquelas associadas com o envelhecimento (TORRES et al., 2006).

1.3 Morte celular programa: Apoptose e Necroptose

Associada ao estresse oxidativo está a apoptose, um evento natural responsável por remover células que sofreram mutações potencialmente danosas ou alterações de controle do ciclo celular, e que podem originar uma neoplasia (STRASSER

et al., 2000). A apoptose é reconhecida como a forma mais importante de morte celular, sendo composta por duas vias centrais, a extrínseca (via morte celular mediada por receptor) e a intrínseca (via mitocondrial), na qual ocorre a ativação de caspases. A apoptose apresenta um mecanismo de defesa fundamental contra o câncer, o que leva à morte de células potencialmente prejudiciais. Processos apoptóticos desregulados têm sido implicados em numerosas doenças. Estes levam à inibição da morte celular e a progressão de doenças, incluindo o câncer (ZHAO et al., 2013).

Uma sinalização apoptótica mostra-se importante para se obter a preservação do equilíbrio entre a morte celular e sobrevivência da célula, mantendo, desta forma a integridade do genoma (PLATI et al., 2011). Para o desenvolvimento do câncer, as vias apoptóticas se mostram alteradas geneticamente, ou seja, as células cancerígenas podem se utilizar de uma série de estratégias para evitar o processo apoptótico (FULDA, 2010). A família de genes Bcl-2 pode ser dividida em componentes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Os pró-apoptóticos mais conhecidos são Bax e Bad, e os anti-apoptóticos são Bcl-2 e Bcl-xL. Como um todo, o balanço entre a atividade de ambos os tipos de proteínas definirá a viabilidade celular (ZIMMER, 2007). Em células malignas existe, frequentemente, um desequilíbrio entre a expressão de proteínas da família Bcl-2 pró- e anti-apoptóticas. Um excesso de Bcl-2 ou Bcl-xL, ambas anti-apoptóticas, pode estar presente em mais da metade de tipos de câncer. Por outro lado, a perda da expressão de membros pró-apoptóticos, como Bax, também pode ocorrer. Este tipo de desequilíbrio é responsável pela sobrevivência dos tumores frente à grande pressão de seleção que sofrem (JUIN et al., 2004).

Outro processo de morte celular associado é a necroptose, também denominado necrose controlada, ou independente da ativação de caspases. Este processo pode ser desencadeado por diversos fatores, dentre eles o TNF- α , o qual estimula a ação das proteínas RIP-1 (proteína quinase de interação ao receptor 1), RIP-3 (proteína quinase de interação ao receptor 3) e MLKL (proteína quinase de domínio de linhagem mista), resultando na formação do necrossomo (complexo RIP1-RIP3-MLKL), que por fim, induz à morte celular por diminuição da permeabilidade celular, com influxo de Ca^{2+} , redução de ATP celular, e produção de espécies reativas de oxigênio. Esta via de morte celular está representada na Figura 3. Por ser uma via independente de caspases, e estar ativa somente em estados de inativação da

caspase-8, esta via tem sido estudada como um novo alvo antitumoral, principalmente para tumores resistentes à morte por apoptose, sendo deste modo, de suma importância para novas terapias (SU et al., 2016).

A ligação do TNF- α ao seu receptor transmembrana pode ativar três diferentes vias (SU et al., 2016), apresentadas abaixo e ilustradas na Figura 3.

- Estímulo de NF- κ B: Para que ocorra a ativação da síntese de NF- κ B (fator nuclear kappa B), e conseqüentemente estimulação da síntese de citocinas pró-inflamatórias, é necessário que a proteína RIP1 esteja ubiquitinada, permanecendo em um formato inativo, e deste modo, impedindo o estímulo das demais vias.
- Apoptose: A via de apoptose é estimulada quando ocorre deubiquitinação da proteína RIP1, fazendo com que a mesma permaneça inativa por um complexo formado por caspase 8 e FADD (domínio de morte associado ao Fas), impedindo assim o seu processo de fosforilação, e deste modo, induzindo a célula a entrar em apoptose.
- Necroptose: A via de necroptose será ativada em casos onde a caspase 8 está incorreta ou inativada, promovendo assim a liberação da proteína RIP-1, a qual passa por um processo de fosforilação, tornando possível a posterior fosforilação de RIP-3, e conseqüentemente de MLKL, as quais compõem o necrossomo, induzindo assim, morte celular.

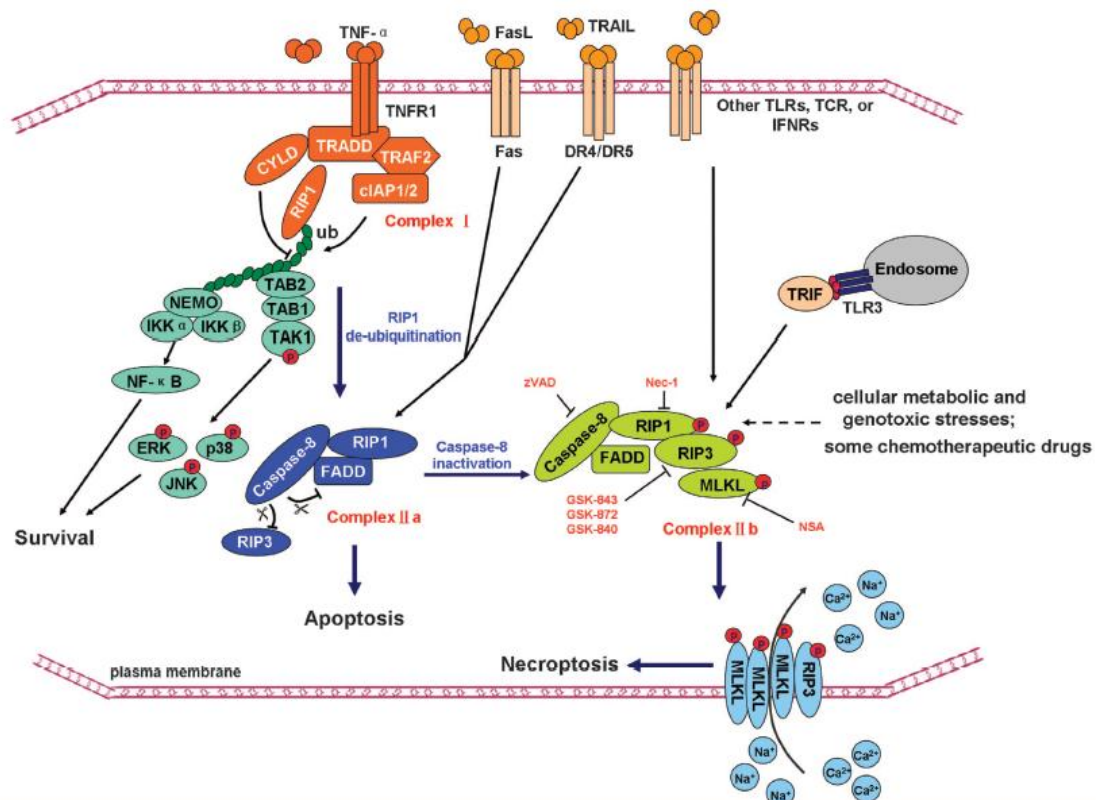


Figura 3 – Sinalização mediada por TNF- α induzindo apoptose ou necroptose. FONTE: SU et al., 2016.

Legenda: TNF α - fator de necrose tumoral α ; NF- κ B - fator nuclear kappa B; ERK - quinase de regulação-sinalização extracelular; TNFR - receptor da superfamília de TNF (Fas e DR4/DR5); TLR3 e TLR4 - Receptores Toll-like; ROS - espécies reativas de oxigênio; ciAP1 - ligases inibidoras celulares de apoptose E3 1, ciAP2 - ligases inibidoras celulares de apoptose E3 2; CYLD - cilindromatose deubiquitinase, TRAF2 - Receptor TNF associado ao fator 2; FADD - Fas- associado ao domínio de morte; Nec-1 – inibidor de RIP1-quinase; GSK-843/-872 – inibidor de RIP3-quinase; NSA - necrosulfonamide, inibidor MLKL; TNFR1 - TNF receptor 1; NEMO, IKK- γ - NF-kappa-B essencial modulador , ou inibidor da subunidade gama do NF-kB; DR4/5, death receptor 4 ou 5; TLRs - receptores toll-like; TCR – receptor de células T; TAK1 – fator crescimento transformante β - ativado por quinase 1; TAB2 - TAK1- ligada a proteína 2; TRIF - Toll/IL-1 receptor contendo o domínio de adaptador de indução.

De modo similar às células em apoptose, as células tumorais em necroptose são capazes de promover imunidade antitumoral, resultando assim na eliminação do conteúdo necroptótico por células fagocíticas, além de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Deste modo, tem-se um gatilho para regulação positiva de estimulação de moléculas e um provável gatilho para respostas imunológicas adaptativas (MENG et al., 2015).

É interessante observar que a fase de desintegração celular tanto da necroptose, quanto da necrose e necrose secundária (apoptose tardia), é caracterizada pela mesma sequência de eventos intracelulares, incluindo principalmente, hiperpolarização mitocondrial, 'erupção' oxidativa e permeabilização da membrana lisossomal. Esta última corresponde ao processo final da morte celular, pois coincide com a desintegração celular (VANDER BERGHE et al., 2010). Além disso, a necroptose pode ser inibida quimicamente por compostos como a necrostatina-1, inibidor de RIP-1, GSK-843, GSK-872, GSK-840, inibidores de RIP3 quinase, e necrosulfanamida, e inibidores de MLKL (JOUAN-LANHOUE et al., 2014). Contudo, ainda são necessários muitos estudos sobre essa via, baseados em experimentos *in vitro* assim como na verificação da eficácia *in vivo* (MENG et al., 2015).

1.4 Tratamentos antineoplásicos

Atualmente existem diferentes formas de tratamentos antineoplásicos, como a radioterapia, cirurgia, imunoterapia e quimioterapia, usadas isoladamente ou em combinação. A radioterapia é o tratamento onde se faz a utilização de radiação, a qual será responsável por destruir o tumor e/ou impedir a sua disseminação para os demais tecidos corporais. Já a cirurgia consiste na remoção do tumor, no entanto, esta técnica não é válida em casos onde o tamanho do tumor excede ao total de tecido possível de ser retirado. A imunoterapia consiste na estimulação do sistema imunológico, através do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica, podendo esta ser o resultado da interação antígeno-anticorpo, ou até mesmo de mecanismos envolvidos na imunidade mediada por células. E por fim, a terapia mais convencional em pacientes com câncer, a quimioterapia, na qual são utilizados medicamentos para combater o desenvolvimento da doença (INCA, 2014). Os quimioterápicos podem ser classificados de acordo com a especificidade de ação no ciclo celular, sendo denominados como ciclo-específicos e ciclo inespecíficos; ou então quanto a sua estrutura química e ao seu mecanismo de ação, podendo ser agentes alquilantes, antimetabólicos, antibióticos antitumorais, alcaloides, agentes múltiplos e hormônios e antagonistas hormonais. Dentre as drogas quimioterápicas mais utilizadas estão a vincristina, metotrexato e cisplatina, que possuem diferentes mecanismos de ação

(Tabela 2). Contudo, esses agentes quimioterápicos apresentam muita resistência à remissão total do tumor, por (a) razões farmacocinéticas, ou seja, quando a droga não atinge a célula cancerosa em concentrações adequadas; (b) por mecanismos bioquímicos, quando há o bloqueio da célula ao transporte do fármaco quimioterápico; e (c) pela expressão de proteínas de múltipla resistência a drogas. Com a presença destes fatores, a concentração intracelular do fármaco se reduz e a sobrevivência da célula tumoral e a resistência à quimioterapia aumentam (MERCK, 2015). Por estas razões, novos fármacos antineoplásicos, eficientes e com poucos efeitos adversos, são alvos de estudos.

Tabela 2 – Principais agentes antineoplásicos e seus mecanismos de ação.

Fármacos	Mecanismos de ação
Antimetabólicos Ex: Metotrexato	Bloqueiam a produção de metabólitos essenciais, como purinas, pirimidinas e ácido fólico, os quais são fundamentais para as cadeias de DNA e RNA
Alcalóides Ex: Vincristina	Inibidores mitóticos, responsáveis por bloquear a divisão celular, a metáfase, ligando-se às proteínas dos microtúbulos, destruindo-os e impedindo a polarização dos cromossomos
Agentes alquilantes Ex: Cisplatina	Promovem alterações na cadeia de DNA, impedindo sua replicação

Tabela adaptada de Maia et al., 2010.

1.5 Extrato solúvel de polissacarídeos extraído do vinho

Apesar de todos os fármacos disponíveis, ainda se têm uma extensa carência de fármacos antineoplásicos que sejam eficientes no tratamento do tumor, com mínimos efeitos tóxicos ao paciente, e que sejam capazes de "burlar" os processos de resistência celular, para obtenção de alta eficácia antineoplásica.

Desta forma, na tentativa de obter novos compostos com atividade antitumoral, é que os polissacarídeos obtêm destaque. Relatos recentes têm demonstrado atividades antitumorais, antimetastáticas, imunomodulatórias, antiulcerogênica e antioxidante *in vitro e in vivo*, de polissacarídeos extraídos de algas marinhas, frutas, peixes e cogumelos (HUANG et al., 2015; INNGJERDINGEN et al.,

2014; MAU et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2013; OOI & LIU, 2010; PARK et al., 2013; REN, 2012; ROUT et al., 2007; SUO et al., 2015; WASSER, 2002; ZHOU et al., 2008). Os polissacarídeos são substâncias consideradas modificadoras de resposta biológica (WASSER, 2002 apud Wasser & Weis 1999), ou seja, eles não causam nenhum dano local, proporcionando ao organismo adaptar-se às várias tensões ambientais e biológicas; e exercem ação não-específica sobre as células, apoiando alguns dos principais sistemas, incluindo o nervoso, hormonal e imunológico (WASSER, 2002 apud Brekhman, 1980).

Seguindo esta linha de raciocínio é possível observar que sua extração pode ocorrer através de inúmeras substâncias encontradas na natureza, dentre elas as frutas. O vinho é uma bebida alcoólica oriunda da fermentação da uva, e por essa razão contém polissacarídeos, como arabinogalactana, rhamnogalacturonana, dentre outros, os quais, quando extraídos de outros compostos naturais podem ser responsáveis por importantes efeitos imunomodulatórios (MELLINGER et al., 2008), antissepticêmico (DARTORA et al., 2013), protetor gástrico (CIPRIANI et al., 2006; INNGJERDINGEN et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2013) e antitumoral (MUELLER & ANDERER, 1990; PARK et al., 2013).

Segundo Liu et al., 2016, muitos polissacarídeos isolados de plantas tem apresentado promissoras atividades antitumorais. Chen et al., 2014, demonstraram que polissacarídeos isolados da *Artemisia annua L* promovem a elevação dos níveis de linfócitos CD4+/ CD8+ no baço de camundongos portadores de hepatoma H22, proporcionando uma regulação imunológica em animais tratados com o polissacarídeo. Além disso, animais portadores de câncer gástrico, ao serem tratados com polissacarídeos da família *Portulacaceae* demonstraram uma elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF- α no soro desses animais (LI et al., 2014). Associada às diferentes intervenções de polissacarídeos sobre o sistema imunológico, a arabinogalactana da *Anoectochilus formosanus*, também promove uma elevação na porcentagem de células dendríticas, CD3+, CD8+, linfócitos T e células *natural killer*, possuindo uma potente atividade antitumoral contra câncer de colón CT26, por modulação imunológica (YANG et al., 2014). Por meio de tais relatos, é possível observar que o principal mecanismo de ação dos polissacarídeos extraídos de

plantas é promover modulação da resposta imunológica (YANG et al., 2014), essencialmente sobre os linfócitos T e sobre a produção de TNF- α .

Segundo Wasser (2002), a ação imunomodulatória dos polissacarídeos do cogumelo é especialmente profilática, principalmente prevenindo metástases. Ooi e Liu (1999) relataram que os polissacarídeos dos cogumelos não 'atacam' as células cancerosas diretamente, mas produzem os seus efeitos antitumorais ativando diferentes respostas imunes no hospedeiro. Estes autores verificaram perda de efeito antitumoral de polissacarídeos em animais timectomizados neonatos ou ratos filhotes após a administração de anticorpos anti-linfócitos (OOI & LIU, 1999). Sugerindo assim, que a ação antitumoral dos polissacarídeos necessita de células T intactas, e que essa atividade é mediada por mecanismos imunes dependentes do timo. Associada a esta informação, a atividade antitumoral de lentinano e outros polissacarídeos é perdida com pré-tratamento com agentes anti-macrófagos (como carragenina).

Apesar das informações supracitadas de alguns polissacarídeos, não há estudos sobre os polissacarídeos extraídos diretamente do vinho tinto. Considerando que esta bebida é mundialmente apreciada, seus consumidores ingerem polissacarídeos que podem lhes ser benéficos. Alguns efeitos benéficos do vinho para a saúde são atribuídos ao resveratrol, um polifenol presente na casca das uvas com propriedades antioxidantes, reguladora de lipídeos plasmáticos, da atividade cardíaca, e protetora contra doenças neurodegenerativas e câncer (JANG et al., 1997; SINGH et al., 2015). O resveratrol vem sendo extensamente estudado, mas outros componentes do vinho, como os polissacarídeos, ainda carecem de investigações, sendo objetos de estudo deste trabalho.

1.6 Tumor Walker-256

O tumor Walker-256 (W256) é um carcinossarcoma de crescimento rápido, descoberto na Universidade Johns Hopkins – Pittsburgh, Estados Unidos, no ano 1928, pelo Dr. George Walker. Em suas primeiras anotações sobre o tumor, Dr. Walker o descreveu como um tumor progenitor do tamanho de um pequeno ovo e aparentemente originado do tecido mamário. Microscopicamente, sua descrição foi de uma típica estrutura de um adenocarcinoma: algumas áreas de estrutura glandular

inalteradas, epitélio proliferativo, lóbulos distorcidos e epitélio de massas irregulares (EARLE, 1934).

As características do tumor são alteradas de acordo com o local de inoculação, como por exemplo, o tecido subcutâneo e intramuscular. Os tumores inoculados no tecido subcutâneo apresentavam uma característica encapsulada de modo geral, apesar de algumas vezes essa cápsula aparecer incompleta em locais de infiltrações teciduais circundantes, especialmente com grandes tumores. Ao contrário, com a inoculação intramuscular, essas infiltrações são mais numerosas, demonstrando um comportamento mais agressivo do tumor, sendo possível observar pouco, ou nenhum sinal de formação da cápsula. Além disso, foram observados pontos de metástase nos gânglios retroperitoneais e pulmões. Os pesquisadores ainda identificaram que as tentativas de inoculação interespecies não foram bem sucedidas, afirmando desta forma, que o tumor Walker-256 é um modelo de tumor espécie-específico, para ratos (GOLDACRE & SYLVEN, 1962; SCHREK, 1935).

Desde então, essa linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos antineoplásicos e de caquexia induzida pelo tumor, por ser facilmente transplantado e por possuir uma estabilidade *in vitro* e *in vivo* através do tempo. Outro fator de extrema importância é que este modelo apresenta fatores clínicos importantes apresentados em pacientes com câncer, podendo ser utilizado para estudos de *screening* de novas drogas antineoplásicas (ACCO et al., 2012).

O procedimento de inoculação das células mais indicado é por via subcutânea, em ratos pesando entre 230-280 g. A recomendação anterior à inoculação subcutânea é a passagem das células por via intraperitoneal, até que as mesmas adquiram características de viabilidade e malignidade adequadas para então desenvolverem um tumor sólido (Figura 4).

Após sua implantação ocorre redução no peso do animal, dificuldade de ingestão adequada de alimento (anorexia), catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Aos 14 dias após o implante a massa tumoral pode representar uma fração considerável do peso do animal e a morte pode ocorrer após este período (VICENTINO et al., 2002; ACCO et al., 2012).

Animais portadores do tumor apresentam significativas alterações hepáticas no metabolismo de glicose, ureia e ácidos graxos. Isso ocorre porque os tumores sólidos

têm uma tendência de ter fornecimento deficiente de sangue, o que pode levar à hipóxia. Como a glicólise anaeróbica é o único meio de produção de ATP na ausência de oxigênio, a glicose é o substrato metabólico predominante para esse tumor. Este elevado consumo leva à gliconeogênese e reduz a captação de glicose e a glicólise, resultando em uma redução de glicose hepática de aproximadamente 63% (ACCO et al., 2012). E Devido a várias alterações metabólicas, o tumor Walker-256 é um modelo tumoral reconhecido por desenvolver a síndrome da caquexia, essencialmente por elevação de NO, PGE₂ (prostaglandina E 2) e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 (REBECA et al., 2008), com desenvolvimento de processos inflamatórios no tecido tumoral. As células Walker-256 são amplamente utilizadas para investigações *in vivo* e *in vitro*, tanto para pesquisas envolvendo dor, atividade enzimática, metabolismo, drogas antineoplásicas, farmacocinética e farmacodinâmica de drogas e metástases. Além de ser um modelo de tumor sólido adequado para estudos envolvendo vias metabólicas, estresse oxidativo e inflamação (ACCO et al., 2012). Por tais razões, foi o modelo de escolha para este estudo, cuja hipótese foi que polissacarídeos extraídos do vinho teriam efeito antitumoral.



Figura 4 – Tumor Walker-256 no membro pélvico direito de rato Wistar, 14 dias após a inoculação de 10⁷ células. Observa-se o centro tumoral com tecido necrosado. FONTE: O autor (2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral, frente ao tumor Walker-256, da fração solúvel de polissacarídeos extraídos do vinho (SFP), identificando as principais vias pelas quais pode agir para produzir tal efeito.

2.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o crescimento tumoral em ratos tratados e não tratados com a SFP, assim como acompanhar o peso ponderal;

b) Investigar os possíveis mecanismos de ação antitumoral da SFP nas vias que envolvem:

(I) mediadores inflamatórios, como $\text{TNF}\alpha$ e as enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG);

(II) apoptose, através da expressão do RNAm da proteína anti-apoptótica Bcl-2, e das pro-apoptóticas p53 e Bax, assim como do fator angiogênico VEGF;

(III) necroptose, através da expressão gênica das proteínas RIP1, RIP3 e MLKL.

c) Avaliar a toxicidade de SFP em vários órgãos, através de indicadores bioquímicos plasmáticos;

d) Investigar as ações da SFP sobre as células do sistema imunológico, por meio de hemograma;

e) Identificar alterações histológicas no tecido tumoral e hepático dos animais tratados.

3 ARTIGO CIENTIFICO

Necroptosis mediates the antineoplastic effects of the soluble fraction of polysaccharide from red wine in Walker-256 tumor-bearing rats

Maria Carolina Stipp^a, Iglesias de Lacerda Bezerra^b, Claudia Rita Corso^a, Francislaine A. dos Reis Livero^a, Luiz Alexandre Lomba^a, Adriana Rute Cordeiro Caillot^b, Aleksander Roberto Zamprônio^a, José Ederaldo Queiroz Telles^c, Giseli Klassen^d, Edneia A.S. Ramos^d, Guilherme Lanzi Sasaki^b, Alexandra Acco^{a*}

^a Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^b Department of Biochemistry, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^c Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^d Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

*** Corresponding author:**

Alexandra Acco, Federal University of Paraná (UFPR), Biological Science Sector, Department of Pharmacology, Centro Politécnico, Cx. P. 19031, Curitiba – Paraná – Brazil, Zip Code 81531-980

Phone: +55 (41) 3361-1742; Fax: +55 (41) 3266-2042

E-mail: aleacco@ufpr.br

ABSTRACT

Polysaccharides are substances that modify the biological response to several stressors. The present study investigated the antitumor activity of the soluble fraction of polysaccharides (SFP), extracted from cabernet franc red wine, in Walker-256 tumor-bearing rats. The monosaccharide composition had a complex mixture, suggesting the presence of arabinoglactans, mannans, and pectins. Treatment with SFP (30 and 60 mg/kg, oral) for 14 days significantly reduced the tumor weight and volume compared with controls. Treatment with 60 mg/kg SFP reduced blood monocytes and neutrophils, reduced the tumor activity of *N*-acetylglucosaminidase, myeloperoxidase, and nitric oxide, increased blood lymphocytes, and increased the levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor tissue. Treatment with SFP also induced the expression of the cell necroptosis-related genes *Rip1* and *Rip3*. The antineoplastic effect of SFP appears to be attributable to its action on the immune system by controlling the tumor microenvironment and stimulating TNF- α production, which may trigger the necroptosis pathway.

Key words: Walker-256 tumor, polysaccharide, red wine, cabernet franc, necroptosis, immunomodulation.

Running title: Red wine polysaccharides: antineoplastic effects

Chemicals

TriZol Reagent, buffered 10% formalin, ethanol, xylol, paraffin, hematoxylin and eosin (HE), phosphate buffer (pH 6.5), Griess solution (0.1% N-1-naphthyl-tilediamine, 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄), saline Triton X-100 0.1%, TMB 18.4 mM, dimethylformamide 8%, sodium acetate (NaOAc), p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine, N-acetyl- β -D-glucosamine, p-nitrofen, ketamine hydrochloride, xylazine,

methotrexate, phosphate buffered saline (PBS; 16.5 mM phosphate, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl) at pH 7.4, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.5 M, pH 8.0), trypan blue 2 M trifluoroacetic acid, trimethylsilyl sodium propionate deuterated (TMSP-2,2,3,3-d4).

Abbreviations

ALT: alanine aminotransferase; ANOVA: Statistical analysis of variance; AST: aspartate aminotransferase; Bax: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; DNA: Deoxyribonucleic acid; EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid; FADD: Fas - associated death domain; Gapdh: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HE: Hematoxylin and eosin; Mlkl: mixed lineage kinase domain-like protein; MPO: myeloperoxidase; mRNA: Messenger ribonucleic acid; MTX: Metotrexato; NAG: N-acetyl- β -D-glucosaminidase; NaOAc: Sodium acetate; NF- κ B: nuclear factor kappa B; NO: Oxide nitric; p53: Protein 53; SFP: Soluble fraction of polysaccharide; Rip-1: receptor-interacting protein kinase 1; Rip-3: receptor-interacting protein kinase 3; ROS: reactive oxygen species; TMB: tetramethylbenzidine; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha; Vegf: vascular epidermal growth factor.

3.1 INTRODUCTION

Cancer is a group of diseases that are related to mutations in key genes that confer a selective growth advantage to cancer cells and regulate core cellular processes, such as cell survival and genome maintenance (Vogelstein et al., 2013). The most conventional treatment for cancer patients is chemotherapy. Drugs that are frequently used include vincristine, methotrexate, and alkylating agents, which induce cell death through different mechanisms of action (e.g., the inhibition of mitosis, metabolism, and angiogenesis). However, chemotherapy has severe side effects and is insufficient to induce complete tumor remission. This occurs mainly because of pharmacokinetics, resulting in lower intracellular drug concentrations, an increase in cell survival, and tumor cell resistance to chemotherapy (Merck, 2015). Therefore, the

search for new substances that are able to circumvent the mechanisms of tumor resistance and have fewer side effects is important.

Recent studies have reported the antitumor activity and antimetastatic, immunomodulatory, and antioxidant properties of polysaccharides that are extracted from seaweed, fruits, fish, and mushrooms (Huang et al., 2015; Inngjerdingen, Thöle, Diallo, Paulsen, & Hensel, 2014; Mau, Chao, & Wu, 2001; Nascimento et al., 2013; Ooi & Liu, 2000; Park et al., 2013; Ren, Perera, & Hemar, 2012; Rout & Banerjee, 2007; Suo et al., 2014; Wasser, 2003; Zhou, Hu, Wu, Pan, & Sun, 2008). Polysaccharides are substances that modify biological responses. The effects of polysaccharides are not cell-specific and instead regulate major bodily systems, including the nervous, hormonal, and immune systems (Wasser, 2003).

Fruits, including grapes, are rich sources of polysaccharides. Red wine is an alcoholic beverage that is derived from the fermentation of grapes, such as cabernet franc, and has a soluble fraction of polysaccharides (SFP) that are mainly composed of arabinogalactans and rhamnogalacturonans. Some authors had described important immunomodulatory, antioxidant, antisepticemic, antineoplastic, and gastroprotective effects of the polysaccharides arabinogalactan and rhamnogalacturonan (Cipriani et al., 2006; Dartora et al., 2013; Inngjerdingen et al., 2014; Mellinger et al., 2008; Mueller & Anderer, 1990; Nascimento et al., 2013; Park et al., 2013). The “French paradox” phenomenon is associated with moderate wine drinking, which reduces the risk of cardiovascular, cerebrovascular, and peripheral vascular diseases and cancer (Pieszka, Szczurek, Ropka-Molik, Oczkowicz, & Pieszka, 2016). Some beneficial effects of wine on health have been attributed to resveratrol, a polyphenol that is present in the skin of grapes. Resveratrol has antioxidant activity, regulates plasma lipids and

cardiac activity, and has protective effects against neurodegenerative diseases and several tumors (Jang et al., 1997; Singh, Liu, & Ahmad, 2015). Resveratrol has been extensively studied, but other components of wine that are present in higher concentrations, such as polysaccharides, require further investigation.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the *in vivo* antitumor activity of SFP that was extracted from cabernet franc red wine in Walker-256 tumor-bearing rats, a model of solid carcinoma. This tumor is species-specific and characterized by fast growth. It is often used in studies of metabolism, oxidative stress, and inflammation that are related to cancer (Acco, Bastos-Pereira & Dreifuss, 2012). Our hypothesis was that SFP modulates tumor development in Walker-256 rats.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Polysaccharides preparation

Cabernet franc polysaccharides were extracted from commercial wine bottles (Vinho Tinto Reserva Salton, Bento Gonçalves, RS, Brasil). The liquid was initially reduced up to 25% of its volume under reduced pressure at 30°C. The supernatants were combined, followed by the addition of 3 volumes of cold ethanol and incubation for 24 h at -20°C. The precipitated polysaccharides were washed twice with 70% cold ethanol and dialyzed against tap water in a membrane with a molecular mass cut-off (MMCO) of 8 kDa (Bezerra, 2016). The retained fraction that contained polysaccharides was lyophilized and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR).

3.2.1.1 Monosaccharide composition by NMR and GC-MS

Wine polysaccharides (5 mg) were hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid (500 μ l) at 100°C for 8 h and evaporated to dryness under N₂ pressure. The residue material was dissolved in 0.5 ml of D₂O. One-dimensional ¹H-NMR was performed at 600 MHz with the pulse program zgpr for HDO presaturation (relaxation delay = 5.0 s, number of time domain points = 65536) to obtain a spectrum width of 10 ppm. The monosaccharides were identified based on the chemical shifts of a standard mixture of 18 monosaccharides (Sasaki et al., 2014). After NMR analysis, the later was reduced with NaB²H₄ for 12 h and evaporated to dryness. Boric acid was removed as trimethyl borate by co-distillation with MeOH. Acetylation was performed with Ac₂O-pyridine (1:1, v/v; 200 μ l) at 100°C for 1 h. Crushed ice-water was added to the solution, and the resulting 2-*O*-Me-Fuc, 2-*O*-Me-Xyl, and alditol acetate derivatives were extracted with CHCl₃ and analyzed by GC-MS (Varian-Saturn 4000-3800 mass spectrometer, 30 m \times 0.25 mm VF-5MS column). The column temperature was set as the following: 50°C for 1 min, increase to 220°C at 40°C/min, then held for 13.0 min. Alditol acetates were identified based on the m/z of their positive ions, with comparisons to standards. The results are expressed as a relative percentage of each component (Sasaki, Gorin, Souza, Czelusniak, & Iacomini, 2005).

3.2.1.2 Structural Identification by NMR

Wine polysaccharides (20 mg) were dissolved in 0.5 ml of D₂O. The NMR spectra were obtained using a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer equipped with an inverse 5-mm probe head (QXI) at 303 K. One-dimensional ¹H-NMR was performed at 600 MHz after 90° (p1) pulse calibration. ¹H and ¹³C chemical shifts were determined by HSQC (pulse program hsqcedetgpsisp2.2) using 6993 Hz (¹H) and 24900 Hz (¹³C)

widths and a recycle delay of 1,080 s. The spectra were recorded for quadrature detection in the indirect dimension using 16 scans per series of 1024×256 data points with zero filling in F1 (2048) prior to Fourier transformation (Sasaki et al., 2013).

3.2.2 Animal model and Walker-256 tumor inoculation

Male Wistar rats, weighing 180-250 g, were obtained from the vivarium of the Federal University of Paraná (Curitiba, Brazil). The animals remained under controlled room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with a 12 h/12 h light/dark cycle and free access to food and water. All of the experimental protocols were approved by the institutional Ethical Committee for Animal Care (CEUA; authorization no. 908) and followed the international rules for animal experimentation.

The maintenance of Walker-256 cells was performed by weekly passages of intraperitoneal (i.p.) injections of 1×10^7 cells/rat. The cells were collected aseptically in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS; 16.5 mM phosphate, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4) and a 0.5 M solution of ethylenediaminetetraacetic acid (pH 8.0) after four or five passages. Each passage took 4-7 days of cell growth in ascitic form (Martins et al., 2015; Christiane Vicentino, Constantin, Bracht, & Yamamoto, 2002). After this period, tumor cell viability was checked by the Trypan blue exclusion method in a Neubauer chamber. Tumor cells were subcutaneously (s.c.) injected in the right hind limb at 2×10^7 cells/rat in 400 μl of solution.

3.2.3 Experimental design

The administration of SFP began the day following s.c. Walker-256 cell inoculation and continued until day 14. The rats received SFP orally, by gavage, at doses of 30 or 60 mg/kg per day. The 30 mg/kg dose was chosen based on other

studies that were performed with the polysaccharides rhamnogalacturonan (Nascimento et al., 2013) and arabinogalactan (Cipriani et al., 2006). Both of these polysaccharides are present in SFP. The dose of 60 mg/kg was chosen as a safety factor dose (2×30 mg/kg).

The treatment groups ($n = 7-10$) were the following: G1 (naive group; no tumor, treatment with vehicle [PBS]), G2 (vehicle group; tumor, treatment with vehicle [PBS]), G3 (SFP30; tumor, treatment with 30 mg/kg SFP), G4 (SFP60; tumor, treatment with 60 mg/kg SFP), G5 (basal group; no tumor, treatment with 30 mg/kg SFP), and G6 (MTX, positive control group; tumor, treatment with 2.5 mg/kg methotrexate, i.p.). SFP was dissolved in PBS (vehicle) every day, just prior to administration. Methotrexate was dissolved in 0.9% saline solution and administered i.p. every 5 days. This protocol was based on Paula et al. (2007), with minor modifications based on the features of Walker-256 tumor growth.

After 14 days of treatment, the animals were fasted for 12 h, with free access to water, and anesthetized by an i.p. injection of ketamine hydrochloride (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) for biological material collection. Blood was collected from the inferior cava vein with anticoagulant EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) and used for hematological and plasma biochemical analyses. The liver and tumor were subsequently harvested, weighed, fragmented for histological analysis, and partially frozen (-80°C) for further analyses of inflammatory parameters and gene expression. The spleen, lungs, and kidneys were also harvested and weighed. Euthanasia was performed under anesthesia by puncturing the diaphragm.

Tumor volume was assessed daily with a pachymeter and calculated according to Mizuno et al. (1999) using the following formula:

$$V(\text{cm}_3) = (4\pi/3a^2 \times (b/2))$$

a is the smallest tumor diameter, and b is the largest tumor diameter (in centimeters). The tumor weight was also recorded at the end of treatment. During the experiment, the animals' body weight was recorded every 3 days.

3.2.4 Biochemical and hematological assays

Biochemical and hematological analyses were performed to identify possible toxic effects of the treatment on target organs and blood cells. Blood samples were centrifuged at 4,000 rotations per minute (rpm) for 5 min. The plasma was then stored at -20°C . The levels of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), glucose, amylase, and creatinine were assessed using commercial kits (Kovalent, São Gonçalo, Brazil) with an automated device (Mindray BS-200, Shenzhen, China). Based on the number of hematological cells, the peripheral neutrophil-monocyte/lymphocyte ratio (NMLR) was calculated according to Liao et al. (2016).

3.2.5 Evaluation of inflammatory parameters in tumor tissue

3.2.5.1 Determination of the enzymatic activity of myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG)

Samples of tumor tissue were weighed and homogenized in 0.1% Triton X-100 saline to determine the enzymatic activity of myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG), indicating neutrophil and macrophage (mononuclear cell) migration, respectively. The homogenates were centrifuged at 10,000 rpm at 4°C for 10 min, and the supernatants were used to determine MPO and NAG activity.

The reading of MPO absorbance was performed at 620 nm as described by Bradley et al. (1982). The reaction began by adding 18.4 mM tetramethylbenzidine (TMB) diluted in 8% dimethylformamide in water, followed by incubation for 3 min at 37°C . The reaction was stopped by adding sodium acetate (NaOAc) immersed in ice.

The NAG assay was based on Sánchez & Moreno (1999). NAG activity was measured at 405 nm as the hydrolysis of p-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosamine (substrate) in *N*-acetyl- β -D-glucosamine, which releases p-nitrophenyl.

3.2.5.2 Determination of nitrite levels in tumor tissue

Nitric oxide (NO) is involved in many physiological processes, including inflammation, immune reactions, and defense mechanisms against organisms and tumors (COSTA, FABENI, APTEKMANN, & MACHADO, 2003). The tumor samples were homogenized in phosphate buffer (pH 6.5; 1:10 dilution), and the homogenate was centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was used to measure nitrite levels at 540 nm according to Green et al. (1982) using Griess solution (0.1% *N*-1-naphthyl-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄) as the reactive medium. The amount of nitrite in the incubation medium was calculated by using sodium nitrite (Sigma) as the standard.

3.2.5.3 Quantification of TNF- α

The determination of tumor necrosis factor α (TNF- α) concentrations in the tumor samples was performed using an enzyme-linked immunosorbent assay kit according to the manufacturer's instructions (R&D Kit Systems, Minneapolis, MN, USA). The homogenate was the same as the one that was used to determine nitrite levels.

3.2.6 Histopathology

Fragments of tumor and liver tissue were fixed in buffered 10% formalin at room temperature. After fixation, the samples were dehydrated in ethanol and xylol and then embedded in paraffin. Afterward, 4 μ m sections were processed for

histology. The slices were stained with hematoxylin/eosin and analyzed under an optical microscope in a blinded fashion.

The histological parameters in tumor slices included coagulative and suppurative necrosis, apoptosis, lymphocytic infiltration, vascularization, vacuolization, and cytological features. For liver slices, the analysis included lymphocytic infiltration, the degree of necrosis and apoptosis, tumefaction, and steatosis. In both organs, the histological changes were quantified according to the frequency at which they appeared (Huvos, Rosen, & Marcove, 1977). The panels of histology were obtained with a slices scanner (Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.2.7 Gene expression by qPCR (quantitative PCR analysis)

The expression of target genes for apoptosis, necroptosis, and angiogenesis was assessed in tumor samples. RNA was isolated using TriZol reagent (Invitrogen) in 1 cm × 1 cm tumor samples. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of this RNA using High Capacity III enzyme (Qiagen) according to the manufacture's protocol. For quantitative polymerase chain reaction, we used 6 µl of SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems), 800 nM of specific primers after standardization, and 1 µl of cDNA (1:5 dilution) using StepOne Plus (Applied Biosystems). The analyses were performed in triplicate. mRNA levels were determined for the pro-apoptotic proteins p53 (*p53*) (5'-CCCCTGAAGACTGGATAACTG-3' Forward Primer; 5'-ATTAGGTGACCCTGTCGCTG-3' Reverse Primer), Bcl-2-associated protein (*Bax*) (5'-AAACTGGTGCTCAAGGCC-3' Forward Primer; 5'-GGGTCCCGAAGTAGGAAAGG-3' Reverse Primer), and caspase-3 (5'-GGTATTGAGACAGACAGTGG-3' Forward Primer; 5'-CATGGGATCTGTTTCTTTGC-3' Reverse Primer), the antiapoptotic protein B cell lymphoma 2 (*Bcl-2*) (5'-GACTGAGTACCTGAACCGGC-3' Forward Primer; 5'-

AGTCCACAAAGGCATCCCAG – 3' Reverse Primer), the angiogenic factor vascular endothelial growth factor (*Vegf*) (5'- AGA AAG CG? ATG AAG TGG TG -3' Forward Primer; 5'- ACTCCAGGGCTTCATCATTG -3' Reverse Primer), and the necroptotic proteins *Rip-1* (5'-AGGTACAGGAGTTTGGTATGGGC-3' Forward Primer; 5'-GGTGGTGCCAAGGAG ATGTATG-3' Reverse Primer), *Rip-3* (5'-TAGTTTATGAAATGCTGGACCGC-3' Forward Primer; 5'-GCCAAGGTGTCAGATGATGTCC-3' Reverse Primer), and *Mkl1* (5' -CCCGAGTTGTTGCAGGAGAT-3' Forward Primer; 5' -TCTCCAAGATTCCATCCGCAG-3' Reverse Primer). In all of the analyses, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) (5'- AACGACCCCTTCATTGAC -3' Forward Primer; 5'- TCCACGACATACTCAGCAC-3' Reverse Primer), was used as the housekeeper gene control. The specific primers and sequences for the rat genes were prepared by Invitrogen (Breda, The Netherlands; São Paulo, Brazil). Gene expression is reported as the relative expression of mRNA.

3.2.8 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 software. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test. The criterion for statistical significance was $p < 0.05$. The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3.3 RESULTS

3.3.1 Isolation and chemical analysis of the polysaccharide fraction

Wine polysaccharides from commercial bottles were concentrated and precipitated with excess ethanol. The sediment was centrifuged, dialyzed against tap water, and freeze-dried, giving the SFP (1.5 g/bottle). The monosaccharide

composition of SFP was performed using NMR and GC-MS because of the presence of uronic sugars and rare 2-*O*-Me-Fuc and 2-*O*-Me-Xyl (Table 1). 2-*O*-methyl substitution was confirmed by electron ionization mass spectrometry, which identified key fragments at *m/z* 117, 127, 159, 174, 234, and 261 (2-*O*-Me-Xyl) and *m/z* 117, 129, 160, 173, and 231 (2-*O*-Me-Fuc).

Table 1 - Monosaccharide composition of the red wine polysaccharides.

Fraction	Method	^a Monosaccharide %							
		Gal	Ara	Rha	Man	Glc	2OMeXyl	2OMeFuc	GalA
SFP	GC-MS	39.7	13.1	9.2	19.2	10.1	0.4	0.3	8.0*
	NMR	38.0	14.5	9.3	16.3	11.1	nd	Nd	9.0

^aGC-MS analysis of alditol acetates. *GC-MS and Filisetti-Cozzi & Carpita (1991) determination of uronic acids. Gal: galactose; Ara: arabinose; Rha: rhamnose; Man: mannose; Glc: glucose; 2OMeXyl: methylxylose; 2OMeFuc: methylfucose; Nd: Not detected.

3.3.1.1 NMR data

The ¹H/¹³C HSQC spectrum of SFP (Fig. 1) showed a very complex anomeric region, suggesting a complex mixture of polysaccharides in SFP. The glycosyl units of SFP had typical signals of (1→3)-linked α -L-Araf units at δ 109.02/5.25 (C-1/H-1) and δ 103.17/4.47, 102.7/4.51 (C-1/H-1), which were attributable to linked \rightarrow 3,6)- β -D-Galp- (1→, \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1→, and \rightarrow 3,6)- β -D-Galp-(1→, which corroborates substituted units at δ 80.02/3.73 (C-3/H-3) and 69.17/3.93 (C-6/H6. (Cipriani et al., 2006, 2009a, 2009b; Dartora et al., 2013; Delgobo et al., 1998, 1999; Renard et al., 1997).

The signals at δ 99.77/5.12 (C-1/H-1), 16.29/1.26 (C-6/H-6), and 76.6/3.91 (C-2/H-2) were consistent with (1→2)-linked α -L-Rhap units. The C-1/H-1 correlation at δ 98.06/5.10 was identified as α -D-GalpA (1→4)-linked and typical (C-3/H-3) at δ 68.35/3.91. Methyl esters of galacturonic acid were detected at δ 52.9/3.81,

suggesting the presence of CO_2CH_3 units (Ovodova et al., 2009; Popov et al., 2011; Renard et al., 1997). The signals at δ 99.14/4.89, 99.22/5.09, and 99.09/5.06 are typical of $\rightarrow 2,6$ - α -D-Manp-(1 \rightarrow C-1/H-1. Correlations at δ 100.13/5.28, 101.87/5.04, and 101.87/5.13 are attributable to the non-reducing terminal of α -D-Manp-(1 \rightarrow 2) (Kobayashi et al., 1995; Vinogradov, Petersen, & Bock, 1998)(Vinogradov et al., 1998). The signals at δ 99.46/5.38 and 95.9/4.55 were attributable to $\rightarrow 4$ - α -D-Glcp-(1 \rightarrow and glucopyranosyl reducing ends, respectively.

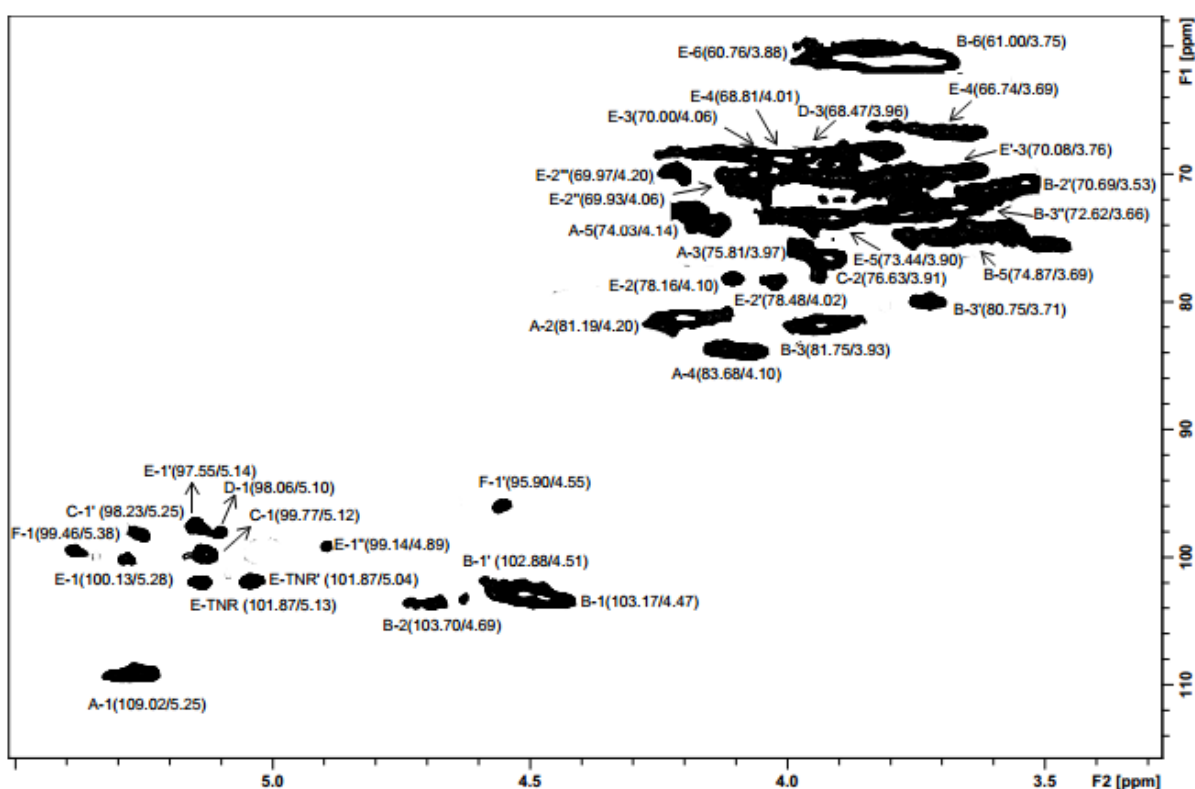


Figure 1 - ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) HSQC spectrum in D_2O . Chemical shifts expressed in ppm at 30°C . Glycosyl units were labeled as follows: A (α -L-Araf); B (β -D-Galp); C (α -L-Rhap); D (α -D-GalpA); E (α -D-Manp); F (α -D-Glcp).

3.3.2 SFP treatment reduced the tumor development

The tumor was visible on day 5 after Walker-256 cell inoculation. Therefore, tumor volume measurements began at this time point. All of the SFP-treated groups exhibited a reduction of tumor volume compared with the control group (Fig. 2A). This

difference was statistically significant beginning on day 11 of treatment ($p = 0.0033$ for SFP30, $p = 0.0002$ for SFP60) until the last experimental day (day 14). Both treatments with SFP reduced tumor weight compared with the vehicle group (Fig. 2B). Tumors in the MTX group grew significantly less ($p = 0.0001$) than the other tumor groups, mainly because only two of seven animals developed a tumor mass during MTX treatment.

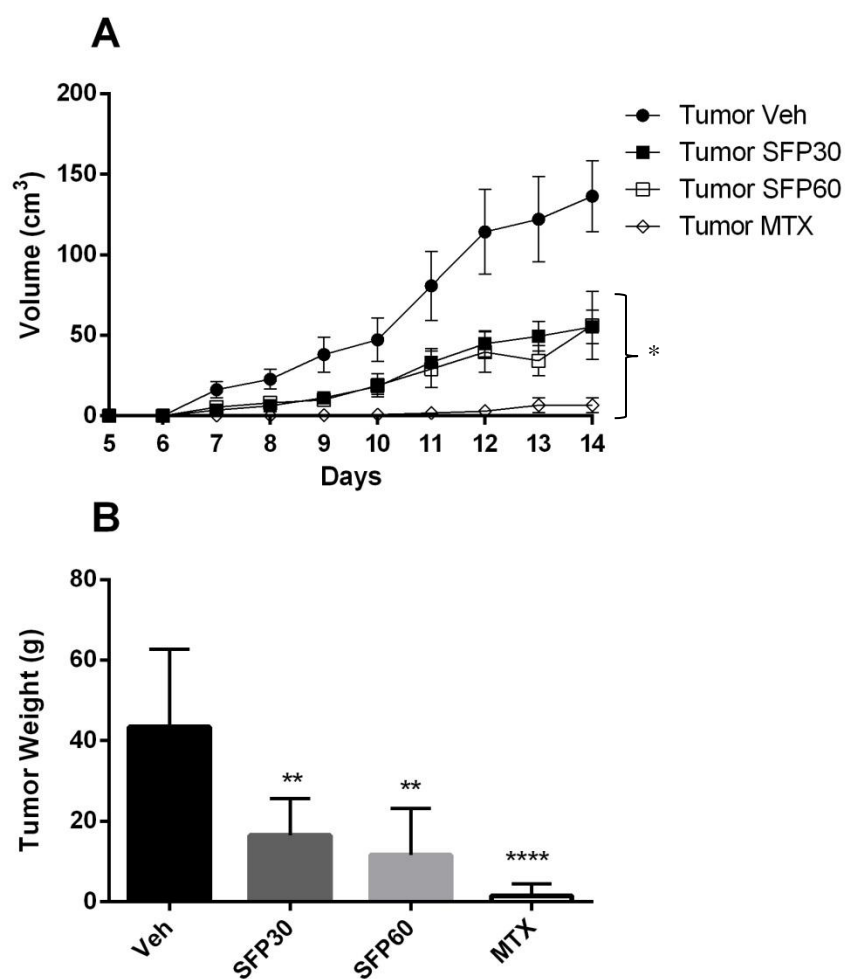


Figure 2 - Tumor volume (A) and weight (B) of Walker-256 tumor bearing-rats treated with SFP 30 mg/kg (SFP30), SFP 60 mg/kg (SFP60), MTX (methotrexate) or Vehicle (Veh) during 14 days. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 7–10 rats. In (A) every treatment is different statistically of Vehicle group ($p < 0.05$) after the 11th day, analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. In (B) the analysis was performed with one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison teste. Symbols: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ as compared to the Vehicle group.

3.3.3 Plasma biochemistry

Several parameters were evaluated in plasma to determine the effects of SFP in different organs. The results are shown in Table 2. Glycemia decreased by 65% in the vehicle group, 54% in the SFP30 group, and 46% in the SFP60 group compared with the naive group. Similar reductions were observed compared with the basal group. The MTX group was the only one that exhibited recovery of glycemia, reaching values that were similar to the naive group. The SFP30 and SFP60 groups also presented significant differences compared with the MTX group.

Creatinine levels did not exceed reference values for the species and were reduced only in the basal group. The plasma levels of AST in the vehicle group were higher than in the other groups. Treatment with SFP partially recovered this change, whereas the MTX group presented lower levels of AST. Plasma ALT levels were not significantly different among groups.

The plasma level of amylase in the vehicle group was 54% lower than in the naive group. Treatment with SFP partially recovered amylase levels, with reductions of 40% and 41% in the SFP30 and SFP60 groups, respectively. The lowest amylase level, with a reduction of only 26%, was observed in the MTX group.

Table 2 - Plasmatic parameters evaluated in healthy and tumor-bearing rats.

Parameters	Experimental Groups					
	Naïve	Basal	Tumor			
			Veh	SFP30	SFP60	MTX
Glucose (mg.dL ⁻¹)	114.3±10.5	126.5±12.6	39.9 ± 4.5*#	52.9±6.4*#×	62.0±10.1*#×	117.3±10.3°
Creatinine (mg.dL ⁻¹)	0.9 ± 0.02	0.5 ± 0.1*	0.8 ± 0.02#	0.9 ± 0.04 #	0.7 ± 0.05#	0.8 ± 0.04 #

AST (U.L ⁻¹)	103.9 ± 6.2	128.8±19.7	296.7±1.5*#	197.9±20.7*	158.8 ± 21.4°	101.9±10.2°
ALT (U.L ⁻¹)	60.3 ± 6.8	56.4 ± 2.2	39.2 ± 4.0	40.7 ±3.04	41.7 ± 2.6	48.9 ± 2.8
Amylase (U.L ⁻¹)	866.2±33.6	767.3±31.1	398.2±49.5*#	516.3±31.8*#	508.1±65.8*#	633.5 ± 36.5*

Animals without tumor were treated with vehicle (Naïve) or SFP 30 mg/kg (Basal); animals with tumor were treated with vehicle (Veh), SFP 30 mg/kg or 60 mg/kg (SFP30 and SFP60, respectively), or MTX (2.5 mg/kg). The treatment lasted for 14 days, orally, once a day, for the groups Naïve, Basal, Vehicle, SFP30 and SFP60, and intraperitoneally every 5 days for the group MTX. Values are expressed as mean ± S.E.M (n=5-9). Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Symbols: p < 0.05, * when compared with Naïve; ° when compared with Vehicle; # when compared with Basal; and × when compared with tumor MTX group.

3.3.4 Hematological assays

Hematologic parameters were evaluated to verify the immunological activity of SFP. The absolute lymphocyte count was reduced in tumor-bearing animals compared with naive animals. The vehicle group exhibited an increase in granulocytes compared with the naive group. The SFP60 and MTX groups had normal granulocytes compared with the vehicle group. The monocyte count significantly increased in the vehicle group and decreased in the SFP60 and MTX groups. These data are presented in Table 3, and the relative cell values (%) are shown in Fig. 3 B, C and D.

The NMLR reflects the relationship between hematological cells and the risk of recurrence or survival in cancer patients. The optimal cut-off index is 1.2. Values > 1.2 represent high risk, and values < 1.2 represent low risk (Liao et al., 2016). An elevated NMLR was observed in the vehicle group. The SFP60 and MTX groups had lower ratios (Table 3). The other hematological parameters were not significantly different (data not shown).

Table 3 - Hematological parameters evaluated in healthy and tumor-bearing rats.

Parameters	Experimental Groups					
	Naïve	Basal	Tumor			
			Veh	SFP30	SFP60	MTX
WBC (X 10 ³ /μL)	13.9 ± 0.3	14.3 ± 1.7	15.0 ± 0.6	14.2 ± 0.6	13.0 ± 0.8	11.5 ± 1.7°
Lymph# X 10 ³ /μL	10.3 ± 0.3	9.0 ± 1.0	6.1 ± 0.6*	8.8 ± 0.5	9.2 ± 0.8	8.7 ± 1.0
Mon# X 10 ³ /μL	0.4 ± 0.03	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.05*	0.4 ± 0.03	0.3 ± 0.03°	0.3 ± 0.1°
Gran# x 10 ³ /μL	3.2 ± 0.2	4.4 ± 0.6	7.4 ± 0.8*	4.7 ± 0.5	3.4 ± 0.4°	3.3 ± 0.9°
NMLR	0.8	1.5°	4.3*	1.7°	1.2°	0.9°

Animals without tumor were treated with vehicle (Naïve) or SFP 30 mg/kg (Basal); animals with tumor were treated with vehicle (Veh), SFP 30 mg/kg or 60 mg/kg (SFP30 and SFP60, respectively), or MTX (2.5 mg/kg). The treatment lasted for 14 days, orally, once a day, for the groups Naïve, Basal, Vehicle, SFP30 and SFP60, and intraperitoneally every 5 days, for the group MTX. WBC: total leukocyte count; Lymph#: absolute lymphocyte; Mon#: absolute monocyte; Gran#: absolute granulocyte numbers; NMLR: peripheral neutrophil-monocyte/lymphocyte ratio. Values are expressed as mean ± S.E.M (n=5-9). Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Symbols: p < 0.05, * when compared with Naïve; ° when compared with Vehicle; # when compared with Basal; and × when compared with tumor MTX group.

3.3.5 Inflammatory parameters in tumor tissue

Significant alterations in the blood lymphocyte count were observed. We then evaluated other inflammatory parameters. The inflammatory parameters were generally reduced in the treated groups compared with the vehicle group. The tumor levels of NO significantly decreased in both the SFP30 and SFP60 groups compared with the vehicle group (Fig. 3A). The enzymatic activity of MPO decreased by 37% in the SFP60 group compared with the vehicle group (Fig. 3B). The activity of NAG also decreased in both groups (39% in the SFP30 group and 44% in the SFP60 group) compared with the vehicle group (Fig. 3C). Both treatments increased the tumor levels of TNF-α compared with the vehicle group, reaching statistical significance in the

SFP60 group (Fig. 3D). The relative lymphocyte count significantly increased in the SFP60 group compared with the vehicle group (Fig. 3D). Specific inflammatory parameters in the tumors were correlated with peripheral blood cells. The relative blood granulocyte and monocyte counts decreased with SFP treatment in proportion to the reduction of tumor levels of MPO and NAG. The lymphocyte count similarly increased in proportion to the tumor levels of TNF- α (Fig. 3B-D, respectively).

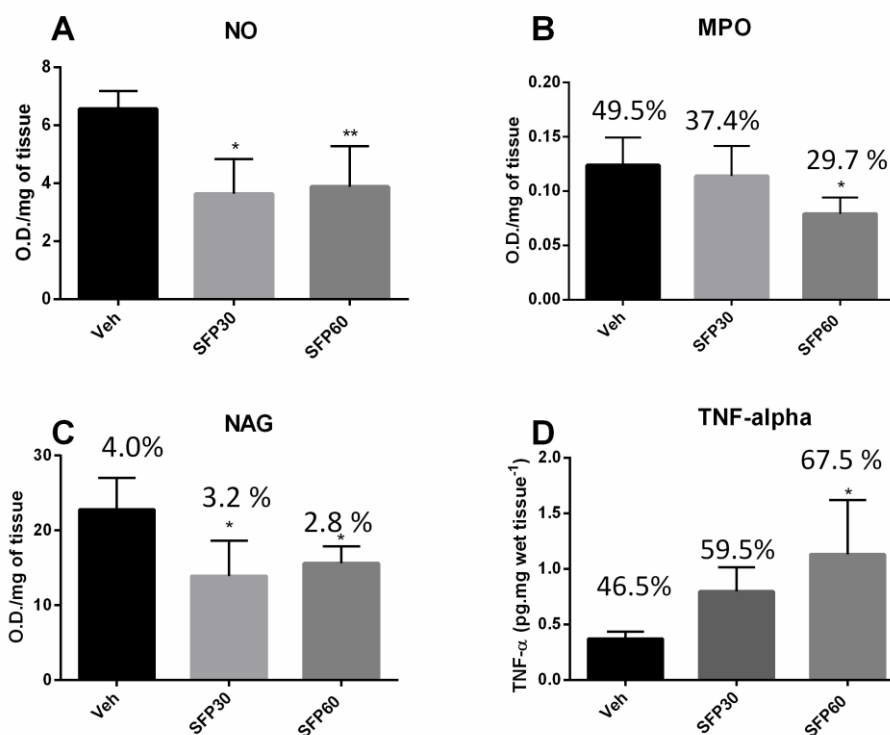


Figure 3 - Inflammatory parameters evaluated in tumor tissue of rats treated for 14 days with Vehicle (Veh), SFP 30 mg/kg (SFP30) or SFP 60 mg/kg (SFP60): Nitrite (A), MPO (B), NAG (C) and TNF- α (D). Values are expressed as mean \pm S.E.M (n = 5-7). The blood relative count (%) of lymphocyte (D), granulocyte (B) and monocyte (C) are represented in %, since these cells are responsible for the respective inflammatory mediators' production. Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test, and differences between groups were considered when $p < 0.05$. Symbols: * when compared with Tumor Vehicle group.

3.3.6 Histological analysis of tumor and liver

Treatment with 30 and 60 mg/kg SFP induced a significant degree of tumor cell death (67% and 85%, respectively) compared with the vehicle (37.5%). The higher dose

of SFP (60 mg/kg) induced more coagulative necrosis (58%) than the vehicle (40%) in tumor tissue. Interestingly, a lower number of cells that were undergoing apoptosis and less lymphocytic infiltration were observed in tumor tissue in SFP-treated rats. We did not observe suppurative necrosis, inflammatory infiltration, vascular plaques, or vacuolization. Representative slices of tumor tissue are shown in Fig. 4. No significant alterations were observed in liver tissue among groups (data not shown).

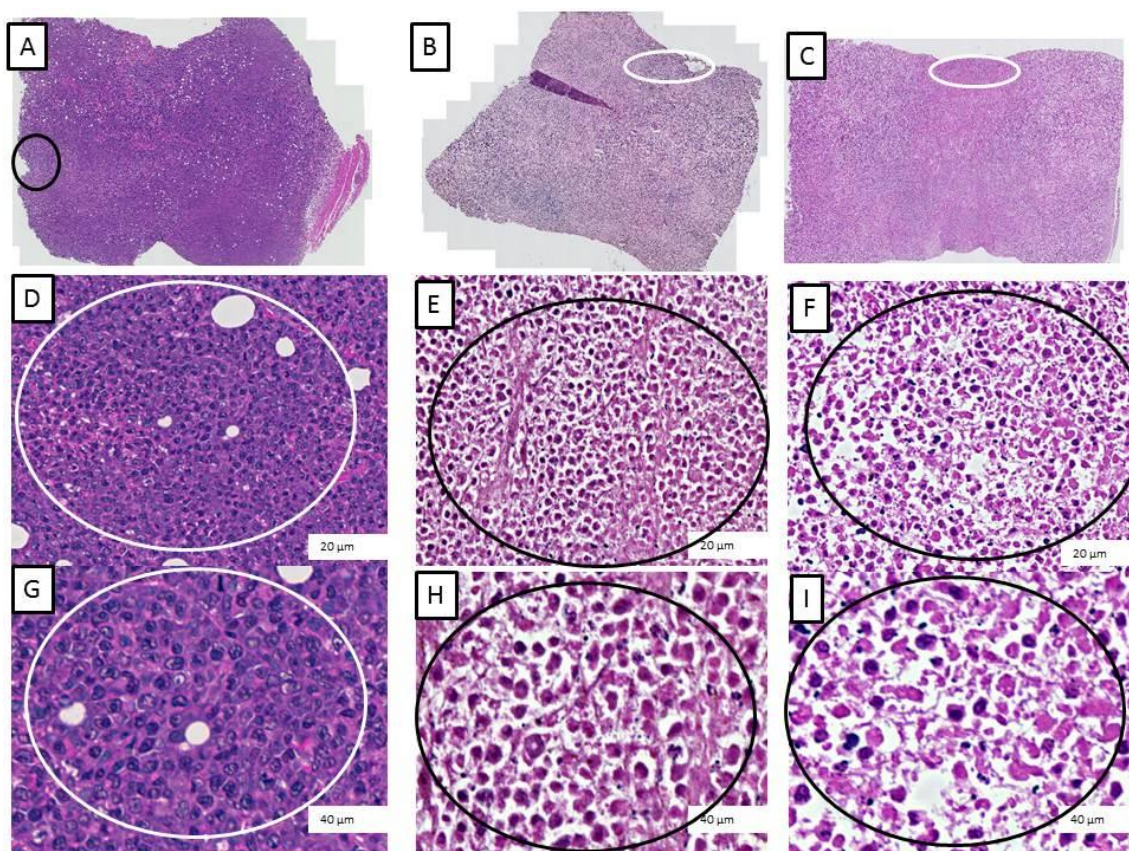


Figure 4 – Histology of tumor tissue after 14 days of treatment with vehicle (A, D, G), SFP 30 mg/Kg (B,E, H) or SFP60 mg/Kg (C, F, I), stained by HE. White area circled indicate viable tumor cells, black area circled indicate areas of necrosis, in which empty spaces indicate areas of death cells.

3.3.7 Gene expression in tumor

In agreement with the histological observations, no differences were observed among groups in the expression of apoptosis-related genes, including *Bcl-2*, *Bax*, *p53*, and *Caspase-3*, or the expression of *Vegf* (Supplementary Fig. S1). Significant elevations of the mRNA expression of *Rip1* and *Rip3* were observed in tumor tissue in

the SFP60 group (Fig. 5). *Mkl1* expression was also upregulated but not significantly. These results suggest that SFP stimulated tumor cells to undergo cell death by necroptosis.

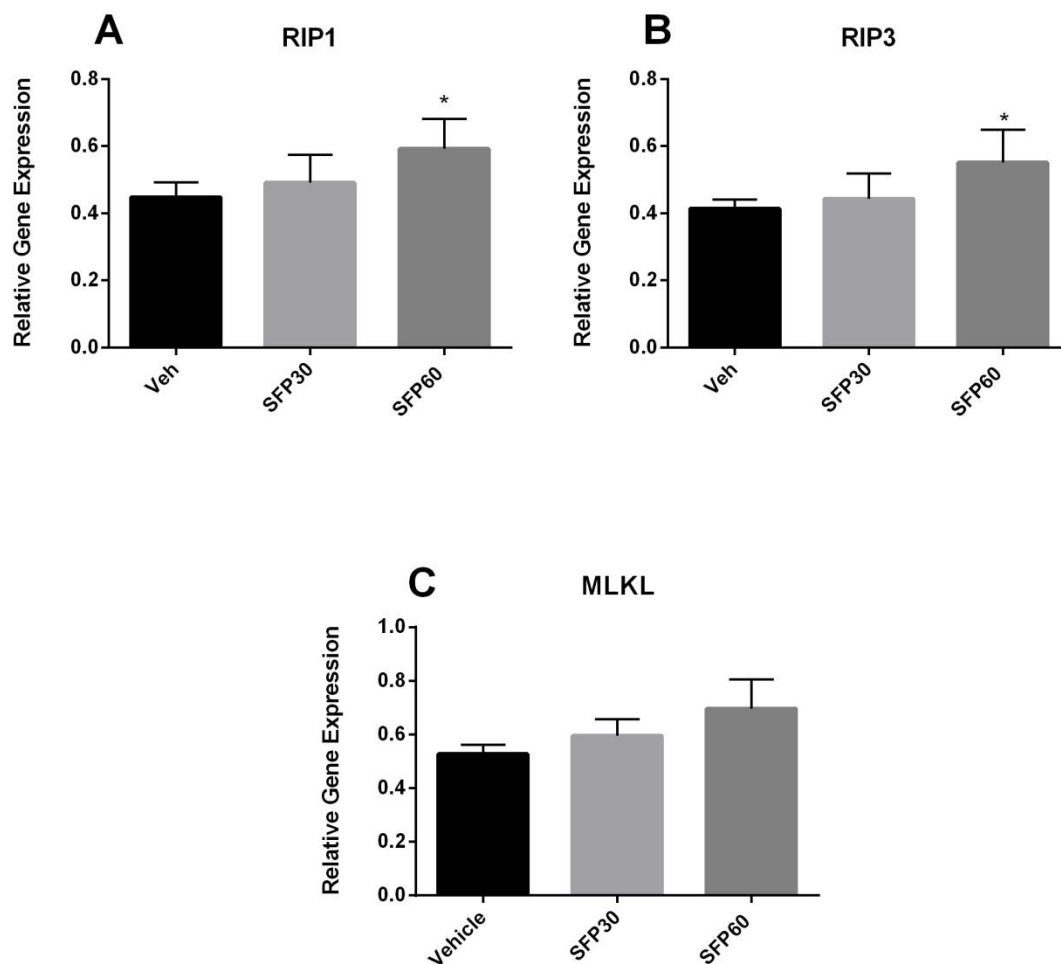


Figure 5 – Gene expression of *Rip1* (A), *Rip3* (B) and *Mkl1* (C) in tumor tissue of rats treated with vehicle (Veh), SFP 30 mg/kg (SFP30) or SFP 60 mg/kg (SFP60) during 14 days. Values are expressed as mean \pm S.E.M (n=5). Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test, and differences between groups were considered significant with $p < 0.05$. Symbols: * when compared with Vehicle group.

3.4 DISCUSSION

The present study investigated the biological effects of SFP red wine independently of polyphenols (i.e., its most studied compounds). Our results demonstrated an *in vivo* antitumor effect of SFP from cabernet franc red wine. The structural characterization

of SFP was performed based on GC-MS, two-dimensional NMR analysis, and data from the literature on red wine polysaccharides (Doco, Quéllec, Moutounet, & Pellerin, 1999; Doco, Williams, & Cheynier, 2007; Guadalupe & Ayestarán, 2007; P. Pellerin, Vidal, Williams, & Brillouet, 1995; Patrice Pellerin et al., 1996). The monosaccharide composition analysis revealed a complex mixture of polysaccharides, suggesting the presence of arabinogalactans, mannans, and pectins, which could be composed of rhamnogalacturonans I and II because of the presence of the rare sugars 2-*O*-Me-Xyl and 2-*O*-Me-Fuc. We also detected glucose, which could belong to a glucan, suggesting a possible dextrin through the fermentation process by yeast. The interpretation of the NMR data together with the monosaccharide composition was very accurate in the HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) experiment, in which many superimposed peaks on one-dimensional NMR of ^1H and ^{13}C spectra were resolved by this technique. The $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC of SFP showed key NMR crosspeaks that were fingerprints for type II arabinogalactans, indicated by signals at δ 109.02/5.25 (1 \rightarrow 3)-linked α -L-Araf units and at δ 103.17/4.47 and 102.7/4.51 for \rightarrow 3,6)- β -D-Galp, which was confirmed by *O*-substitution at δ 80.02/3.73 (C-3/H-3) and δ 69.17/3.93 (C-6/H6). The same analysis was performed to detect type I rhamnogalacturonan, which showed key crosspeaks at δ 99.77/5.12 and 76.6/3.91 (C-2/H-2) of (1 \rightarrow 2)-linked α -L-Rhap units and α -D-GalpA (1 \rightarrow 4) linkages at δ 98.06/5.10, which could also be esterified due to the signal at δ 52.9/3.81. The presence of mannans was expected because yeasts are involved in wine production. Therefore, we looked for classic yeast \rightarrow 2,6)- α -mannans-(1 \rightarrow units at δ 99.14/4.89, 99.22/5.09, and 99.09/5.06 and for terminal α -D-Manp-(1 \rightarrow 2 units at δ 100.13/5.28, 101.87/5.04, and 101.87/5.13. The signal at δ 99.46/5.38 was attributable to \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow linkages, suggesting a glycogen-like glucan, which may also be produced by

yeast as previously reported (Bittencourt et al., 2006; Burjack et al., 2014; Doco et al., 1999, 2007; Guadalupe & Ayestarán, 2007; P. Pellerin et al., 1995; Patrice Pellerin et al., 1996).

Interestingly, the findings regarding the red wine polysaccharide composition were different from those that were obtained directly from grapes. Thus, the biological effects of SFP were evaluated *in vivo* to investigate antineoplastic and systemic activity. Walker-256 tumor-bearing rats (vehicle) presented significant reductions of plasma amylase and glucose (54% and 65%, respectively) compared with the naive group. The high demand for glucose by the tumor, a feature of cachexia syndrome (Acco, Bastos-Pereira, & Dreifuss, 2012), is the reason for such a reduction of glycemia. Despite the SFP had not reversed completely the hypoglycemia, it demonstrated a tendency to increase these parameters modified by the presence of solid tumor. However, glycemia levels in SFP-treated animals were lower than the reference values for Sprague-Dawley rats (90-201 mg/dl; (Petterino & Argentino-Storino, 2006). The MTX-treated animals (positive control) presented biochemical parameters that were similar to naive rats. These results were not surprising for two reasons. First, only two animals in the MTX group developed tumors. Second, treatment was given for only 14 days. The toxicity of MTX is known to occur after 30 days of treatment (Moghadam et al., 2015), manifested by increases in the levels of ALT, AST, ALP, and bilirubin and decreases in albumin and antioxidant defenses in hepatocytes, leading to hepatotoxicity.

Walker-256 cell tumors induce hepatic and metabolic alterations (Acco, Da Rocha Alves Da Silva, Batista, Yamamoto, & Bracht, 2007; Vicentino, Constantin, Aparecido Stecanella, Bracht, & Yamamoto, 2002). We evaluated biomarkers of liver function in

the presence of SFP treatment. The activity of plasma AST was elevated 2.8-fold in tumor-bearing rats compared with naive rats, and treatment with 60 mg/kg SFP normalized this alteration. The enzyme AST is present in hepatic mitochondria in high concentrations and also in skeletal and cardiac muscles (Montanha, Fredianelli, Wagner, & Sacco, 2014). Elevations of plasma AST levels can occur for several reasons. The lower levels of AST in SFP-treated animals could be related to less damage in those tissues. No differences in ALT levels were observed among groups. Our data corroborate Galuppo et al. (2015). These authors also found elevations of plasma AST but not of ALT in Walker-256 tumor-bearing rats.

In addition to the alterations in plasma parameters, SFP also impacted the tumor microenvironment. SFP significantly reduced the enzymatic activity of MPO and NAG, biomarkers of the presence of neutrophil-granulocytes and monocytes, respectively. In fact, our histological analysis did not reveal the presence of inflammatory cells in the tumor. Interestingly, the reductions of both MPO and NAG correlated with reductions of blood granulocytes and monocytes in SFP-treated animals. The influence of inflammation on tumor development was previously reported in mice with mammary tumors associated with a subcutaneous implant of polyether-polyurethane to stimulate the inflammatory process (Rodrigues Viana et al., 2015). In this previous study, the activity of MPO and NAG was higher in tumors from mice that were stimulated with the implant, accompanied by an increase in the rate of tumor growth. Our data corroborate previous findings (Mantovani et al., 2008; Rodrigues Viana et al., 2015). We observed fewer inflammatory cells, such as activated macrophages and neutrophils, in the tumor microenvironment, with less activity of MPO and NAG and a slower rate of tumor growth.

Another inflammatory parameter that was modified by both doses of SFP was NO in tumor tissue. Low concentrations of NO are involved in physiological process. An increase in NO production has been implicated in pathological conditions (Costa et al., 2003). The production of NO is linked to the activation of macrophages and monocytes. Thus, it is present in inflammatory and infectious diseases (MacMicking, Xie, & Nathan, 1997; Nathan & Hibbs, 1991). In the present study, the reduction of NO coincided with reductions of inflammatory cells in tumor tissue and blood in SFP-treated animals. In contrast, blood lymphocytes were increased by SFP treatment, which may be an effect of rhamnogalacturonan II that is present in SFP. Rhamnogalacturonan II or arabinogactan can induce lymphocyte proliferation (Park et al., 2013; Yang, Hsieh, Lu, & Lin, 2014). The overall results concerning inflammatory cells and mediators indicate that SFP has important immunomodulatory activity that may initiate the necroptosis pathway and result in tumor cell death. The tumor levels of TNF- α increased 3-fold with treatment with the higher dose of SFP. SFP may have stimulated the production of this cytokine by Walker-256 cells. The production of TNF- α and other cytokines has previously been demonstrated in these cells (De Almeida Salles Perroud et al., 2006). Another possibility is that higher TNF- α levels can originate from lymphocytes, the number of which was elevated in blood in animals that received polysaccharide treatment in a previous study (Park et al., 2013).

TNF- α is a factor that can trigger the necroptosis pathway, in addition to T cell receptors, interferons, Toll-like receptors, and antineoplastic agents (Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Su, Yang, Xu, Chen, & Yu, 2015). Necroptotic signaling involves the activation of RIP-1, RIP-3, and MLKL (i.e., three factors that form the so-called necrosome, which is active when caspases are inactive or inhibited; Liu et al., 2016).

The necrosome, together with other factors, migrates to the cellular membrane to cause its rupture and leakage, leading to cell death (Liu et al., 2016). In addition to the elevation of TNF- α , SFP increased the mRNA expression of *Rip-1*, *Rip-3*, and *Mkl1* in tumor tissue, whereas the expression of *Caspase-3* did not change. These results suggest that apoptosis was not the main cause of cell death. The histopathological analysis of tumor tissue from animals that received SFP treatment showed a high degree of necrosis. The tumors that presented intense necrosis also had higher expression of *Rip-1*, *Rip-3*, and *Mkl1*, suggesting that the antineoplastic effect of SFP may be attributable to activation of the necroptosis pathway. Necroptosis has been considered an important therapeutic strategy against cancer, mainly for tumor cells that are resistant to apoptosis (Su, Yang, Xie, Dewitt, & Chen, 2016).

In conclusion, the present study demonstrated the antineoplastic effect of SFP from cabernet franc red wine. Our data corroborate previous reports that suggested antitumor effects of isolated polysaccharides that are present in SFP, such as rhamnogalacturonan (Mueller & Anderer, 1990; Park et al., 2013) and arabinogalactan (Shah et al., 2014). The mechanism of cell death appears to involve immune and inflammatory modulation, an increase in TNF- α production, and activation of the necroptosis pathway. Thus, SFP may be a potential therapy for cancers that are modulated by immune/inflammatory processes. Future studies that employ different protocols and evaluating possible associations between SFP and other chemotherapeutic agents are encouraged.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq and FINEP (LabConfocal - UFPR). The authors are thanks to Eliana Rezende Adami, Jonathan Paulo Agnes, Flavia Caroline Collere, Thaissa Backes dos Santos, Caroline M. Kopruszinski and Renata Cristine dos Reis, and to the equip of the LabConfocal – UFPR for the inestimable help in the experiments, AA, GLS, ARZ and GK are recipients of a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). MCS, ILB, CRC, FARL, ARCC and LAL are recipients of a graduate fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

- Acco, A., Da Rocha Alves Da Silva, M. H., Batista, M. R., Yamamoto, N. S., & Bracht, A. (2007). Action of celecoxib on hepatic metabolic changes induced by the Walker-256 tumour in rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, *101*(5), 294–300. <http://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00124.x>
- Acco, A., Bastos-Pereira, A.L. & Dreifuss, A. A. (2012). Characteristics and Applications of the Walker-256 Rat Tumour. . In: S.G. Pandalai; Daniel Pouliquen. (Org.). *The Rat in Cancer Research: A Crucial Tool for All Aspects of Translational Studies*. 1 Ed. Trivandrum: Research Signpost/ Transworld Research Network,.
- Bezerra, I. D. L. (2016). CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DOS VINHOS CABERNET FRANC, CABERNET SAUVIGNON E SAUVIGNON BLANC. *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação Em Bioquímica. UFPR. Curitiba, PR.
- Bittencourt, V. C. B., Figueiredo, R. T., Da Silva, R. B., Mourão-S?, D. S., Fernandez, P. L., Sasaki, G. L., ... Barreto-Bergter, E. (2006). An ??-glucan of Pseudallescheria boydii is involved in fungal phagocytosis and toll-like receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(32), 22614–22623. <http://doi.org/10.1074/jbc.M511417200>
- Bradley, P. P., Priebat, D. a, Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme

marker. *The Journal of Investigative Dermatology*. <http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>

- Burjack, J. R., Santana-Filho, A. P., Ruthes, A. C., Riter, D. S., Vicente, V. a, Alvarenga, L. M., & Sasaki, G. L. (2014). Glycan analysis of *Fonsecaea monophora* from clinical and environmental origins reveals different structural profile and human antigenic response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(October), 153. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00153>
- Cipriani, T. R., Mellinger, C. G., Bertolini, M. L. C., Baggio, C. H., Freitas, C. S., Marques, M. C. A., ... Iacomini, M. (2009). Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. *Food Chemistry*, 115(2), 687–690. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.017>
- Cipriani, T. R., Mellinger, C. G., De Souza, L. M., Baggio, C. H., Freitas, C. S., Marques, M. C. a, ... Iacomini, M. (2006). A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. *Journal of Natural Products*, 69, 1018–1021. <http://doi.org/10.1021/np060045z>
- Cipriani, T. R., Mellinger, C. G., de Souza, L. M., Baggio, C. H., Freitas, C. S., Marques, M. C. A., ... Iacomini, M. (2009). Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Carbohydrate Polymers*, 78(2), 361–363. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.026>
- Costa, M. T., Fabeni, R. de C., Aptekmann, K. P., & Machado, R. R. (2003). Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Ciência Rural*, 33(5), 967–974. <http://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500027>
- Dartora, N., de Souza, L. M., Paiva, S. M. M., Scoparo, C. T., Iacomini, M., Gorin, P. a J., ... Sasaki, G. L. (2013). Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: a potential adjuvant in sepsis treatment. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1776–82. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.013>
- De Almeida Salles Perroud, A. P., Ashimine, R., De Castro, G. M., Guimar??es, F., Vieira, K. P., Aparecida Vilella, C., ... Lima Zollner, R. De. (2006). Cytokine gene expression in Walker 256: A comparison of variants A (aggressive) and AR (regressive). *Cytokine*, 36(3-4), 123–133. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.11.004>
- Delgobo, C. L., Gorin, P. A. J., Jones, C., & Iacomini, M. (1998). Gum heteropolysaccharide and free reducing mono-and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. *Phytochemistry*, 47(7), 1207–1214. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00776-0](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00776-0)
- Delgobo, C. L., Gorin, P. A. J., Tischer, C. A., & Iacomini, M. (1999). The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: An aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. *Carbohydrate Research*, 320(3-4), 167–175. [http://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00159-7](http://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00159-7)

- Doco, T., Quéllec, N., Moutounet, M., & Pellerin, P. (1999). Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*(1), 25–32.
- Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V. (2007). Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(16), 6643–6649. <http://doi.org/10.1021/jf071427t>
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, *197*(1), 157–162. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90372-Z](http://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90372-Z)
- Galuppo, L. F., Lívero, F. A. dos R., Martins, G. G., Cardoso, C. C., Beltrame, O. C., Klassen, L. M. B., ... Acco, A. (2015). Sydnone 1: A Mesoionic Compound with Anti-tumoural and Hematological Effects In Vivo. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, In press. <http://doi.org/10.1111/bcpt.12545>
- Green, L. C., Wagner, D. a, Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, *126*, 131–138. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](http://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2007). Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of tempranillo red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(26), 10720–10728. <http://doi.org/10.1021/jf0716782>
- Huang, T.-H., Chiu, Y.-H., Chan, Y.-L., Chiu, Y.-H., Wang, H., Huang, K.-C., ... Wu, C.-J. (2015). Prophylactic Administration of Fucoïdan Represses Cancer Metastasis by Inhibiting Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Lewis Tumor-Bearing Mice. *Marine Drugs*, *13*(4), 1882–1900. <http://doi.org/10.3390/md13041882>
- Huvos, A. G., Rosen, G., & Marcove, R. C. (1977). Primary osteogenic sarcoma. Pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, *101*(1), 14–18.
- Inngjerdingen, K. T., Thöle, C., Diallo, D., Paulsen, B. S., & Hensel, A. (2014). Inhibition of Helicobacter pylori adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by aqueous extracts and pectic polysaccharides from the roots of Cochlospermum tinctorium A. Rich. and Vernonia kotschyana Sch. Bip. ex Walp. *Fitoterapia*, *95*, 127–32. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.03.009>
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V, Thomas, C. F., Beecher, C. W., ... Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product

derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5297), 218–220.
<http://doi.org/10.1126/science.275.5297.218>

Kobayashi, H., Watanabe, M., Komido, M., Matsuda, K., Ikeda-Hasebe, T., Suzuki, M., ... Suzuki, S. (1995). Assignment of ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of a d-mannan composed of α-(1 → 2) and α-(1 → 6) linkages obtained from *Candida kefyr* IFO 0586 strain. *Carbohydrate Research*, 267(2), 299–306.
[http://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)00299-U](http://doi.org/10.1016/0008-6215(94)00299-U)

Liao, R., Jiang, N., Tang, Z., Li, D., Huang, P., & Luo, S. (2016). Systemic and intratumoral balances between monocytes / macrophages and lymphocytes predict prognosis in hepatocellular carcinoma patients after surgery.

Liu, X., Zhou, M., Mei, L., Ruan, J., Hu, Q., Peng, J., ... Li, C.-Y. (2016). Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget*.
<http://doi.org/10.18632/oncotarget.7924>

MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, 15(1), 323–50.
<http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>

Mantovani, A., Mantovani, A., Allavena, P., Allavena, P., Sica, A., Sica, A., ... Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436–44.
<http://doi.org/10.1038/nature07205>

Martins, G. G., Lívero, F. A. D. R., Stolf, A. M., Kopruszinski, C. M., Cardoso, C. C., Beltrame, O. C., ... Acco, A. (2015). Sesquiterpene lactones of *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* have antineoplastic effects in Walker-256 tumor-bearing rats. *Chemico-Biological Interactions*, 228, 46–56.
<http://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.018>

Mau, J. L., Chao, G. R., & Wu, K. T. (2001). Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5461–5467. <http://doi.org/10.1021/jf010637h>

Mellinger, C. G., Cipriani, T. R., Noletto, G. R., Carbonero, E. R., Oliveira, M. B. M., Gorin, P. a J., & Iacomini, M. (2008). Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 115–120. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.04.001>

Merck. (2015). Merck Manual. Retrieved from
http://www.merckmanuals.com/vet/pharmacology/antineoplastic_agents/overview_of_antineoplastic_agents.html.

Mizuno, M., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H., & Tsuchida, H. (1999). Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill.

Biochem Mol Biol Int, 47(4), 707–714. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319424>

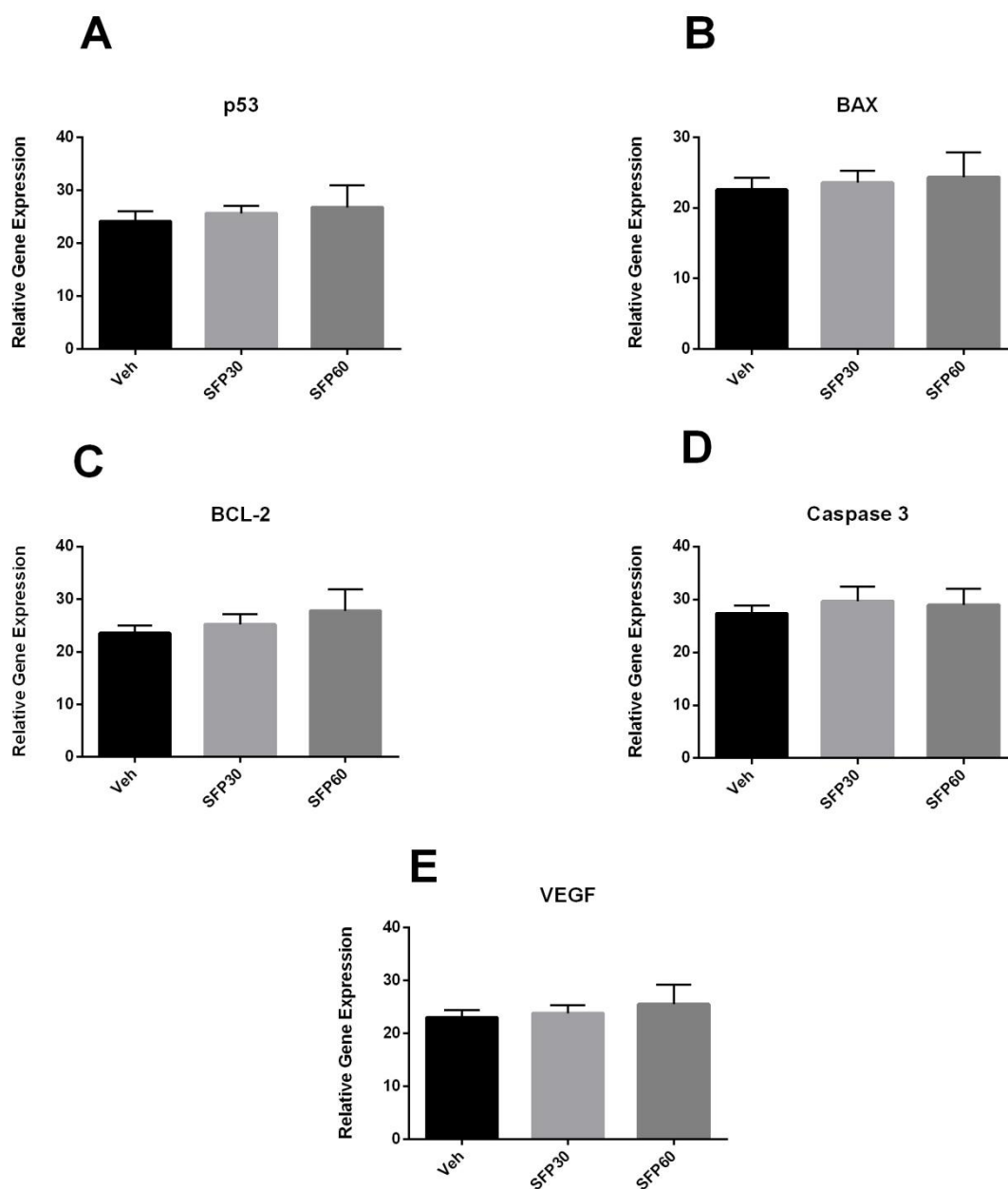
- Moghadam, A. R., Tutunchi, S., Namvaran-Abbas-Abad, A., Yazdi, M., Bonyadi, F., Mohajeri, D., ... Ghavami, S. (2015). Pre-administration of turmeric prevents methotrexate-induced liver toxicity and oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 246. <http://doi.org/10.1186/s12906-015-0773-6>
- Montanha, F. P., Fredianelli, A. C., Wagner, R., & Sacco, S. R. (2014). Clinical , biochemical and haemathological effects in Rhamdia quelen exposed to cypermethrin, 697–704. <http://doi.org/10.1590/1678-41625934>
- Mueller, E. A., & Anderer, F. A. (1990). Synergistic action of a plant rhamnogalacturonan enhancing antitumor cytotoxicity of human natural killer and lymphokine-activated killer cells: chemical specificity of target cell recognition. *Cancer Research*, 50(12), 3646–51.
- Nascimento, A. M., De Souza, L. M., Baggio, C. H., Werner, M. F. D. P., Maria-Ferreira, D., Da Silva, L. M., ... Cipriani, T. R. (2013). Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acemella oleracea*. *Phytochemistry*, 85, 137–142. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.08.024>
- Nathan, C. F., & Hibbs, J. B. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology*, 3(1), 65–70. [http://doi.org/10.1016/0952-7915\(91\)90079-G](http://doi.org/10.1016/0952-7915(91)90079-G)
- Ooi, V. E. C., & Liu, F. (2000). Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide- Protein Complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 715–729. <http://doi.org/10.2174/0929867003374705>
- Ovodova, R. G., Golovchenko, V. V., Popov, S. V., Popova, G. Y., Paderin, N. M., Shashkov, A. S., & Ovodov, Y. S. (2009). Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. *Food Chemistry*, 114(2), 610–615. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.094>
- Park, S. N., Noh, K. T., Jeong, Y.-I., Jung, I. D., Kang, H. K., Cha, G. S., ... Park, Y.-M. (2013). Rhamnogalacturonan II is a Toll-like receptor 4 agonist that inhibits tumor growth by activating dendritic cell-mediated CD8+ T cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(2), e8. <http://doi.org/10.1038/emm.2013.14>
- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311–320. <http://doi.org/10.1038/nature14191>
- Paula, A., Nunes, N., Pessoa, C. Ó., Costa-lotuf, L., Odorico, M., & Filho, M. (2007). Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and metotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 Avaliação radiográfica e histológica do efeito do bisfosfonato alendronato e do metotrexato na mandíbula de ratos i, 22(6), 457–464.

- Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J. M., & O'Neill, M. A. (1996). Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 290(2), 183–197. [http://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00139-5](http://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00139-5)
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J. M. (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, 277(1), 135–143. [http://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00206-9](http://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00206-9)
- Petterino, C., & Argentino-Storino, A. (2006). Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(3), 213–219. <http://doi.org/10.1016/j.etp.2005.10.002>
- Pieszka, M., Szczurek, P., Ropka-Molik, K., Oczkowicz, M., & Pieszka, M. (2016). The role of resveratrol in the regulation of cell metabolism - a review. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej (Online)*, 70, 117–23. <http://doi.org/10.5604/17322693.1195844>
- Popov, S. V., Ovodova, R. G., Golovchenko, V. V., Popova, G. Y., Viatyasev, F. V., Shashkov, A. S., & Ovodov, Y. S. (2011). Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. *Food Chemistry*, 124(1), 309–315. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.038>
- Rebeca, R., Bracht, L., Noleto, G. R., Martinez, G. R., Cadena, S. M. S. C., Carnieri, E. G. S., ... de Oliveira, M. B. M. (2008). Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochemistry and Function*, 26(6), 731–738. <http://doi.org/10.1002/cbf.1497>
- Ren, L., Perera, C., & Hemar, Y. (2012). Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Food & Function*, 3(11), 1118. <http://doi.org/10.1039/c2fo10279j>
- Renard, C. M. G. C., Lahaye, M., Mutter, M., Voragen, F. G. J., & Thibault, J. F. (1997). Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research*, 305(2), 271–280. [http://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)10028-3](http://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)10028-3)
- Rodrigues Viana, C. T., Ribeiro Castro, P., Motta Marques, S., Paz Lopes, M. T., Gonçalves, R., Peixoto Campos, P., & Andrade, S. P. (2015). Differential Contribution of Acute and Chronic Inflammation to the Development of Murine Mammary 4T1 Tumors. *Plos One*, 10(7), e0130809. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130809>
- Rout, S., & Banerjee, R. (2007). Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from

- Punica granatum. *Bioresource Technology*, 98, 3159–3163.
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.011>
- Sánchez, T., & Moreno, J. J. (1999). Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 57, 119–131. [http://doi.org/10.1016/S0090-6980\(98\)00078-1](http://doi.org/10.1016/S0090-6980(98)00078-1)
- Sasaki, G. L., Elli, S., Rudd, T. R., Macchi, E., Yates, E. A., Naggi, A., ... Guerrini, M. (2013). Human (??2???) and avian (??2???) sialylated receptors of influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution. *Biochemistry*, 52(41), 7217–7230. <http://doi.org/10.1021/bi400677n>
- Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., & Iacomini, M. (2005). Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: Some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, 340(4), 731–739.
<http://doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.020>
- Sasaki, G. L., Guerrini, M., Serrato, R. V., Santana Filho, A. P., Carlotto, J., Simas-Tosin, F., ... Gorin, P. A. J. (2014). Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. *Carbohydrate Polymers*, 104(1), 34–41.
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.046>
- Shah, S. M., Goel, P. N., Jain, A. S., Pathak, P. O., Padhye, S. G., Govindarajan, S., ... Nagarsenker, M. S. (2014). Liposomes for targeting hepatocellular carcinoma: Use of conjugated arabinogalactan as targeting ligand. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1-2), 128–39. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.014>
- Singh, C. K., Liu, X., & Ahmad, N. (2015). Resveratrol, in its natural combination in whole grape, for health promotion and disease management. *Annals of the New York Academy of Sciences*, (2), n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/nyas.12798>
- Su, Z., Yang, Z., Xie, L., Dewitt, J. P., & Chen, Y. (2016). Cancer therapy in the necroptosis era, 1–9. <http://doi.org/10.1038/cdd.2016.8>
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14, 48. <http://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>
- Suo, H., Song, J.-L., Zhou, Y., Liu, Z., Yi, R., Zhu, K., ... Zhao, X. (2014). Induction of apoptosis in HCT-116 colon cancer cells by polysaccharide of *Larimichthys crocea* swim bladder. *Oncology Letters*, 972–978. <http://doi.org/10.3892/ol.2014.2756>
- Vicentino, C., Constantin, J., Aparecido Stecanella, L., Bracht, A., & Yamamoto, N. S. (2002). Glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats and the response to hormones. *Pathophysiology*, 8(3), 175–182.
[http://doi.org/10.1016/S0928-4680\(02\)00003-2](http://doi.org/10.1016/S0928-4680(02)00003-2)

- Vicentino, C., Constantin, J., Bracht, A., & Yamamoto, N. S. (2002). Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. *Liver*, 22(4), 341–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12296968>
- Vinogradov, E., Petersen, B., & Bock, K. (1998). Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using ¹H and ¹³C NMR spectroscopy at 750 MHz. *Carbohydrate Research*, 307(1-2), 177–183. [http://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00042-1](http://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00042-1)
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz Jr., L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339(6127), 1546–1558. <http://doi.org/10.1126/science.1235122>
- Wasser, S. (2003). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258–274. <http://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- Yang, L. C., Hsieh, C. C., Lu, T. J., & Lin, W. C. (2014). Structurally characterized arabinogalactan from *Anoectochilus formosanus* as an immuno-modulator against CT26 colon cancer in BALB/c mice. *Phytomedicine*, 21(5), 647–655. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.10.032>
- Zhou, J., Hu, N., Wu, Y., Pan, Y., & Sun, C. (2008). Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant properties of acidic polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(9), 721–727. <http://doi.org/10.1631/jzus.B0820025>

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary figure 1 - Gene expression of *p53* (A), *Bax* (B), *Bcl-2* (C), *Caspase-3* (D) and *Vegf* (E) in tumor tissue of rats treated with vehicle (Veh), SFP 30 mg/kg (SFP30) or SFP 60 mg/kg (SFP60) during 14 days. Values are expressed as mean \pm S.E.M (n=5). Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test, and differences between groups were considered significant with $p < 0.05$. No statistic differences were observed.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou o efeito antitumoral, frente ao carcinossarcoma Walker-256, da fração solúvel de polissacarídeos de vinho tinto, composta principalmente por arabinogalactanas, mananas e pectinas, como raminogalacturonanas tipo I e II. A SFP induziu à expressiva redução do volume e do peso tumoral. O efeito encontrado é, pelo menos em parte, devido à modulação inflamatória no microambiente tumoral, associada à estimulação de morte celular por necroptose, uma morte celular programada independente de caspases, e ativada por proteínas RIP1 e RIP3. A SFP quando administrada nas doses de 30 e 60 mg/kg a ratos hípidos (sem tumor) não induziu alterações significativas, demonstrando ausência de toxicidade.

Assim, a SFP parece promissora como terapia antitumoral, sem induzir toxicidade sistêmica. Novos estudos devem ser encorajados para avaliar seu efeito em longo prazo, em outros modelos de tumor, e sua eficácia quando associada a outros agentes anticancerígenos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCO, A., BASTOS-PEREIRA, A.L., DREIFUSS, A.A. Characteristics and Applications of the Walker-256 Rat Tumour. In: S.G. Pandalai; Daniel Pouliquen. (Org.). The rat in cancer research: a crucial tool for all aspects of translational studies. 1 ed. Trivandrum: Research Signpost/ Transworld Research Network, 2012.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* v. 3 (8–9); p. 1109–15, 2004.

BRESSAC, B.; KEW, M.; WANDS, J.; OZTURK, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. v. 350 (6317) p. 429–31, 1991.

CHEN, J. *et al.* Anti-tumour effects of polysaccharides isolated from *Artemisia annua L* by inducing cell apoptosis and immunomodulatory anti-hepatoma effects of polysaccharides. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines*, v. 11, n. 1, p. 15–22, 2014.

CHIAL, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education*. 2008.

CIPRIANI, T. R. MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A Polysaccharide from a Tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* Leaves with Anti-ulcer Protective Effects. *J. Nat. Prod.* v. 69, p. 1018-1021, 2006.

CLYDESDALE, G.J.; DANDIE, G.W.; MULLER, H.K. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* v. 79 (6) p. 547–68, 2001.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; PAIVA, S. M. M.; SCOPARO, C. T.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; RATTMANN, Y. D.; SASSAKI, G. L. Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: A potential adjuvant in sepsis treatment. *Carbohydrate Polymers*. v. 92, p. 1776-1782, 2013.

EARLE, W. R. 1934, *Am. J. Cancer.*, 24, 566.

FEITELSON, M. A.; ARZUMANYAN, A.; KULATHIONAL, R. J.; BLAIN, S. W.; et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*. 2015.

FULDA, S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol*. 2010.

GARG, A. D.; MARTIN, S.; GOLAB, J.; AGOSTINIS, P. Danger signaling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. *Cell Death Differ* v. 21(1) p. 26–38, 2014.

GATÉ L, PAUL J, NGUYEN BG, TEW KD, TAPIERO H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed & Pharmacother.* v. 53, p. 169-180, 1999.

GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [acesso 26 de Mar 2015] Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

GOLDACRE, R.J. & SYLVEN, B. 1962, *Brit. J. Cancer.* 16, 306

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell.* <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>

HAIGIS, K. M.; SWEET-CORDERO, A. New insights in to oncogenic stress. *Nat Genet.* v. 43 (3) p. 177–8, 2011.

HSUL, C.; METCALF R. A.; SUN T.; WELSH J. A.; WANG N. J.; HARRIS C. C. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature.* v. 350 (6317) p. 427–8, 1991.

HUANG, T. S.; CHIU, Y. H; CHAN, Y. L; CHIU, Y. H.; WANG, H.; HUANG, K. C.; LI, T. L.; HSU, K. H.; WU, C. J. Prophylactic Administration of Fucoidan Represses Cancer Metastasis by Inhibiting Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Lewis Tumor-Bearing Mice. *Marine drugs.* 2015.

INCA. Brasil. Ministério de Saúde. Incidência de Câncer no Brasil – Estimativa 2014. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2011 [acesso 25 Mar 2015]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>

INNGJERDINGEN, K. T.; THÖLE, C.; DIALLO, D.; PAULSEN, B.S; HENSEL, A. Inhibition of Helicobacter pylori adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by aqueous extracts and pectic polysaccharides from the roots of Cochlospermum tinctorium A. Rich. and Vernonia kotschyana Sch. Bip. ex Walp. *Fitoterapia.* v. 95, p.127-132, 2014.

ITOH, M.; TSUJI, T.; NAKAMURA, H.; YAMAGUCHI, K.; FUCHIKAMI, J.; TAKAHASHI, M.; et al. Systemic effects of acute cigarette smoke exposure in mice. *Inhal Toxicol.* v. 26, n. 8, p. 464–73, 2014.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, D.; MEHTA, R.G.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science.* v. 275, p. 218-202, 1997.

JEDINAK, A.; DUDHGAONKAR, S.; SLIVA, D. Activated macrophages induce metastatic behavior of colon cancer cells. *Immunobiology.* v. 215, p. 242–9, 2010.

JOUAN-LANHOUE, S. *et al.* Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. [S.l: s.n.], 2014

JUIN P, GENESTE O, RAIMBAUD E, HICKMAN JA. Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1644(2-3):251-60, 2004.

KAMB, A. Cancer. Sun protection factor p53. *Nature*. 1994.

LEVINE, A. J., OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. v. 9 n. 10, p. 749–58, 2009.

LI, Y. *et al.* Evaluation of antioxidant and immuno-enhancing activities of Purslane polysaccharides in gastric cancer rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 68, p. 113–116, 2014.

LIU, G. *et al.* A novel polysaccharide from *Sargassum integerrimum* induces apoptosis in A549 cells and prevents angiogenesis in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, v. 6, n. May, p. 26722, 2016.

MAIA, V. R.; DANTAS, A. C. A.; SANTOS, M. G. S.; RAMOS, V. P. Administração de quimioterapia antineoplásica no tratamento de hemopatias malignas – Protocolos de enfermagem: HEMORIO, 2010.

MAJMUNDAR, A. J.; WONG, W. J.; SIMON, M. C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. v. 40 n. 2, p. 294–309, 2010.

MANTOVANI, G.; MACCIO A.; MADEDDU, C.; MURA, L.; MASSA, E.; GRAMIGNANO G.; LUSSO, M. R.; MURGIA, V.; CAMBONI, P.; FERRELI, L. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment *J. Cell. Mol. Med*. v. 6, n. 4, p. 570-582, 2002.

MANTOVANI, A; MANTOVANI, A; ALLAVENA, P; SICA A; BALKWILL, F. Cancer – related inflammation. *Natura*, v. 454, n. 7203, p. 436 – 44, 2008.

MAU, J. L.; CHAO, G. R.; WWU, K. T. Antioxidant Properties of Methanolic Extracts from Several Ear Mushrooms. *J. Agric. Food Chem*. v. 49, p. 5461 – 5467, 2001.

MELLINGER, C. G.; CIPRIANI, T. R.; NOLETO, G. R.; CARBONERO, E. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 43, p. 115-120, 2008. MENG, M. *et al.* Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. *Oncotarget*, n. 1, p. 1–23, 2015.

Merck

Manual.

http://www.merckmanuals.com/vet/pharmacology/antineoplastic_agents/overview_of_antineoplastic_agents.html. 2013. Acesso em 28/03/2015.

MUELLER, E. A.; ANDERER, F. A. Synergistic Action of a Plant Rhamnogalacturonan Enhancing Antitumor Cytotoxicity of Human Natural Killer and Lymphokine-activated Killer Cells: Chemical Specificity of Target Cell Recognition. *Cancer research*. v. 50, p. 3646-3651, 1990.

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F.; FERREIRA, D.; SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. *Phytochemistry*. v. 85, p. 137-142, 2013.

OOI, V.; LIU, F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int J Med Mushrooms* v. 1, p. 195–206, 1999.

OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. *Current Medicinal Chemistry*. v. 7, p. 715 – 729, 2010.

PARK, S. N.; NOH, K. T.; JEONG, Y.; JUNG, I. D.; KANG, H. K.; CHA, G. S.; LEE, S. J.; SEO, J. K.; KANG, D. H.; HWANG, T.; LEE, E. K.; KWON, B.; PARK, Y. Rhamnogalacturonan II is a Toll-like receptor 4 agonist that inhibits tumor growth by activating dendritic cell-mediated CD8+ T cells. *Experimental & Molecular Medicine*. v. 45, 2013.

PFLAUM, J.; SCHLOSSER S.; MÜLLER M. p53 family and cellular stress responses in cancer. *Frontiers in oncology*. v. 4, 2014.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)*. v. 3, p. 279-96, 2011.

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

REBECA, R., BRACHT, L., NOLETO, G. R., MARTINEZ, G. R., CADENA, S. M. S. C., CARNIERI, E. G. S., ... de OLIVEIRA, M. B. M. (2008). Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochemistry and Function*, v. 26 n.6, p. 731–738.

REN, L.; PERERA, C.; HEMAR, Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Food & Function*. 2012.

RILEY, P. A. Free radical sin biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. v. 65, n. 1, p. 27–33, 1994.

RODRIGUES VIANA, C. T., RIBEIRO CASTRO, P., MOTTA MARQUES, S., PAZ LOPES, M. T., GONÇALVES, R., PEIXOTO CAMPOS, P., & ANDRADE, S. P. Differential Contribution of

Acute and Chronic Inflammation to the Development of Murine Mammary 4T1 Tumors. *Plos One*, v. 10, n. 7, e0130809, 2015.

ROSA E. F., COIMBRA V. C., Colon cancer and oxidative stress. *O mundo da saúde*. v. 33(4), p. 415-418, 2009.

ROTLAT, B.; GRUNEWALD, T. G.; LEPRIVIER, G.; MELINO, G.; KNIGHT, R. A. Anti-oxidative stress response genes: bioinformatics analysis of their expression and relevance in multiple cancers. *Oncotarget*. v. 4, n. 12, p. 2577–90, 2013.

ROUT, S.; BANERJEE, R. Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *Punica granatum*. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 3159-3163, 2007.

SCHREK, R. A. 1935, *Am. J. Cancer.*, 24, 807

SHAY, J. E. S.; SIMON, M. C. Hypoxia-inducible factors: Crosstalk between inflammation and metabolism. *Semin Cell Dev Biol*. v. 23, p. 389–94, 2012.

SILVA M. P. Anorexia-cachexia syndrome in cancer patients. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 52(1), p. 59-77, 2006.

SINGH, C.K.; LIU, X.; AHMAD, N. Resveratrol, in its natural combination in whole grape, for health promotion and disease management. *Ann N Y Acad Sci*. Jun 22, 2015.

STRASSER A, O'CONNOR L, DIXIT VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. v. 69, p. 217-45, 2000.

SU, Z., YANG, Z., XIE, L., DEWITT, J. P., & CHEN, Y. Cancer therapy in the necroptosis era, p. 1–9, 2016.

SUO, H.; SONG, J-L; ZHOU, Y.; ZHENHU, L.; YI, R; ZHU, K.; ZHAO, X. Induction of apoptosis in HCT-116 colon cancer cells by polysaccharide of *Larimichthys crocea* swim bladder. *Oncology Letters*. v. 9, p. 972-978, 2015.

TORRES M., SOARES N., PEREIRA J. A., Extraction of glutathione s-transferase from bovine liver. *Ciênc. agrotec*. v. 30, n. 2, p. 302-307, 2006.

TSAO, A. S.; KIM, E. S., HONG, W. K. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin*. v. 54, n. 3, p. 150-180, 2004.

VANDEN BERGHE, T. *et al.* Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell death and differentiation*, v. 17, n. 6, p. 922–930, 2010.

VICENTINO, C., CONSTANTIN, J., APARECIDO STECANELLA, L., BRACHT, A., & YAMAMOTO, N. S. Glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256

tumor-bearing rats and the response to hormones. *Pathophysiology*, 8(3). 175-182, 2002.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *Int J Med Mushrooms*. v. 1, p. 31–62, 1999.

WASSER S. P.; Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 60, p. 258 – 274, 2002.

WONGTRAKOONGATE, P. Epigenetic therapy of cancer stem and progenitor cells by targeting DNA methylation machineries. *World J Stem Cells*. v. 7, n. 1, p. 137-148, 2015.

YANG, L. C., HSIEH, C. C., LU, T. J., & LIN, W. C. Structurally characterized arabinogalactan from *Anoectochilus formosanus* as an immuno-modulator against CT26 colon cancer in BALB/c mice. *Phytomedicine*, v. 21 n. 5, p. 647–655, 2014.

ZHAO, X.; SONG, J. L.; WANG, Q.; et al. Comparisons of Shuidouchi, Natto, and Cheonggukjang in their physicochemical properties, and antimutagenic and anticancer effects. *Food Sci Biotechnol*. v. 22, p. 1077-1084, 2013.

ZHOU, J.; HU, N.; WU, Y.; PAN, Y.; SUN, C. Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant properties of acidic polysaccharides from *Sargassum fusiforme**. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. v. 9 (9), p. 721-727, 2008.

ZIEGLER, A.; JONASON, A.S.; LEFFELL, D.J.; SIMON, J. A.; SHARMA, H. W.; KIMMELMAN, J; et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*. v. 372, p. 773 – 776, 1994.

ZIMMER A., Perfil imunohistoquímico das proteínas da família bcl-2 e evolução clínica do câncer de ovário: uma análise de pacientes do hospital de clínicas de porto alegre / Brasil (1996 a 2004). Dissertação de Mestrado, UFRGS. 2007. Sanchez, T. and J. J. Moreno. "Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin." *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. v. 57(2-3), p. 119-131, 2007.