

ARTIGO ORIGINAL

Avaliação histopatológica dos órgãos de camundongos com Carcinoma de Ehrlich tratados com cisplatina, acunpuntura e *Euphorbia tirucalli* l.

Histopathological evaluation of mice of the organs with Ehrlich Carcinoma treated with cisplatin, acupuncture and Euphorbia tirucalli l.

RESUMO

Introdução: O câncer é uma das maiores causas de morte do mundo sendo considerado um problema de saúde pública. **Objetivo:** Objetivou-se realizar a avaliação histopatológica de órgãos de camundongos com carcinoma de Ehrlich tratados com cisplatina, acunpuntura e a planta *Euphorbia tirucalli* L. **Metodologia:** Utilizou-se 25 camundongos, fêmeas, com 60 dias de idade, 25 e 35 g de peso corpóreo sendo divididos em Grupo 1 – Controle negativo - 1ml de Soro Fisiológico 0,9% (VO); Grupo 2 – Controle positivo - 2,5mg/kg de Cisplatina (VO); Grupo 3 - Pré-tratamento com acunpuntura + 2mg/kg da *Euphorbia tirucalli* (VO); Grupo 4 – Acunpuntura; Grupo 5 - Acunpuntura + 2mg/kg *Euphorbia tirucalli* (VO). Inoculou-se células do carcinoma em todos os animais e durante 8 dias foi realizado os protocolos terapêuticos. No nono dia os camundongos foram pesados, eutanasiados por deslocamento cervical, necropsiados para avaliação macroscópica e histológica dos órgãos e do tumor. Os acupontos utilizados foram B10, VB30 e F3. **Resultados:** Houve variação significativa no peso dos órgãos (Rins, Baço, Fígado) e do Tumor. As principais alterações histopatológicas foram pneumonia, hepatite, necrose hepática, degeneração gordurosa e hiperplasia da polpa branca do baço. **Conclusão:** A cisplatina demonstrou ser o tratamento mais eficaz em camundongos com carcinoma de Ehrlich quanto a redução do tumor. A dose utilizada na pesquisa do látex da *Euphorbia tirucalli* L. demonstrou ser hepatotóxica, no entanto os tratamentos com acunpuntura e a planta proporcionaram uma resposta imunológica. Assim, sugere-se a associação da acunpuntura e da *Euphorbia tirucalli* como tratamentos coadjuvantes em pacientes com carcinoma.

PALAVRAS-CHAVE

Câncer.
Etnobotânica.
Fitoterapia.
Medicina Tradicional Chinesa.



Mirella Bezerra de Melo Colaço Dias
- Doutora em Ciência Veterinária, Recife (PE), Brasil.

Tamires Saches Santos do Nascimento
- Estudante de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil.

Márcia de Figueiredo Pereira
- Professora Adjunta do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife (PE), Brasil.

Ivone Antônia de Souza
- Professora da Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil.

Evilda Rodrigues de Lima
- Professora Titular do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife (PE), Brasil.

DOI: 10.19177/cntc.v7e13201839-46

CORRESPONDENTE

Mirella Dias
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171 – 900 – Recife/PE.

E-MAIL
mirella_colaco@yahoo.com.br

Recebido: 27/07/2018

Aprovado: 13/09/2018

ABSTRACT

Introduction: Cancer is one of the biggest causes of death in the world and is considered a public health problem. **Objective:** The objective was accomplish histopathological evaluation of organs of Erhlich's carcinoma treated with cisplatin, acupuncture and *Euphorbia tirucalli* L. **Methodology:** Its were used 25 female mice, 60 days old, with 25 and 35 g of body weight were divided into Group 1 - Negative control - 1ml of Physiological Serum 0,9% (VO); Group 2 - Positive control - 2.5mg / kg Cisplatin (VO); Group 3 - Pre-treatment with acupuncture + 2mg / kg of *Euphorbia tirucalli* (VO); Group 4 - Acupuncture; Group 5 - Acupuncture + 2mg / kg *Euphorbia tirucalli* (VO). Carcinoma cells were inoculated into all animals and for 8 days the therapeutic protocols were performed. On the ninth day the mice were weighed, euthanized by cervical displacement, necropsied for histological evaluation and the tumor excised. The acupoints used were BL10, GB30 and LR3. **Results:** The weight of the organs (Kidneys, Spleen, Liver) and Tumor were significant. The main histopathological changes were pneumonia, hepatitis, necrosis, fatty degeneration and hyperplasia of the white pulp. **Conclusion:** The cisplatin has been shown to be the most effective treatment in mice with Erhlich's carcinoma for tumor reduction. The dose used in the latex research of *Euphorbia tirucalli* L. was shown to be hepatotoxic, however the treatments with acupuncture and the plant provided an immune response. Thus, the association of acupuncture and *Euphorbia tirucalli* is suggested as adjuvant treatments in patients with carcinoma.

Keywords: Cancer. Ethnobotany. Phytotherapy. Traditional Chinese Medicine.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo o que configura um problema de saúde pública. É uma doença crônico-degenerativa que afeta várias dimensões da vida humana e causa importante impacto econômico na sociedade, necessitando de tratamento especializado prolongado e oneroso. Além de ser responsável pela redução do potencial de trabalho humano e perda de muitas vidas¹.

Constata-se nas pesquisas que os tratamentos utilizados para o câncer como os radioterápicos e quimioterápicos têm efeitos colaterais indesejáveis e, muitas vezes, deficientes respostas terapêuticas. Assim, há uma incessante busca de formas terapêuticas eficientes que causem o mínimo de efeitos colaterais². O uso de produtos naturais como agentes anticâncer tem uma longa história que iniciou com a medicina popular e através dos anos foi incorporada à medicina alopática³.

A *Euphorbia tirucalli* L. constitui o maior representante da família Euphorbiaceae compreendendo 1.500 espécies, as quais são cosmopolitas em sua distribuição. Apresenta atividade antiparasitária, analgésica, antiinflamatória, fungicida, hepatoprote-

tor e queratolítico, além de demonstra efeitos antineoplásicos promissores, já que inibe a proliferação da proteína quinase C (PKC), o que resulta num efeito antiproliferativo e apoptótico em várias células cancerígenas^{4,5}.

Outra terapia que tem auxiliado pacientes com câncer é a acupuntura que trata o paciente como um todo, não somente a doença. Estimula a imunidade e atua atenuando nos sintomas relativos ao câncer e efeitos colaterais comumente observados nos tratamentos convencionais⁶, considera a função do corpo e da mente como resultado da interação das energias yin e yang⁷. Assim o objetivo desta pesquisa foi realizar a avaliação histopatológica órgãos de camundongos com carcinoma de Erhlich tratados com cisplatina, acupuntura e a planta *Euphorbia tirucalli* L.

MATERIAL E MÉTODO

Local do experimento

Esta pesquisa foi desenvolvida no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Material Botânico

O látex de *Euphorbia tirucalli* foi coletado no Jardim do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco nos meses de junho a agosto de 2015. A exsicata da espécie vegetal foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica/CCB/UFPE com o n° 41.765. O látex depois de coletado foi imediatamente diluído com soro fisiológico 0,9% para a dose terapêutica de 2,0 mg/kg⁸ e administrado por via oral (VO), uma vez por dia, durante a realização da pesquisa.

Animais

Foram utilizados 25 camundongos Albino suíço (*Mus musculus*), fêmea, aproximadamente 60 dias de idade, com 25 e 35 g de peso corpóreo, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em temperatura de 22 ± 2° C, com alimentação adequada, água *ad libitum*, condições controladas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas cada) e pesagem diária (balança Triple Beam Scale 2610g, 700 800 Series).

Antes de ser realizada a fase experimental, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, processo n° 23076.022599/2015-49. Os 25 animais que constituíram o experimento foram divididos aleatoriamente em cinco Grupos contendo em cada Grupo cinco camundongos.

- » Grupo 1
Controle negativo - 1ml de Soro Fisiológico 0,9% (VO).
- » Grupo 2
Controle positivo - 2,5mg/kg de Cisplatina (VO).
- » Grupo 3
Pré-tratamento com acupuntura + 2mg/kg da *Euphorbia tirucalli* (VO).
- » Grupo 4
Acupuntura.
- » Grupo 5
Acupuntura + 2mg/kg *Euphorbia tirucalli* (VO).

Os animais de todos os grupos foram submetidos a um período de adaptação de 15 dias. Apenas os animais do Grupo 3 receberam um pré-tratamento com acupuntura após oito dias de adaptação. Posteriormente ao período de adaptação, foi realizada a inoculação das células do carcinoma de Ehrlich em todos os animais do experimento e após 48 horas iniciou-se os diferentes tratamentos, sendo estes, administrados uma vez ao dia durante oito dias. No nono dia, os camundongos foram pesados, eutanasiados por deslocamento cervical⁹ e necropsiados para avaliação macroscópica e histológica dos órgãos (Baço, Fígado e Rim) e do tumor. O tempo estipulado para a realização do experimento foi de acordo com o protocolo adotado no laboratório experimental considerando o princípio dos 3R's (substituição, redução e refinamento dos animais) com foco no respeito e bem-estar animal.

Procedimentos para inoculação do carcinoma de Ehrlich

As células viáveis do carcinoma de Ehrlich foram retiradas do tumor de animais de manutenção dos estudos que se encontravam no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Para o transplante das células cancerígenas retirou-se um fragmento de 3 mm de diâmetro, do conteúdo tumoral e transplantou-se na região axilar de todos os animais, por via subcutânea, conforme a metodologia já descrita¹⁰ modificada obtendo-se, assim, a implantação do tumor sólido de Ehrlich (TSE).

Técnica de acupuntura e Acupontos

A técnica de Agulhamento e os acupontos B10 (*Tianzhu*), VB30 (*Huantiao*) e F3 (*Taichong*) utilizados foram baseados na literatura^{11,12}, com modificações necessárias para a realização desta pesquisa. As agulhas usadas foram auriculares de aço inoxidável, com 0,20 a 2,0 mm de comprimento. O comprimento da agulha foi determinado pela es-

pécie e localização do ponto. A aplicação da agulha foi feita com a contenção do animal^{17,18} e introduzida bilateralmente de forma suave e rápida, com o auxílio de uma pinça anatômica e fixada com esparadrapo. O protocolo terapêutico da acupuntura foi feito nos camundongos três vezes, tendo como intervalo um dia entre uma sessão e outra. O horário estipulado para a realização da acupuntura foi entre às 13h e 15h, para evitar interferências do círculo circadiano¹¹.

Análise histopatológica

O tumor e os órgãos pulmões, baço, rins e fígado foram fixados com formaldeído 10% em solução tampão neutra e encaminhados para avaliação histopatológica pelas técnicas rotineiras de desidratação, diafanização, inclusão em parafina e coloração com hematoxilina-eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados quantitativos obtidos para as variáveis relacionadas com o peso realizou-se através da Análise de Variância (ANOVA), considerando as fontes de variação os diferentes tipos de tratamento. Seguida, quando detectada diferença, pelo teste Tukey como *post hoc* teste. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Para todas as análises foi utilizado o programa SPSS versão 20.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relacionados ao peso dos órgãos, do tumor e do histopatológico estão descritos na Tabela 1 e 2, respectivamente. Foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) dos órgãos Baço, Fígado e do Tumor para o Grupo G2 de $0,092 \pm 0,033$, $1,438 \pm 0,412$ e $0,226 \pm 0,183$ respectivamente, quando comparado ao Grupo controle negativo. A redução do peso do Baço pode indicar um efeito imunossupressor da cisplatina. Agentes antitumorais podem causar significante involução do baço¹³, além de apoptose em diferentes ti-

pos celulares como células do sistema imune¹⁴. A cisplatina é um quimioterápico da classe dos citostáticos que pode causar uma mielossupressão em 25% a 30% dos pacientes¹⁵.

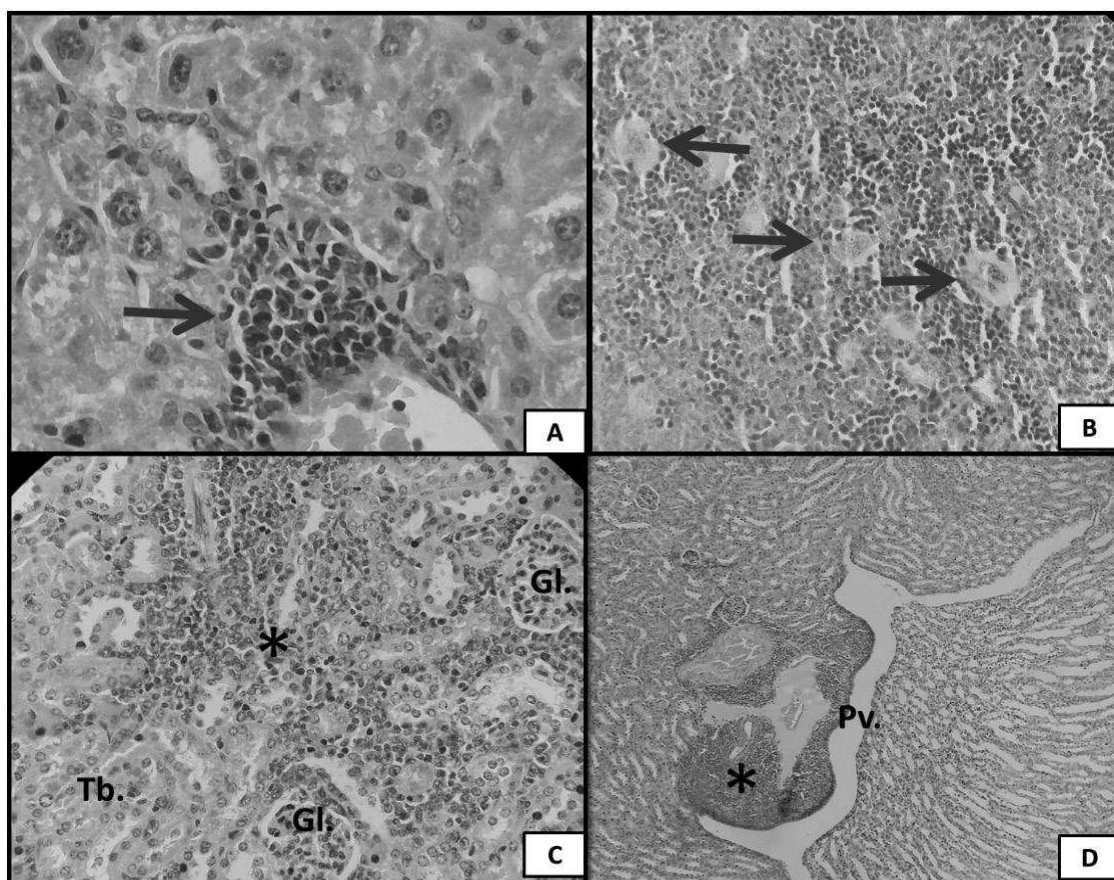
Nesta pesquisa, observou-se a presença de hiperplasia da polpa branca no resultado histopatológico. Este fato pode ter ocorrido pela ação da cisplatina, com o potencial de sensibilizar as hemácias resultando em anemia hemolítica, fazendo com que o paciente apresente uma queda na hemoglobina¹⁵ que poderia promover uma redução da polpa vermelha deixando a polpa branca mais evidente já que o Baço apresentou um menor peso.

Em relação ao Fígado a redução do peso deste órgão pode ser decorrente de uma hepatotoxicidade causada pelo quimioterápico concordando com o resultado do histopatológico que identificou a presença de hepatite e proliferação de ducto biliar. Observou-se que os animais do Grupo G2 apresentaram uma redução do peso corporal, no entanto ingeriram uma maior quantidade de alimento quando comparado ao grupo controle negativo o que poderia justificar a degeneração gordurosa observada na avaliação microscópica.

Neste experimento, apesar de não ter tido diferença estatística significativa em relação aos tratamentos com acupuntura e/ou *Euphorbia tirucalli* observou-se um aumento do peso do Fígado quando comparado ao grupo controle negativo o que pode ser justificado pelo resultado do histopatológico o qual verificou-se a presença de degeneração gordurosa, congestão, necrose e hematopoiese extramedular. Observou-se que os animais dos Grupos G3, G4 e G5 tiveram um aumento de peso quando comparado ao grupo controle negativo.

A presença da necrose dos hepatócitos nos Grupos que receberam a *Euphorbia tirucalli* indica uma lesão hepática o que demonstra uma ação hepatotóxica da dose utilizada na pesquisa. Estudos toxicológicos do látex da *Euphorbia tirucalli* L. têm demonstrado que diferentes concentrações podem interferir no peso dos órgãos, além de ter efeitos hepatotóxicos^{16,17} (Figura 1).

Figura 1 - A) Fígado. Agregado celular heterogêneo no interstício (seta azul). Coloração hematoxilina e eosina (HE), objetiva 40x. B) Baço. Numerosos megacariócitos no parênquima (setas azuis). Coloração Hematoxilina e Eosina (HE), objetiva 10x. C e D) Respectivamente, córtex e medular renal. Agregados mononucleares intersticiais (asteriscos). HE, objetivas, respectivas 10x e 4x.



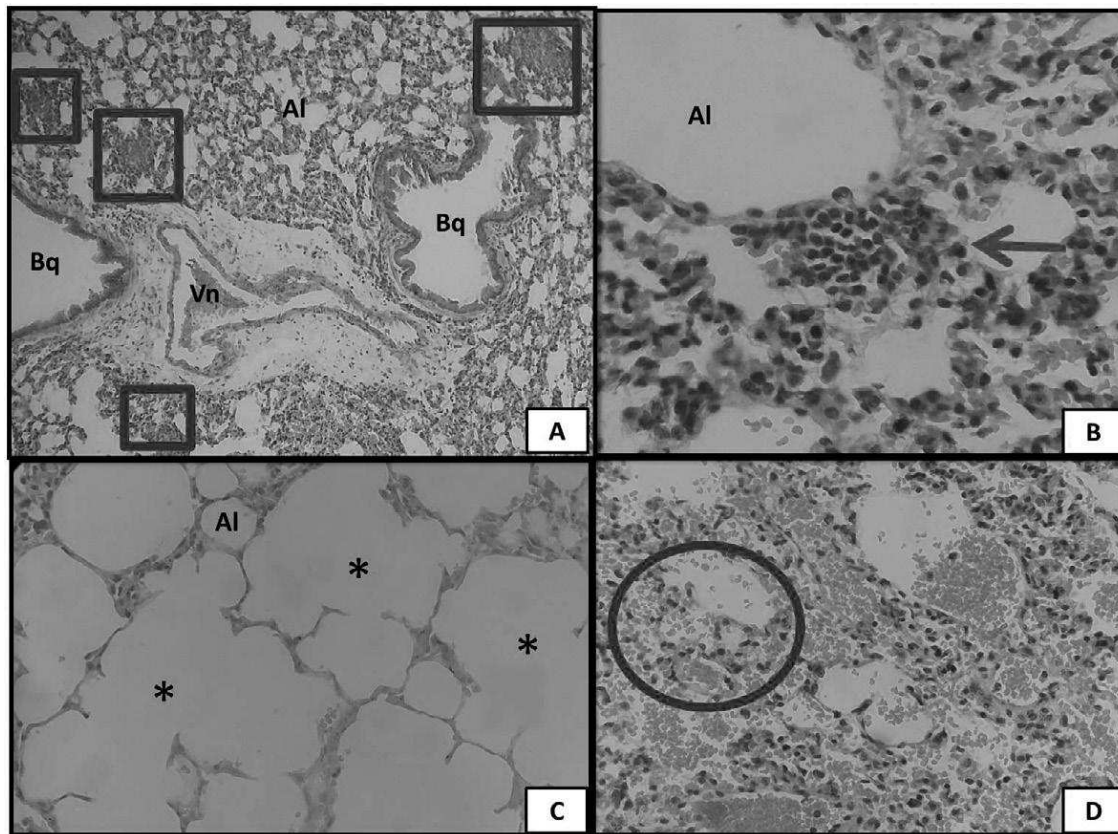
Os Rins apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para o Grupo G4 ($0,493 \pm 0,110$) quando comparado aos Grupos controle negativo e positivo. O aumento do peso deste órgão pode estar relacionado com a presença da congestão, glomerulonefrite e nefrite, lesões encontradas na avaliação histopatológica. Na avaliação microscópica do Pulmão, apesar de nenhum Grupo apresentar diferença significativa em relação ao peso, observou-se a presença de pneumonia em todos os Grupos o que poderia ser justificado pela presença de um microorganismo oportunista, hiperplasia de Balt nos animais que receberam a cisplatina e congestão nos Grupos tratados com acupuntura e/ou *Euphorbia tirucalli* (Figura 2).

Em relação ao Baço, apesar de não apresentado diferença significativa entre os tratamentos com acupuntura e/ou *Euphorbia tirucalli* houve um aumento do peso deste órgão dos Grupos 3,4 e 5 quando comparado ao grupo controle negativo, além de

hiperplasia da polpa branca no histopatológico. A esplenomegalia pode ocorrer pelos diversos estados de maturação de leucócitos e pelo maior número de megacariócitos que sofrem maturação no baço desta espécie^{18,19} demonstrando um efeito imunestimulante da acupuntura e *Euphorbia tirucalli*.

A acupuntura tem como objetivo manter as energias Yin e Yang, que são encontradas no corpo energético, equilibradas e conseqüentemente o organismo fortalecido, já que de acordo com a Medicina Tradicional Chinesa, uma concentração ou ausência desta energia compromete a saúde orgânica do ser deixando o indivíduo mais susceptível a um quadro de adoecimento, pode atuar na modulação imuno-neuro-endócrina do indivíduo produzindo citocinas que agem na inflamação, imunidade celular, imunidade humoral e homeostasia do sistema imune, melhora o estado psicomotor e a qualidade de vida, além de minimizar os efeitos colaterais da quimioterapia^{12,20,21,22}.

Figura 2 - A) Pulmão. Numerosas áreas de agregados celulares (retângulos azuis). Al.: alvéolo, Bq.: bronquíolo, Vn.: vênula. Coloração hematoxilina e eosina (HE), objetiva 10x. B) Pulmão. Uma das áreas evidenciadas no retângulo da imagem A digitalmente aumentada, representando agregados de células mononucleares. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE), objetiva 10x. C) Pulmão. Áreas de distensão e ruptura de parede alveolar (asteriscos). Al.: alvéolo íntegro. HE, objetiva 10x. D) Pulmão. hemorragia intra-alveolar (círculos azuis). HE, objetiva 10x.



O quimioterápico demonstrou uma inibição tumoral, mesmo utilizando-o em um menor período de tempo, já que segundo a indicação da bula¹⁵ deve-se administrar a cisplatina uma vez a cada 3 a 4 semanas. A cisplatina apresenta elevada atividade antitumoral, seja como agente isolado ou associado a outros fármacos antitumorais, especialmente nos tumores do testículo, do ovário e de tumores sólidos, tais como carcinoma de cabeça, pescoço, próstata e bexiga¹⁵.

Nesta pesquisa, apesar de não ter sido observado diferença significativa, os tratamentos utilizados com acupuntura e/ou o látex da *Euphorbia tirucalli* apresentaram uma redução no peso médio do tumor em relação ao grupo controle negativo o que demonstra a possibilidade do uso destas terapias associado ao tratamento quimioterápico. Observou-se que em nenhum Grupo houve a presença de metástase. A metástase é característica biológica dos tumo-

res malignos o que influencia diretamente no tratamento e prognóstico do câncer²³.

O eufol, componente químico da *E. tirucalli* é capaz de diminuir a expressão das ciclinas A, B1 e D1, bem como a fosforilação da proteína Rb a qual está relacionada à regulação inibitória da expressão da quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), ao mesmo tempo que estimula as proteínas p21 e p27, assumidas como inibidores de CDK. Estes achados cooperam para o estadiamento das células cancerígenas nas fases S e G2²⁴.

O extrato da planta, direta ou indiretamente, proporciona um aumento do efeito mielomodulatório e ação contra evolução tumoral demonstrado no modelo de Tumor de Ehrlich ascítico em camundongos, evidenciado pelo aumento dos níveis de prostaglandina E2 intraperitoneal após tratamento com o extrato²⁵. Outros estudos informam que os flavonóides apresentam ação antioxidante, promovendo efeito quimioprotetor²⁶.

Tabela 1 - Peso das Vísceras e do tumor segundo os grupos de camundongos

GRUPO	Pulmão	Baço	Rins	Fígado	Tumor				
G1	0,238 ± 0,056	0,268 ± 0,074	ab	0,304 ± 0,124	a	2,021 ± 0,226	a	1,300 ± 0,964	a
G2	0,256 ± 0,113	0,092 ± 0,033	bc	0,315 ± 0,037	a	1,438 ± 0,412	b	0,226 ± 0,183	b
G3	0,293 ± 0,108	0,361 ± 0,167	ab	0,404 ± 0,060	ab	2,252 ± 0,267	a	0,540 ± 0,309	ab
G4	0,360 ± 0,160	0,315 ± 0,101	ab	0,493 ± 0,110	b	2,584 ± 0,397	a	0,689 ± 0,461	ab
G5	0,202 ± 0,036	0,287 ± 0,074	ab	0,417 ± 0,085	ab	2,172 ± 0,368	a	0,395 ± 0,050	ab
p-valor¹	0,248	0,006*		0,020*		0,001*		0,039*	

p-valor da ANOVA; * Estatisticamente significante; Valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente (p>0,05) Teste Tukey. G1: Soro Fisiológico (Controle Negativo); G2: Substância Padrão - 2,5mg (Controle Positivo); G3: Pré-Tratamento + *Euphorbia tirucalli* L.; G4: Acupuntura; G5: Acupuntura + *Euphorbia tirucalli* L.

Tabela 2 - Principais alterações microscópicas observadas segundo os grupos de camundongos

	G1	G2	G3	G4	G5	
Pulmão	Pneumonia	2	1	2	2	2
	Hiperplasia de Balt	1	2	A	1	A
	Congestão	2	A	2	1	2
	Edema	1	A	A	A	A
	Enfisema	2	A	A	A	A
	Metástase	A	A	A	A	A
Fígado	Hepatite	A	1	A	A	A
	Congestão	A	A	1	A	A
	Degeneração gordurosa	2	A	3	2	A
	Necrose	A	A	1	A	1
	Hematopoiese extramedular	2	A	A	2	A
	Proliferação de ducto biliar	A	2	A	A	A
	Metástase	A	A	A	A	A
Rim	Congestão	1	1	1	1	A
	Glomerulite/Nefrite	2	A	1	2	A
	Metástase	A	A	A	A	A
Baço	Hematopoiese extramedular	2	1	A	2	A
	Hiperplasia /Hipertrofia de polpa branca	2	2	2	2	2

G1: Soro Fisiológico (Controle Negativo); G2: Substância Padrão - 2,5mg (Controle Positivo); G3: Pré-Tratamento + *Euphorbia tirucalli* L.; G4: Acupuntura; G5: Acupuntura + *Euphorbia tirucalli* L.

Alteração Ausente: A; Alteração leve/discreta: 1; Alteração moderada: 2; Alteração intensa/acentuada: 3

CONCLUSÃO

Conclui-se que de acordo com os resultados a cisplatina demonstrou ser o tratamento mais eficaz em camundongos com carcinoma de Ehrlich quanto a redução do tumor. A dose utilizada na pesquisa do látex da *Euphorbia tirucalli* L. de-

monstrou ser hepatotóxica, no entanto os tratamentos com acupuntura e a planta proporcionaram uma resposta imunológica. Assim, sugere-se a associação da acupuntura e da *Euphorbia tirucalli* L. como tratamentos coadjuvantes em pacientes com carcinoma.

CONFLITOS DE INTERESSE

Declararam não haver.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Tonon LM, Secoli SR, Caponeiro, R. Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007; 53 (2): 173-182.
2. Suffredini IB. A Review the physiological basis of cancer diseases and the search for new chemotherapeutics. The importance of the Brazilian biodiversity. *Journal of the Health Sciences Institute*. 2002; 20: 103-115.
3. Costa-Lotufo LV, Khan MT, Ather A, et al. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005 May; 99 (1): 21-30.
4. Silva CAM, Silveira D. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart.&Miq.) Baehni (Sapotaceae). 2007. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília; 2007.
5. Sapiência Jornal - Informativo científico da Fapepi. [Online]. n. 23, Ano 6, p. 04-09, 2010. Teresina-PI. Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/nova/sapiencia/pdf/sapiencia23.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2015.
6. Tagliaferri M, Cohen I, Tripathy, D. Complementary and alternative medicine in early-stage breast cancer. *Seminars in Oncology*. 2001; (28)1:121-134.
7. Maciocia G. Os fundamentos da Medicina Chinesa. 1ª ed. São Paulo: Roca; 1996.
8. Silva ACP. Abordagem da atividade biológica do látex de *Euphorbia tirucalli* linn (Euphorbiaceae). 2014. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco; 2014.
9. Rivera EAB. Analgesia, anestesia e eutanásia em roedores, logomorfos, cães e suínos. In: Feijó, AGS, Braga, LMGM, Pitrez, PMC. Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. 1 ed. Porto Alegre: EdiPUCRS; 2010.
10. Stock CC, Clarc DA, Phylips FS. Sarcoma 180 inhibition screening data. *Cancer Reseaearch* 1995; suppl. 2:2-3.
11. Schoen AM. Acupuntura veterinária: da arte antiga à medicina moderna. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2006.
12. Dias MBMC. Avaliação clínica da aplicação da acupuntura em cães com disfunções locomotoras e/ou neurológicas [dissertação]. Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2014.
13. Bezerra DP, De Castro FO, Alves AP, et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *Journal of Applied Toxicology*. 2008; 28 (2): 3106-3119.
14. Eichhorst ST, Muerloster S, Weigand MA, Krammer PH. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil induces apoptosis in mouse thymocytes *in vivo* via activation of the CD95 (APO-1/Fas) system. *Cancer Research*. 2001; 61: 243-248.
15. Asta Medica Oncologia. Cisplatina *. [Online]. p. 01-04, 2014. São Paulo-SP. Disponível em: <<http://www.astamedica.com.br>> Acesso em: 4 mar. 2017.
16. Bosch CAVD. Is endemic Burkitt 's lymphoma an alliance between three infections and a tumor promoter? *The Lancet Oncology*. 2004; 5: 738-746.
17. Varricchio MCBN, Sales F, Silva S, Kuster RM, Pyrrho AS, Castelo BMLT. Efeitos toxicológicos crônicos do látex bruto de *Euphorbia tirucalli* L. (Avelóz) sobre peso de fígado e baço conforme uso tradicional: um estudo preliminar. *Revista de Biologia e Farmácia*. 2008; 2 (2): 6-11.
18. Jain NCJ. Normal values in blood of laboratory, fur-bearing, and miscellaneous zoo, domestic and wild animals. In: _ Schalm's Veterinary Hematology. 4ª ed. Philadelphia: Lea e Febiger, p.274-349; 1986.
19. Verçosa Júnior D, Melo MM, Dantas-Barros AM, Gomes AM, Silva Junior PG, Lago EP. Quadro hematológico e peso do baço de camundongos com tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com *Agaricus blazei*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2004; 14: 32-34.
20. Pais I, Correia N, Pimentel I, Teles MJ, Neves N, Vasconcelos, J. et al. Effects of Acupuncture on Leucopenia, Neutropenia, NK, and B Cells in Cancer Patients: A Randomized Pilot Study. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 2014:1- 9.
21. Lima RC. Alterações na Resposta Imunológica Pré e Pós Procedimento de Acupuntura 2014. [monografia]. Curso de graduação em Biomedicina, Universidade Católica de Brasília; 2014.
22. Dias MBMC, Barbosa MAQ, Silva VCL, Sá FB, Lima ER. Efeito clínico da acupuntura em cães com distúrbios neurológicos. *Rev. Neurocién*. 2015; 23(4): 562-566.
23. Hollier BG, Evans K, Mani SA. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2009; 14(1): 29-34.
24. Wang L, Wang G, Yang D, Guo X, Xu Y, Feng B. et al. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Molecular Medicine Reports*. 2013; 8(4): 1279-1285.
25. Valadares MC, Carrucha SG, Accorsi W, Queiroz MLS. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. *International Immunopharmacology*. 2006; 6(1): 294- 299.
26. Barbosa CV. Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL. 2009. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas; 2008.