

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia**

**EFEITO DA FRAÇÃO
PROTEOLÍTICA DO LÁTEX DE *Vasconcellea
cundinamarcensis*, P1G10, SOBRE O PROCESSO
INFLAMATÓRIO TUMORAL**

Ariadne Duarte Braga

**Belo Horizonte
2013**

Ariadne Duarte Braga

**EFEITO DA FRAÇÃO
PROTEOLÍTICA DO LÁTEX DE *Vasconcellea
cundinamarcensis*, P1G10, SOBRE O PROCESSO
INFLAMATÓRIO TUMORAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, com ênfase em Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Miriam Teresa Paz Lopes
Co- orientador: Prof. Dr. Carlos E. Salas Bravo

**Belo Horizonte
2013**

*Ao meu pai, minha estrela guia.
Pelo intenso, imenso e eterno amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas.

A minha orientadora, Miriam, pela credibilidade, dedicação e ensinamentos a mim dispensados que tornaram possível a realização deste trabalho. Pra mim, um exemplo de liderança e de profissionalismo.

Ao prof. Salas pelo conhecimento e sugestões.

As professoras Silvia, Virginia e Juliana pelas colaborações, sugestões e ensinamentos.

Ao prof. André Klein pela oportunidade de ingresso na vida acadêmica, pela confiança, dedicação, incentivo e ensinamentos.

Aos meus AMIGOS do LSAT Ana, Dalton, Denise, Fernanda, Kátia, Luciana, Luiz Felipe, Marina, Matheus, Rogério e Verlane muito muito obrigada. Tenho orgulho em fazer parte de uma equipe tão unida, competente, e determinada a alcançar os seus objetivos. Cresci muito, tanto pessoal quanto profissionalmente, com vocês. Obrigada pelas críticas, sugestões e ajudas nos experimentos que fizeram com que este trabalho pudesse se concretizar.

Aos colegas do CEPAPAG, especialmente Fabio, Joaquim, Brisa, Gisele e Luz pela convivência e ajuda durante as etapas de obtenção das amostras.

A minha mãe por estar sempre ao meu lado, por me incentivar e por tomar os meus sonhos como seus. Obrigada pela dedicação integral, pelo amor incondicional, pelos cuidados e carinhos diários.

A Bina e ao Dudu, pela convivência hermanística e por compartilhar de momentos inesquecíveis em minha vida.

Ao meu namorado Rodrigo, pelo amor, carinho e por sempre me incentivar.

Aos Duarte e aos Braga, por estarem prontos para o que der e vier.

As minhas amigas Alessandra, Dani, Debs, Jana, Livis, Mila, Bê, Lud, Gabi Magalhães, Gabi Paixão, Zaninha por não desistirem da nossa amizade, compreenderem as minhas ausências e, por acima de tudo, me incentivarem.

Aos amigos da Pós-graduação: Ana Flávia, Celso, Lindys, Lorena, Mariana, Natália, Onésia, Patrícia, Pollyanna, Rafael e Suzzane, pela convivência e amizade.

As secretarias Cintia e Nilda pela disponibilidade para ajudar.

Ao Rinaldo e Wellington, pelo cuidado com os animais e respeito com nosso trabalho.

A todos os que, de alguma forma, participaram deste trabalho.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES, pelo financiamento.

Muito obrigada.

RESUMO

Estudos prévios mostram que a fração proteolítica P1G10 advinda do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, planta nativa da América do Sul, apresenta atividade antitumoral e antimetastática sobre diferentes modelos murinos, mostrando ser capaz de reduzir os níveis de TNF- α no líquido ascítico de animais portadores do carcinoma de Erlich e a angiogênese em melanoma murino. Neste trabalho temos por objetivo investigar a importância da atividade anti-inflamatória da fração sobre o seu efeito antitumoral. No modelo de carcinoma de mama 4T1 (tumor inflamatório), P1G10 (1, 3 e 5 mg/kg) reduziu a massa dos tumores (51%) e na dose de 1 mg/kg, aumentou o número de leucócitos circulantes (87%), como um reflexo do aumento do número de neutrófilos e de monócitos (140%). Contudo, P1G10 reduziu a adesão de leucócitos a vasos tumorais de pequeno (46%) e grande (52%) calibre. Além disso, a fração reduziu os níveis intratumorais de citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas como MCP-1 (48%), IL-6 (63%), VEGF (47%) e KC/CXCL1 (53%); e aumentou em 157% a atividade de NAG (infiltrado/atividade de macrófagos). Em ensaios *in vitro*, a exposição de macrófagos peritoneais a P1G10 (5 - 50 μ g/mL) por 24 h reduziu, de forma concentração dependente, a produção de VEGF por monoculturas (21 - 73 %) e por co-culturas de macrófagos/células 4T1 (18 - 89%). Sobre a produção de TNF- α a fração apresentou efeito dual. A exposição por 24 h reduziu, em todas as concentrações utilizadas (5 - 50 μ g/mL), os níveis de TNF- α em culturas de macrófagos (28 - 45%), não alterando a produção desta citocina em co-culturas. Já a exposição por 48 h promoveu um aumento nos níveis de TNF- α , apenas, em culturas de macrófagos expostas as concentrações de 25 e 50 μ g/mL (12 e 20%, respectivamente) e, também, quando estes foram co-cultivados com células 4T1. Esse incremento foi constatado pelo aumento das razões entre os níveis de TNF- α e o metabolismo celular (TNF- α /D.O - 35%) ou entre os níveis desta citocina e o número de células em cultura (TNF- α /D.C. - 31 e 123%), não apresentando um aumento bruto dos níveis de TNF- α . Associado ao aumento de TNF- α se observou uma redução (31 e 61%) do número de células tumorais em co-culturas. De acordo com esses resultados, P1G10 mostrou possuir atividade antitumoral sobre o modelo 4T1. Esse efeito está, provavelmente, associado à redução do processo inflamatório e angiogênico tumoral, uma vez que houve redução na adesão de leucócitos a vasos tumorais e dos níveis de citocinas inflamatórias/angiogênicas intratumor e co-culturas. Além disso, a redução da massa tumoral pelo tratamento pode se dar, em parte, pelo aumento da atividade citotóxica de macrófagos sobre células tumorais, como observado em co-culturas celulares.

Palavras-chave: *Caricaceae*, inflamação, macrófagos, atividade antitumoral.

ABSTRACT

Previous studies demonstrated that P1G10, the proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex, species native from South America, has antitumor and antimetastatic activity on different murine models. It acts by reducing TNF- α levels in ascitic fluid of Ehrlich carcinoma and angiogenesis in murine melanoma. The aim of this study was to investigate the importance of the anti-inflammatory activity of P1G10 for the antitumoral effect. In 4T1 breast carcinoma model (inflammatory tumor) P1G10 (1, 3 e 5 mg/kg) reduced the tumor mass (51%) and at the dose of 1 mg/kg, increased the number of peripheral leukocytes (87%), as reflected by 140% increase of neutrophils and monocytes. However, P1G10 reduced leukocyte adhesion to small (46%) and large (52%) tumor vessels. These results were accompanied by decreases of tumor pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines, such as: MPC-1 (48%), IL-6 (63%), VEGF (47%) and KC/CXCL1 (53%); and by an increase in NAG activity (157%). During *in vitro* assays with cultured macrophages, P1G10 (5 - 50 μ g/mL) reduced VEGF production by 21-73 % as well as in macrophage/4T1 co-cultures by 18- 89%, after 24 h exposure. The effect of P1G10 on TNF- α shows a dual effect. A 24-h exposure to P1G10 (5 - 50 μ g/mL) reduced the TNF- α levels in single cultured macrophage (28 - 45 %), do not altering these levels in co-cultures. Exposure to P1G10 for 48 h increased the TNF- α level only in the concentrations of 25 and 50 μ g/mL (12 and 20% respectively), in cultured macrophage or in co-cultures. These augment was measured by an increase in ratio between TNF- α and the metabolism of these cultures (TNF- α /D.O - 35%) or, by an increase in the ratio between the levels of this cytokine and the number of cell in co-culture (TNF- α / D.C - 31 and 123%, 25 and 50 μ g/mL, respectively), do not altering the absolute levels of TNF- α . In co-cultures, the increase in TNF- α was accompanied by reduction 31 and 61% reduction in 4T1 cell number. The results show that P1G10 is able to inhibit tumor growth of tumor 4T1 cells. This ability is probably associated with the reduction of the inflammatory process, supported by reduction of leukocyte adhesion to tumor vessels and by reduction of pró-inflammatory/angiogenic cytokines in cultures and in tumors (*in vivo*). Furthermore, the decrease of tumor mass by P1G10 treatment can be attributed to the enhanced cytotoxic activity of macrophages, observed in co-cultures.

Keywords: *Caricaceae*, inflammation, macrophage, antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> .	18
Figura 2	Complexidade tumoral.	25
Figura 3	Resumo dos mecanismos desencadeados pela inflamação no desenvolvimento tumoral.	34
Figura 4	Imagens esquemáticas que mostram o posicionamento dos animais e exposição dos tumores na técnica de intravital.	55
Figura 5	Desenvolvimento tumoral do carcinoma 4T1 em camundongos BALB/c.	62
Figura 6	Avaliação do efeito antitumoral da fração P1G10 sobre carcinoma 4T1 em camundongos BALB/c.	64
Figura 7	Avaliação do efeito de P1G10 sobre os níveis de leucócitos circulantes em animais portadores e não portadores do tumor 4T1.	67
Figura 8	Avaliação do efeito de P1G10 sobre os níveis dos diferentes tipos de leucócitos circulantes em animais portadores de tumor 4T1.	68
Figura 9	Efeito de P1G10 sobre o rolamento de leucócitos em vasos tumorais.	69
Figura 10	Efeito de P1G10 sobre a adesão de leucócitos a vasos tumorais.	70
Figura 11	Atividade das enzimas MPO e NAG em carcinoma de mama 4T1 de animais tratados com P1G10.	72
Figura 12	Efeito de P1G10 sobre os níveis de citocinas intratumorais.	74
Figura 13	Viabilidade/metabolismo celular de monoculturas e co-culturas de macrófagos expostos à P1G10 por 24 horas.	78
Figura 14	Viabilidade/metabolismo celular de monoculturas e co-culturas de macrófagos expostos à P1G10 por 48 horas.	79
Figura 15	Efeito de P1G10 sobre o número de macrófagos em monocultura e das células em co-culturas.	81
Figura 16	Efeito do meio proveniente da cultura de macrófagos, expostos a P1G10 por 48 horas, sobre a viabilidade/metabolismo de culturas de células 4T1.	83
Figura 17	Produção de VEGF por monoculturas e co-culturas de macrófagos expostos à P1G10 por 24 horas.	85
Figura 18	Produção de TNF- α por monoculturas e co-culturas de macrófagos expostos à P1G10 por 24 horas.	87

Figura 19	Produção de TNF-α por monoculturas e co-culturas de macrófagos expostos à P1G10 por 48 horas.	89
Figura 20	Representação esquemática dos efeitos de P1G10 envolvidos em sua atividade antitumoral sobre o modelo de carcinoma de mama 4T1.	111
Tabela 1	Determinação dos valores de IC-50 para P1G10 sobre viabilidade da linhagem 4T1.	65
Tabela 2	Determinação do valor de IC-50 para P1G10 sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

% (p/v)	percentual peso por volume
% (v/v)	percentual volume por volume
%	porcento
µg	microgramas (10^{-6} g)
µL	microlitros (10^{-6} L)
µm	micrômetro (10^{-6} m)
Céls	células
Cl_t	clearance total
cm	centímetro (10^{-2} m)
col.	Colaboradores
Ctrl	controle
D.C.	densidade celular
D.O.	densidade ótica
e.v.	endovenosa
<i>et al.</i>	e outros (do latim <i>Et alli</i>)
G	força gravitacional ($9,81\text{m. s}^{-2}$)
g	gramas
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenoso
Kel	constante de eliminação
Kg	Kilogramas
Kp	coeficiente de partição

M	concentração molar (moles/L)
Min	minuto
mL	mililitros
mm	milímetro (10^{-3} m)
ng	nanogramas
NK	natural killer
nM	concentração nanomolar (10^{-9} moles/L)
nm	nanômetro (10^{-9} m)
°C	graus Celsius ou centígrados
p.e.	por exemplo
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s.c.	subcutâneo
T$\frac{1}{2}$	Tempo de meia-vida
Th	linfócito T helper
UI	Unidades internacionais
v.o.	via oral
v.s	versus
Vd	volume de distribuição aparente
Vg	vasos tumorais de grande calibre, diâmetro > 70 μ m
Vp	vasos tumorais de pequeno calibre, diâmetro entre 20 – 70 μ m
pg	picogramas

LISTA DE SIGLAS

5-FU	5- fluorouracil
ADCC	citotoxicidade celular anticorpo-dependente, do inglês <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AINES	Anti-inflamatório não-esteroidal
ANOVA	análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
AP-1	Ativador de Proteína-1
ASC	área sob a curva
ATP	Adenosina trifosfato
CCL	quimiocina que apresenta na porção N-terminal dois resíduos de cisteína adjacentes
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COX	ciclooxigenase
CXCL	quimiocina que apresenta na porção N-terminal dois resíduos de cisteína separados por um único aminoácido
DAMPs	padrões moleculares associados ao dano, do inglês <i>damage-associated molecular pattern</i>
DFU	5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil)fenil-2-(5H)-furanona
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	fator de crescimento para endotélio, do inglês <i>endothelial growth factor</i>

FBS	soro fetal bovino, do inglês <i>fetal bovine serum</i>
FGF	fator de crescimento para fibroblasto, do inglês <i>fibroblast growth factor</i>
GRO	oncogene regulador do crescimento, do inglês <i>growth-regulated oncogene</i>
HIF	fator heterodimérico induzível pela hipóxia, do inglês <i>hipoxia inducible factor</i>
HMG	grupo de proteínas de alta mobilidade, do inglês <i>high-mobility group protein</i>
IC-50	concentração inibitória para 50% da população celular
ICAM	molécula de adesão intercelulares, do inglês <i>intercellular adhesion molecule</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	enzima óxido nítrico sintase induzível, do inglês <i>inducible NO synthase</i>
KC	quimiocina derivada de queratinócito, do inglês <i>keratinocyte-derived chemokine</i>
LAL	lisado de amebócitos de <i>Limulus polyphemus</i>
LOXs	lipooxygenases
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	macrófagos classicamente ativados
M2	macrófagos alternativamente ativados
MCP	proteína quimioatraente para monócitos, do inglês <i>monocytes chemoattractant protein</i>
MDSCs	células supressoras de origem mielóide, do inglês <i>myeloid-derived suppressor cells</i>

MEC	matriz extracelular
MHC	complexo maior de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
MMP	metalloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
MTC	citotoxicidade tumoral macrófago-mediada, do inglês <i>macrophage-mediated tumour cytotoxicity</i>
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
NF-κB	fator nuclear – kappa B, do inglês <i>nuclear factor-kappa B</i>
NO	óxido nítrico, do inglês <i>nitric oxide</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	tampão fosfato alcalino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PG	prostaglandina
RNI	intermediários reativos de nitrogênio, do inglês <i>reactive nitrogen intermediates</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
STAT	signal transducer activator of transcription
TAN	neutrófilo associado a tumores, do inglês <i>tumor-associated neutrophil</i>
TGF	fator de crescimento transformante, do inglês <i>transforming growth factor</i>
TNF	fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USA	Estados Unidos da America, do inglês <i>United States of America</i>
VCAM	molécula de adesão de células vasculares, do inglês <i>vascular cell adhesion molecule</i>

VEGF	fator de crescimento para endotélio vascular, do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	receptor para VEGF

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 . <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	18
1.1.1. Caracterização bioquímica, atividades biológica e farmacológica do látex de <i>V. cundinamarcensis</i>	19
1.1.2. Atividades antitumoral e antimetastática de P1G10 e suas subfrações	20
1.2. O câncer	22
1.2.1. Câncer e inflamação	25
<u>Microambiente tumoral inflamatório: infiltrado celular e citocinas</u>	27
<u>Modulação do processo inflamatório tumoral como perspectiva de tratamento do câncer</u>	36
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Material	40
4.1.1. Biológicos	40
4.1.2. Fármacos utilizados	40
4.1.3. Kits e anticorpos	41
4.1.4. Reagentes químicos	41
4.1.5. Materiais Diversos	42
4.1.6. Equipamentos	43
4.1.7. Programas computacionais	44
4.1.8. Soluções	45
4.2. Métodos	50
4.2.1. Obtenção e purificação da fração P1G10	50
4.2.2. Avaliação da atividade antitumoral de P1G10	51
<u>Cultivo da linhagem 4T1</u>	51
<u>Inóculo tumoral e esquema de tratamento</u>	51

<u>Avaliação da variação do volume e da massa tumoral</u>	52
4.2.3. Avaliação do efeito de P1G10 sobre a Inflamação no Ambiente Tumoral	53
<u>Contagem global e diferencial de leucócitos periféricos</u>	53
<u>Análise do rolamento e da adesão de leucócitos em vasos tumorais</u>	54
<u>Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)</u>	55
<u>Avaliação da atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)</u>	56
<u>Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas</u>	56
4.2.4. Determinação do valor de IC-50 para P1G10 sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais e da linhagem 4T1	57
<u>Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais</u>	57
<u>Avaliação da viabilidade/metabolismo celular pela metabolização do sal de resazurina</u>	58
4.2.5. Avaliação do efeito de P1G10 sobre cultura de macrófagos e co-culturas	59
<u>Exposição dos macrófagos a P1G10 e coleta do sobrenadante</u>	59
<u>Confecção de co-culturas e coleta do sobrenadante</u>	59
<u>Avaliação da viabilidade/metabolismo de culturas de macrófagos e de co-culturas</u>	60
<u>Contagem do número de células em cultura</u>	60
4.3. Análise Estatística	60
5. RESULTADOS	61
5.1. Desenvolvimento do tumor 4T1 no flanco de camundongos BALB/c fêmeas	61
5.2. Efeito antitumoral de P1G10 sobre o modelo 4T1	62
5.3. Citotoxicidade de P1G10 sobre a linhagem tumoral 4T1	65
5.4. Efeito de P1G10 sobre a inflamação no ambiente tumoral de carcinoma 4T1	65
<u>Número de leucócitos periféricos</u>	65
<u>Rolamento e adesão de leucócitos a vasos tumorais</u>	68
<u>Atividade de Mieloperoxidase (MPO) e de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)</u>	71
<u>Modulação dos níveis de citocinas intratumorais</u>	72
5.5. Efeitos de P1G10 sobre culturas de macrófagos e co-culturas	75
<u>Citotoxicidade sobre cultura de macrófagos peritoneais</u>	75
<u>Efeito sobre a viabilidade/metabolismo de macrófagos e co-culturas</u>	76

<u>Efeito sobre os níveis de VEGF e TNF- α em culturas celulares</u>	83
6. DISCUSSÃO	90
6.1. Desenvolvimento do tumor 4T1	90
6.2. Atividade antitumoral	92
6.3. Atividade de P1G10 sobre a inflamação tumoral	97
6.3.1. Efeito de P1G10 sobre a população leucocitária circulante e tumoral	97
6.3.2. Modulação dos níveis de citocinas como mediadores da ação de P1G10	103
7. CONCLUSÃO	111
8. PERSPECTIVAS	112
REFERÊNCIAS	113
APÊNDICE	
APÊNDICE A	129
APÊNDICE B	130
ANEXO	
ANEXO A	131
ANEXO B	132
ANEXO C	133

1. INTRODUÇÃO

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a caracterização bioquímica e farmacológica de frações obtidas do látex da espécie *Vasconcellea cundinamarcensis* nos Laboratórios de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia e de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ambos do ICB, UFMG.

1.1. A espécie *Vasconcellea cundinamarcensis*

Essa espécie, denominada até 2002 como *Carica candamarcensis*, trata-se de uma planta nativa do oeste da América do Sul, que se apresenta do Panamá até o Chile, sendo encontrada predominantemente em altitudes superiores a 1000 metros (região Andina) (WALRAEVENS *et al.*, 1999).

Na figura 1 estão ilustradas partes da planta, que se caracteriza por apresentar um tronco grosso, geralmente ramificado, medindo até 10 m de altura, e conter uma coroa compacta de folhas na sua parte terminal ou nas extremidades das ramificações. O fruto é elipsóide, de coloração amarelada quando maduro (Figura 1B), com cinco depressões largas longitudinais, mede de 5 a 15 cm de comprimento, sendo sua polpa delgada, aquosa, aromática e comestível somente após o cozimento (LEON, 1987).

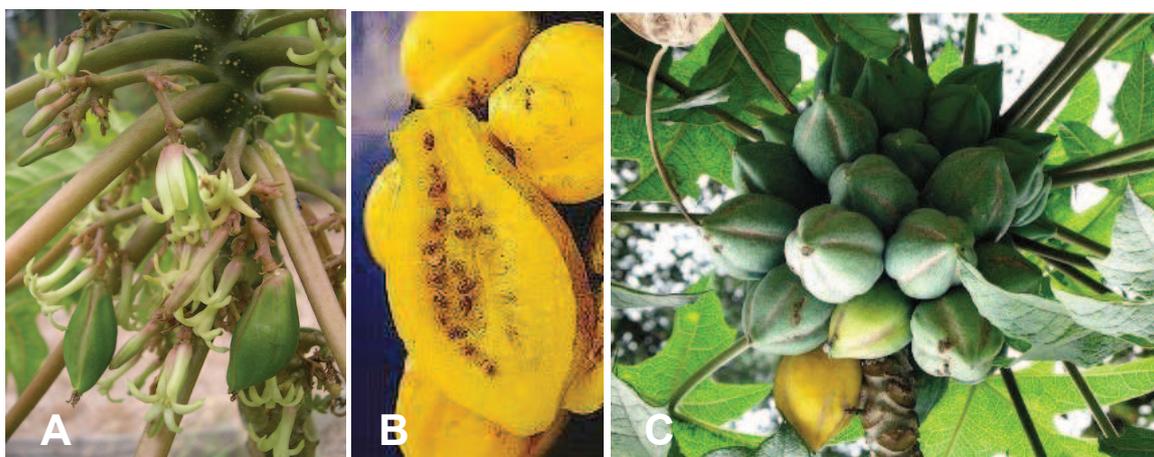


FIGURA1: *Vasconcellea cundinamarcensis*. A – Inflorescências; B – Fruto maduro; C – Frutos imaturos. Fontes: ecocrop.fao.org e fruitipedia.com - acesso em: 06/01/2013

1.1.1. Caracterização bioquímica, atividades biológicas e farmacológicas do látex de *V. cundinamarzensis*

O látex extraído de *V. cundinamarzensis* é rico em carboidratos, vitaminas, sais minerais e peptídeos de baixo peso molecular, além de cisteíno proteases de alta atividade proteolítica (BAEZA *et al.*, 1990; BRAVO *et al.*, 1994). Através de separação cromatográfica do látex em coluna Sephadex G10, são obtidos 2 picos bem definidos, denominados P1G10 e P2G10, ambos ricos em cisteíno proteases. No entanto, a atividade proteolítica é mais pronunciada na fração P1G10 (BRAVO *et al.*, 1994; GRAVINA *et al.*, 1995).

Inicialmente, descrevemos a atividade mitogênica, *in vitro*, de frações de P1G10 obtidas por cromatografia de troca iônica (GOMES *et al.*, 2005). Estudos *in vivo* demonstraram uma interessante capacidade angiogênica (MELLO *et al.*, 2006) e cicatrizante de P1G10, dose dependente, em modelos murinos de dermoabrasões (MELLO *et al.*, 2006), de queimaduras (GOMES *et al.*, 2010) e de lesões excisionais (FREITAS, 2010). A atividade cicatrizante pode ser justificada pelas capacidades mitogênica e angiogênica observadas, além da atividade proteolítica, que supostamente contribui para o debridamento da lesão (MELLO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2010). Essas atividades são descritas como importantes no processo de cicatrização de feridas (CLARK, 1985; FOLKMAN & SHING, 1992). Estudos subsequentes evidenciaram as atividades protetora e cicatrizante gástrica da fração em modelos de lesões ulcerosas agudas, induzidas pela indometacina, e crônicas, induzidas pelo ácido acético (MELLO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009). Adicionalmente às atividades descritas, P1G10 mostrou modular processos inflamatórios, pois apresentou atividade antiedematogênica nas doses de 5; 10 e 20 mg/kg, comparável ou superior a de indometacina (2 mg/kg), e inibidora do recrutamento leucocitário em níveis semelhantes a dexametasona (0,5 mg/kg), ambas atividades em modelos de inflamação induzidos por carragenina (CHRISTIANO, 2008).

Posteriormente, estudos farmacocinéticos foram realizados utilizando P1G10 marcada com tecnécio (^{99m}Tc) em camundongos Swiss, na dose de 1 mg/kg, por vias endovenosa (e.v.), subcutânea (s.c.) ou por via oral (v.o.). As maiores relações de áreas sob a curva (ASC) entre órgãos e sangue (coeficiente de partição – kp) após administração por vias e.v. e s.c., foram observadas nos órgãos relacionados à eliminação de fármacos. Essa observação corrobora os altos valores da constante de eliminação ($k_{el} = 0,22\%$ dose/mL/h), do volume de distribuição aparente ($V_d = 0,082$ mg x mL/% dose x kg) e do clearance total ($Cl_t = 0,092$ mg x mL/% dose x h x kg), bem como o baixo valor do tempo de meia-vida ($T_{1/2} = 190$ min). Por via s.c. a biodisponibilidade foi de aproximadamente 100% (111%). Já para a via v.o., as maiores taxas de kp foram encontradas nos órgãos do trato gastrointestinal, corroborando a baixa biodisponibilidade por essa via (8,3%) (LEMOS, 2009). Trabalhos pré-clínicos de toxicologia aguda também foram realizados em ratos e mostraram que, para as vias intraperitoneais (i.p.) e s.c. apenas altas doses (acima de 50 mg/kg) causaram morte dos animais em cerca de 30 minutos (VILLALBA *et al.*, 2010). Em estudos toxicológicos subcrônicos, utilizando administração oral, só se observou o aparecimento de sinais tóxicos em ratos para a dose de 300 mg/kg (SALAS *et al.*, 2010). Esses resultados demonstram a baixa toxicidade de P1G10 por via sistêmica, permitindo a execução de estudos pré-clínicos e clínicos com segurança. Nesse sentido, estudos clínicos de fase I para a atividade cicatrizante já foram realizados e revelaram a inocuidade da fração quando utilizada em peles íntegras de voluntários saudáveis (GOMES, 2009). Os estudos de fase clínica II estão em andamento e visam avaliar a eficácia cicatrizante da fração em pacientes portadores de lesões cutâneas.

1.1.2. Atividades antitumoral e antimetastática de P1G10 e suas subfrações

Há algum tempo, estudos clínicos sobre a utilização de proteases na Oncologia vêm sendo realizados e comprovando a sua importância como fármaco principal ou adjuvante. Misturas enzimáticas contendo papaína, tripsina e quimiotripsina demonstraram ter eficácia clínica atuando como supressores tumorigênicos, reduzindo disseminação metastática e aumentando o tempo de

sobrevida, ou mesmo aliviando os efeitos adversos gerados pelo tratamento convencional e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (LEIPNER & SALLER, 2000). A administração *i.p* de bromelina, cisteína proteases advinda de *Ananas comosus*, promoveu a remissão de tumores murinos como leucemia (P-388), sarcoma (S-37), carcinoma ascítico de Ehrlich e carcinoma pulmonar de Lewis (BÁEZ *et al.*, 2007). Posteriormente, autores sugeriram que tal protease pudesse exercer sua atividade antitumoral por interferir, também no microambiente inflamatório, através da modulação da expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) (KALRA *et al.*, 2008, BHUI *et al.*, 2009), de citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α - Tumor Necrosis factor- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e da migração de células inflamatórias para o estroma (Rev. CHOBOTOVA *et al.*, 2010).

Semelhantemente a essas proteases, as contidas na fração P1G10 mostraram atividade antitumoral e antimetastática em diferentes modelos animais. Na dose de 5 mg/kg, P1G10 apresentou redução de 89% da massa tumoral em relação ao grupo controle em modelo de melanoma murino B16F1. No modelo metastático desse tumor (B16F10), foi observada redução de 82% no número de pontos metastáticos em relação ao controle. Juntamente às atividades descritas, foi observada uma atividade antiangiogênica para a fração, uma vez que houve a redução da quantidade de hemoglobina e dos níveis de fator de crescimento para endotélio vascular (VEGF- vascular endothelial growth factor) nos tumores de animais tratados com P1G10 (5 mg/kg) em relação ao grupo controle (LOPES *et al.*, 2010).

Já foi relatada, também, a ação antitumoral de P1G10 sobre o modelo de carcinoma de Ehrlich tanto sólido (3 mg/kg) quanto ascítico (5 mg/kg), com redução de cerca de 68% e 40% da massa tumoral e do número de células tumorais, respectivamente. No modelo ascítico o tratamento com P1G10 promoveu aumento significativo dos níveis da fração ativa do fator TGF- β (transforming growth factor- beta) e uma redução dos níveis de TNF- α no tumor, sendo observado o aumento dos leucócitos circulantes, redução das células da medula e aumento da proliferação de linfócitos esplênicos. Também, o tratamento de camundongos com a dose de 3 e de 5 mg/kg, prévio ao inóculo

celular tumoral, mostrou ser capaz de inibir (em até 25%) o crescimento do carcinoma ascítico (VIANA, 2010).

Subfrações obtidas pela separação cromatográfica de P1G10 em coluna CM-Sephadex C-25, CMS-1 e CMS-2, foram testadas quanto as suas atividades sobre a formação de metástases em modelos murinos de melanoma e de cólon. Apenas CMS-2 foi capaz de inibir, em torno de 75%, a formação de pontos metastáticos em ambos modelos, efeitos que foram atribuídos a atividade da subfração em induzir a apoptose de células tumorais, *in vitro* (LOPES *et al*, 2010).

Mediante relatos da atividade antitumoral e antimetastática da fração P1G10 se reconhece a necessidade de estudos mais detalhados dos mecanismos pelos quais estes efeitos ocorrem. Para isso, conhecimentos teóricos sobre a formação e o desenvolvimento tumoral; assim como sobre componentes que possam nele influenciar, são fundamentais. A seguir, serão feitas considerações nesse sentido.

1.2. O câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que resultam de um crescimento desordenado de clones celulares, que invadem tecidos e órgãos, podendo acometer diferentes regiões do corpo (metástase). Várias evidências indicam que a tumorigênese em humanos é um processo multifatorial, sendo o reflexo de alterações genéticas (mutações) que levam a progressiva transformação de células normais em células de alta malignidade (HANAHAN & WEINBERG, 2000). O conceito amplamente aceito, atualmente, é de que o câncer se caracteriza como uma doença que pode ser prevenida. Apenas 5 a 10% de todos os casos de câncer são causados por heranças de genes alterados ou por mutações somáticas, enquanto que a grande maioria dos casos (90 a 95%) tem sido associada ao estilo de vida e a exposição a fatores ambientais (Rev. AGGARWAL *et al.*, 2009). As mutações genéticas e as mutações causadas pela exposição ao tabagismo; etilismo; sedentarismo; alimentação e obesidade (INCA, 2012), culminam na ativação de proto-

oncogenes (p.e: Ras ou Myc) ou na inativação de genes supressores de tumores (p.e.: p53 ou Rb) (Rev. HANAHAN & WEINBERG, 2000; Rev. AGGARWAL *et al.*, 2009). Tais mutações dão origem a um vasto catálogo genotípico de células tumorais, que resultam em seis alterações fundamentais da fisiologia celular: a proliferação auto-suficiente; insensibilidade a sinais anti-proliferativos; evasão ao processo de apoptose; potencial de replicação ilimitado; manutenção da angiogênese, da invasão e metástase, que em conjunto caracterizam o crescimento maligno (Rev. HANAHAN & WEINBERG, 2000).

O desenvolvimento tumoral pode ser dividido, funcionalmente, em três fases: a iniciação, a promoção e a progressão tumoral. A fase de iniciação, como citado acima, é caracterizada por mudanças genéticas, como mutações pontuais, deleções e amplificações gênicas, e rearranjos cromossômicos que levam a mudanças celulares irreversíveis. A progressão do ciclo celular é regulada, em parte, por uma série de proteínas como as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas, principalmente nas transições de fases, tanto de G1 (fase de preparo para a síntese de ácido desoxiribonucléico (DNA- Deoxyribonucleic acid)) para S (fase de síntese de DNA), onde, caso haja alguma irregularidade, o gene p53 desencadeia o processo de apoptose; quanto de G2 (intervalo entre a fase S e a mitose) para a mitose, onde os mecanismos não estão bem elucidados. Desta forma, anormalidades nos genes da transcrição dessas proteínas regulatórias alteram o ciclo e permitem que células modificadas escapem ao processo de apoptose (Rev. NURSE *et al.*, 1998; Rev. GUIMARÃES & LINDEN, 2004).

A promoção tumoral é marcada pela sobrevivência e expansão clonal de células iniciadas. Assim, com a expansão do tumor, ocorre o aumento da distância de difusão do oxigênio e nutrientes para determinadas áreas do mesmo. A hipóxia (diminuição de níveis de oxigênio nos tecidos) ativa o fator heterodimérico induzível pela hipóxia (HIF – Hipoxia inducible factor) que induz a transcrição de genes que, conjuntamente com outras proteínas como a angiopoetina-2 e o VEGF estimulam a formação de novos vasos (NOR *et al.*, 1999; BRAHIMI & POUYSSÉGUR, 2006). A angiogênese é um processo

complexo, essencial para o crescimento tumoral que garante o estabelecimento do oxigênio e da homeostase nutricional, em que estão envolvidos sinais tumorais para a degradação da matriz extracelular (MEC), proliferação e migração de células endoteliais e a diferenciação destas em capilares funcionais (BINGLE *et al.*, 2002).

Simultaneamente aos eventos angiogênicos, outros de degradação e de remodelamento da MEC ocorrem para que o tumor e a rede vascular continuem se desenvolvendo, eventos que resultam em invasão de tecidos adjacentes e distantes (metástase) caracterizam a etapa de progressão tumoral (Rev. RAKOFF-NAHOUM, 2006). Esses processos ocorrem através da ação das proteases endógenas que são produzidas pelas células do estroma e, principalmente, pelas tumorais. Existe uma grande variedade dessas enzimas, são elas as metalo, aspártico, cisteíno e serino proteases. As metaloproteases são ativadas em pH ácido (entre 3,5 e 5,5) e, portanto, suas expressões estão aumentadas em ambientes onde há hipóxia, como o tumoral (NAGASE & WOESSER, 1999).

Contudo, apesar das propriedades autonômicas de células tumorais serem necessárias para a tumorigênese, estas não são suficientes. Estudos realizados nas últimas duas décadas têm solidificado o conceito de que o desenvolvimento tumoral e de malignidade é o resultado de um processo que envolve a presença de células tumorais e de células não-tumorais, compondo, assim, o tumor heterocelular (Rev. RAKOFF-NAHOUM, 2006).

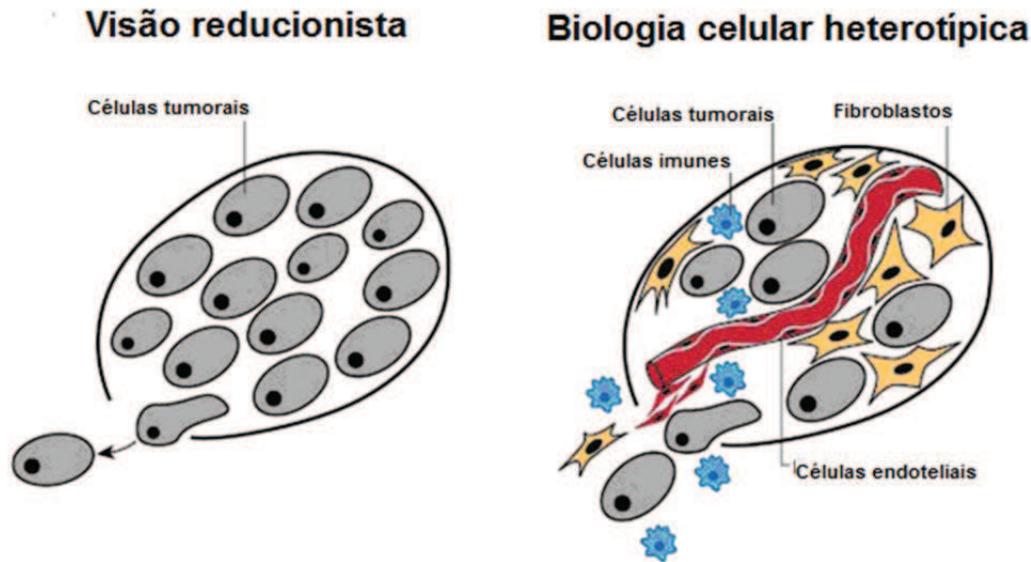


Figura 2 : Complexidade tumoral(Adaptado de Hanahan and Weinberg, 2000).

A idéia mais atual é que o tumor seja constituído por células transformadas e por outras, como as células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e as células do sistema imune. A interação entre esses tipos celulares compõe um microambiente que pode favorecer o desenvolvimento tumoral já que possui influência sobre a proliferação, angiogênese, invasão e metástase tumoral (Rev. BALKWILL & MANTOVANI, 2001; Rev. BEN-BARUCH, 2002).

1.2.1. Câncer e inflamação

A primeira descrição da presença de leucócitos em tumores humanos foi feita por Virchow em 1863 instigado pelo aparecimento de tumores em locais de inflamação crônica prévia (Rev. BALKWILL & MANTOVANI, 2001). Estudos posteriores mostraram as associações entre o abuso de álcool, que leva a inflamação no fígado e pâncreas, e a incidência de câncer nos respectivos órgãos. O hábito de fumar e as exposições ao asbesto e sílica estão associados a inflamação dos pulmões e aparecimento de carcinoma pulmonar, assim como, doenças inflamatórias do intestino estão relacionadas ao desenvolvimento de carcinomas de cólon. Tais observações levaram à hipótese de que a inflamação crônica estaria envolvida em uma ou mais fases do desenvolvimento tumoral (Rev. LIN & KARIN, 2007).

Células inflamatórias, ativadas e recrutadas pelo processo inflamatório desencadeado por tais fatores ambientais, servem como fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS-reactive oxygen species) e de intermediários reativos de nitrogênio (RNI-reactive nitrogen intermediates) os quais são capazes de induzir danos a molécula de DNA e a instabilidade genômica. As células inflamatórias produzem e liberam citocinas (p.e: TNF- α) capazes de induzir o acúmulo de ROS em células epiteliais próximas. A mutagênese induzida pela inflamação pode, também, resultar de inativações ou repressões de genes responsáveis pelo reparo do DNA, isto ocorreria pela inativação oxidativa direta de ROS sobre enzimas responsáveis pela maquinaria de reparo gênico. Uma vez que o sistema de reparo da molécula de DNA se encontra falho, a mutagênese induzida/iniciada pela inflamação é aprimorada e vários importantes genes supressores de tumor podem ser inativados (Rev. COLOTTA *et al.*, 2009).

Pelo menos 20 % de todos os casos de câncer surgem em associação a infecções e inflamação crônica, e mesmo aqueles tipos de câncer que não se desenvolvem como consequência deste tipo de inflamação exibem extenso infiltrado inflamatório e altos níveis de expressão de citocinas em seu microambiente tumoral. Nesse sentido, a maioria dos tumores sólidos, se não todos, desencadeia uma resposta inflamatória intrínseca ao desenvolvimento tumoral (Rev. GRIVENNIKOV *et al.*, 2010), que independe da presença de um agente inflamatório iniciador. Durante a fase de iniciação tumoral, os danos ocorridos à molécula de DNA contribuem para a morte necrótica de células iniciadas, resultando em reação inflamatória e, posteriormente, em tumorigênese (SAKURAI *et al.*, 2008). Esse tipo de inflamação dá origem a um microambiente pró-tumorigênico, que além de aumentar as taxas de mutações promovem a proliferação e a invasividade de células alteradas. Com isso, a inflamação presente durante as fases de promoção/progressão tumoral é considerada peculiar, será apresentada a seguir, e se caracteriza pela presença de leucócitos; de polipeptídeos mensageiros da inflamação (citocinas e quimiocinas); de remodelamento tissular e angiogênese (COLOTTA *et al.*, 2009).

Microambiente tumoral inflamatório: infiltrado celular e citocinas

Para entendimento do papel da inflamação no processo de desenvolvimento tumoral, conceitos e funções fisiológicas básicas dos mediadores e de células inflamatórias serão, primeiramente, abordados.

Organismos multicelulares complexos mantêm a homeostase ao nível tecidual via a secreção de uma variedade de mediadores protéicos de baixo peso molecular, coletivamente, denominados de citocinas. Esses mediadores incluem TNF- α , interleucinas (IL), interferons (IFN), fatores estimulantes de colônia, quimiocinas, fatores angiogênicos e fatores de crescimento. Diferentemente de hormônios endócrinos clássicos, as citocinas agem de forma autócrina, parácrina e/ou justácrina sobre uma variedade de tipos celulares, desde células-tronco a células totalmente diferenciadas. Citocinas realizam suas funções pela ligação a receptores transmembranares acoplados a proteína G, e por vias de sinalização intracelulares. Tais proteínas exercem uma variedade de propriedades celulares incluindo: ativação (sobrevivência, crescimento e diferenciação), morte (apoptose) e motilidade celular, inflamação e imunidade (SZLOSAREK & BALKWILL, 2005).

Quimiocinas, citocinas quimioatraentes para leucócitos, são divididas estruturalmente em quatro subgrupos baseados na composição de resíduos de cisteína presentes em suas porções amino-terminal. Outra classificação, porém, menos criteriosa divide funcionalmente as quimiocinas em dois grandes subgrupos: inflamatórias e homeostáticas. As quimiocinas inflamatórias promovem a infiltração de leucócitos para os locais de inflamação e sua expressão é induzida, principalmente, via citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, quimiocinas homeostáticas são constitutivamente expressas e regulam a direta migração de leucócitos em processos de hematopoiese e no desenvolvimento de órgãos linfóides (BEN-BARUCH, 2003).

Outros mediadores de suma importância envolvidos no desenvolvimento de uma resposta inflamatória são as prostaglandinas. Essas são produzidas pelas enzimas ciclooxigenases (COXs) transcritas por dois distintos genes. COX-1 é

expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, enquanto que, COX-2 é rapidamente induzida no local da inflamação, apresentando atividades associadas a regulação do crescimento celular e remodelagem tecidual. COX-2 é produzida por células imunes, fibroblastos, osteoblastos, células sinoviais e endoteliais, quando presentes em um tecido inflamado (Rev. GASPARINI *et al.*, 2003)

Assim, citocinas; quimiocinas; fatores de crescimento e produtos originados da degradação de tecidos lesionados são capazes de recrutar leucócitos para os locais de injúria; inflamação ou para locais que apresentem estímulo patogênico. Os leucócitos são atraídos pela produção local desses mediadores, e juntos compõem um sistema de sinalização que envolve reconhecimento de estados patológicos, organização de resposta celular adequada e supressão desta resposta, uma vez que, a injúria seja eliminada e a lesão reparada (LIN & POLLARD, 2004).

Na presença do tumor se acredita que citocinas e fatores quimiotáticos, semelhantes aos produzidos em processos inflamatórios fisiológicos, sejam responsáveis pelo recrutamento de leucócitos (RIBATTI *et al.*, 2001) porém, durante a progressão neoplásica os controles normais que regulam a inflamação estão violados, fato que caracteriza o tumor como uma ferida que não se cura (DVORAK, 1986). Dessa forma, células inflamatórias, citocinas e quimiocinas, quando presentes em um microambiente tumoral, são capazes de modular as interações entre as células tumorais e o microambiente no qual se encontram. As funções de células inflamatórias e de mediadores como citocinas e quimiocinas no contexto tumoral serão descritas a seguir, fornecendo evidências das atividades destes elementos sobre o desenvolvimento e a progressão tumoral.

Estudos genéticos e experimentais em animais confirmam que citocinas desempenham um papel fundamental na associação entre a inflamação crônica e câncer. Nesse sentido, várias citocinas são descritas como sendo fatores de crescimento, ao induzirem a proliferação de células pré-malignas, permitirem a sobrevivência destas células, ao apresentarem papel supressor

da apoptose; além de serem capazes de induzir a angiogênese; a invasão e a formação de metástases (Rev. GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). Alguns oncogenes ativados em células tumorais (p.e.: Ras, Myc), além de promoverem a proliferação celular autônoma, induzem a transcrição de programas sinalizadores que promovem o remodelamento do microambiente tumoral pela expressão de citocinas e quimiocinas, e pelo recrutamento de leucócitos que em conjunto promovem o crescimento do tumor (Rev. GRIVENNIKOV *et al.*, 2010).

Sobretudo quimiocinas que são classicamente definidas como “inflamatórias” tem mostrado possuir papel em vários aspectos do processo de malignidade (BEN-BARUCH, 2003). Quimiocinas fornecem o estímulo direcionado para o movimento de leucócitos, também, para tumores em desenvolvimento. Células tumorais e estromais ativadas secretam citocinas e quimiocinas inflamatórias (p.e.: VEGF, IL-6, IL-8, proteína quimioatratante para monócitos (MCP-1-monocyte chemoattractant protein), TNF- α , IL-1 β) que agem, tanto diretamente, quanto indiretamente na estimulação do endotélio vascular e no recrutamento de leucócitos para o tecido tumoral (Rev. BINGLE *et al.*, 2002). Quimiocinas inflamatórias (p.e.: IL-6 e TNF- α) podem agir diretamente, também, sobre células tumorais via receptores específicos para quimiocinas, expressos por estas células, caracterizando um mecanismo autócrino pró-tumorigênico (Rev. BEN-BARUCH, 2003).

Citocinas e quimiocinas liberadas por células tumorais são capazes de ativar os leucócitos associados a tumores de forma a aumentar suas propriedades pró-tumorigênicas. Esses passam a expressar fatores de transcrição ativados, como fator nuclear- kapa B (NF- κ B - nuclear factor- κ B) e transdutor de sinal e ativador de transcrição3 (STAT3 - signal transducer and activator of transcription-3), liberam uma variedade de citocinas (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-22, IL-23, IL-10, IL-12p35 e p40, IFN γ); fatores angiogênicos (p.e.: VEGF, IL-8); mitogênicos (p.e.: fator de crescimento para endotélio (EGF- endothelial growth factor)); enzimas proteolíticas (p.e.: metalloproteinases- MMPs) e fatores quimiotáticos. Todos esses mediadores realizam e controlam a comunicação entre células tumorais e imunes/inflamatórias, e são responsáveis

pela inflamação que promove o crescimento tumoral (Rev. GRIVENNIKOV & KARIN, 2010).

Nesse sentido, citocinas inflamatórias (IL-1, TNF, IL-6, IL-23) produzidas por células imunes presentes no tecido tumoral, ativam fatores de transcrição oncogênicos (NF- κ B, STAT, SMAD e proteína ativadora -1 (AP-1 – activatorprotein-1) em células tumorais, e induzem a ativação de genes (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, c-FLIP e survivina) promotores da sobrevivência celular (Rev. KARIN, 2006; Rev. YU *et al.*, 2007), da proliferação (ciclina D1, D2 e B; c-Myc) e do crescimento tumoral (Rev. YU *et al.*, 2007; BOLLRATH *et al.*, 2009). Além disso, induzem a produção de moléculas envolvidas na angiogênese (VEGFs, TNF- α e IL-8), na invasividade e na motilidade (ICAM-1; VCAM-1), e promovem a produção de mais citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, além de induzirem a expressão de MMPs, de COX-2 e de lipooxygenases (LOXs) (GUADAGNI *et al.*, 2009). Tal processo se caracteriza como o principal mecanismo de promoção tumoral desencadeado pela inflamação. Esses fatores de transcrição agem como oncogenes não-clássicos, cuja ativação em células malignas se deve, raramente, a mutações diretas, e por isso dependem de sinais produzidos por outras células para a sua ativação (Rev. YU *et al.*, 2009; GRIVENNIKOV & KARIN, 2010).

A enzima COX-2 também apresenta papel importante na tumorigênese, sendo super-expressa e secretada por 40 a 80% das células tumorais (Rev. TAKETO, 1998 parte I e parte II). Essa super-expressão é induzida por estímulos como os fatores de crescimento (EGF, o fator de crescimento para fibroblasto (fibroblast growth factor-FGF) e VEGF) (Rev. SCHNEIDER & MILLER, 2005) e de citocinas (TNF- α e IL-1 β) (LEE *et al.*, 2010), e resulta na indução de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, E-caderina, MMPs, fatores angiogênicos e, também, na migração de leucócitos para o local do tumor (SURH *et al.*, 2001; ARUN *et al.*, 2001; TSUJI & TSUJI, 2004).

Dados clínicos, sobre diferentes tipos de tumores sólidos, descrevem a relação entre a alta densidade de leucócitos infiltrados e o mau prognóstico tumoral (Rev. COUSSENS & WERB, 2001; 2002). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram

que leucócitos no sangue circulante são recrutados, para os locais de injúria, infecção ou inflamação, por uma série de sobreposições de passos seqüenciais mediados por moléculas denominadas selectinas e integrinas. As selectinas são moléculas chave que iniciam o evento de captura leucocitária e medeiam ligações de baixa afinidade e de curta duração com o endotélio, dando origem ao movimento de rolamento leucocitário. L-selectinas são expressas pela maioria dos leucócitos circulantes, e se ligam a sialoglicoproteínas sulfatadas e fucosiladas presentes no endotélio. Enquanto que, P- e E-selectinas são induzidas e expressas em células endoteliais e se ligam a glicoproteínas expressas por leucócitos. As integrinas são expressas por leucócitos e estão relacionadas a um processo de adesão firme, quando os leucócitos atravessam a membrana basal, subjacente aos vasos sanguíneos, emigram através da MEC para outros tecidos. As integrinas se ligam a moléculas presentes tanto na MEC, quanto no endotélio, como por exemplo molécula de adesão intercelulares (ICAMs- intercellular adhesion molecule) e molécula de adesão de células vasculares (VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule), com consequente ativação leucocitária (Rev. LUSTER *et al.*, 2005). Como resultado do infiltrado celular, o microambiente tumoral contém células do sistema imune inato, incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células dendríticas e células “Natural Killer” (NK), e do sistema adaptativo como linfócitos T e B, em adição a células tumorais e seu estroma (Rev. DE VISSER *et al.*, 2006). Contudo, macrófagos e linfócitos são as células imunes mais freqüentemente encontradas nos microambientes tumorais (Rev. LIN & KARIN, 2007).

Macrófagos associados a tumores (TAMs- tumor associated macrophages) respondem aos sinais do microambiente de forma a sofrer polarizações funcionais e genéticas. Podem ser classificados fenotipicamente como M1 (classicamente ativados) e M2 (alternativamente ativados) decorrente de plasticidade genética, sendo o fenótipo definido pela expressão de classes de genes, ao contrário de ocorrer por vias de diferenciação determinísticas ou escolha de linhagens. Os M1, ativados por IFN- γ ou por produtos bacterianos (LPS- lipopolissacarídeos), expressam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23), moléculas pertencentes ao complexo de histocompatibilidade (MHC- major histocompatibility complex) e

óxido nítrico sintase induzível (iNOS); e por isso, são capazes de eliminar patógenos e células tumorais, e de promover uma resposta imune anti-tumoral. Contudo, a maior parte das citocinas promotoras do crescimento tumoral são produzidas por esses macrófagos (Rev. SICA *et al.*, 2008).

Os macrófagos, geralmente, não apresentam atividade tumoricida sobre células tumorais, exceto quando ativados. Uma vez ativados, a citotoxicidade direta ou indireta, via a secreção de mediadores que estimulam a atividade anti-tumoral de outras células, podem ser exercidas. A citotoxicidade direta pode ser ainda, subdividida em citotoxicidade tumoral macrófago-mediada (macrophage-mediated tumour cytotoxicity - MTC) e citotoxicidade celular anticorpo-dependente (antibody-dependent cellular cytotoxicity – ADCC). MTC envolve a liberação de fatores de lise, por macrófagos, que resulta na morte de células neoplásicas (Rev. BINGLE *et al.*, 2002). Esse processo se caracteriza como lento, podendo levar até 3 dias para completa realização, e inclui a secreção de fatores tóxicos como o TNF- α (URBAN *et al.*, 1986), serino-proteases, RNI (p.e.: óxido nítrico) e ROS (HIBBS *et al.*, 1988; KELLER *et al.*, 1990). ADCC é dependente da presença de anticorpos ligados a células tumorais e assim, da expressão de antígenos de superfície classificados como não-próprios ou aberrantes, porém o mecanismo de morte, embora rápido, é semelhante ao MTC.

Apesar de ser parte integrante do sistema imune do hospedeiro, na maioria dos pacientes, macrófagos parecem fazer pouco na montagem de uma resposta imune eficaz contra o tumor (MANTOVANI *et al.*, 2008). Bingle e col. (2002), sugerem que isso seja devido a expressão insuficiente de antígenos imunogênicos por células tumorais capazes de estimular uma resposta imune eficaz e/ou que sinais supressivos promovidos pelo tumor possam suprimir a atividade tumoricida de TAMs e educá-los para que promovam o crescimento tumoral. Dessa forma, as características supressivas, de inflamação crônica e de hipóxia dão origem a um microambiente tumoral que favorece o estabelecimento do fenótipo M2 por TAMs. Esses são induzidos *in vitro* pela exposição a IL-4, IL-10 e IL-13; expressam baixos níveis de MHC de classe II, de IL-12, de ROS e RNI importantes para a atividade tumoricida, apresentam

um aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias e/ou imunossupressivas como IL-4, IL-10, TGF- β e PGE2. Além disso, são capazes de eliminar debris, pela expressão de receptores “scavenger”, de promover a proliferação celular, pela produção de fatores de crescimento e de produtos da via da arginase (ornitina e poliaminas), o remodelamento tissular, a angiogênese e metástase tumoral (Rev. BINGLE *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2008)

Há outras células imunes capazes de afetar a tumorigênese. Neutrófilos possuem funções pró e anti-tumorais, dependendo do seu estado de diferenciação e da presença de TGF- β (FRIDLENDER *et al.*, 2009). Alguns estudos mostram que neutrófilos associados a tumores estão envolvidos na angiogênese tumoral pela produção de fatores como VEGF e IL-8, proteases como as MMPs e elastases (Rev. LIN & POLLARD, 2004).

Linfócitos T citotóxicos ou CD8⁺ constituem um subgrupo de linfócitos capazes de induzir a morte, por apoptose, de células tumorais e de células infectadas ou que apresentem disfunções somáticas mediante ativação pela liberação de várias citocinas (p.e.: perforinas e granzima B). De acordo com as características fenotípicas e funções, os linfócitos T denominados de “helper” (Th) ou CD4⁺ podem ser divididos em dois subtipos. O tipo 1 (Th1), induzido pela presença de IL-12, promove suporte para linfócitos T CD8, juntamente com outras células, por se multiplicarem e induzirem a secreção de INF- γ mediante resposta imune antígeno-específica iniciada. Apesar de não possuir atividade antitumoral direta, pela ausência de propriedades citotóxicas e de fagocitose, os linfócitos Th1 desempenham um papel crucial no início e na ativação da resposta imune antitumoral. Em contraste, o tipo 2 (Th2), induzido pela presença de IL-4, secreta citocinas que induzem a neutralização da produção de anticorpos por linfócitos B e educam TAMs para a produção de fatores angiogênicos, com isto direcionam a resposta imune do hospedeiro para o tipo II, que contribui e favorece o crescimento tumoral (Rev. DRAGHICIU *et al.*, 2011). Em linfonodos de pacientes portadores de tumor de mama, uma alta razão entre CD4⁺/CD8⁺ e Th2/Th1 é indicativo de mau prognóstico tumoral (KOHRT *et al.*, 2005).

A permanência da inflamação crônica é amplamente alcançada pela presença de sistemas de retro-alimentação positiva, incluindo a produção de citocinas e de outros mediadores por células inflamatórias, e a indução por estas da síntese de quimiocinas em células tumorais e estromais. Esse sistema conduz ao contínuo recrutamento de células inflamatórias para o microambiente e a manutenção do crescimento tumoral.

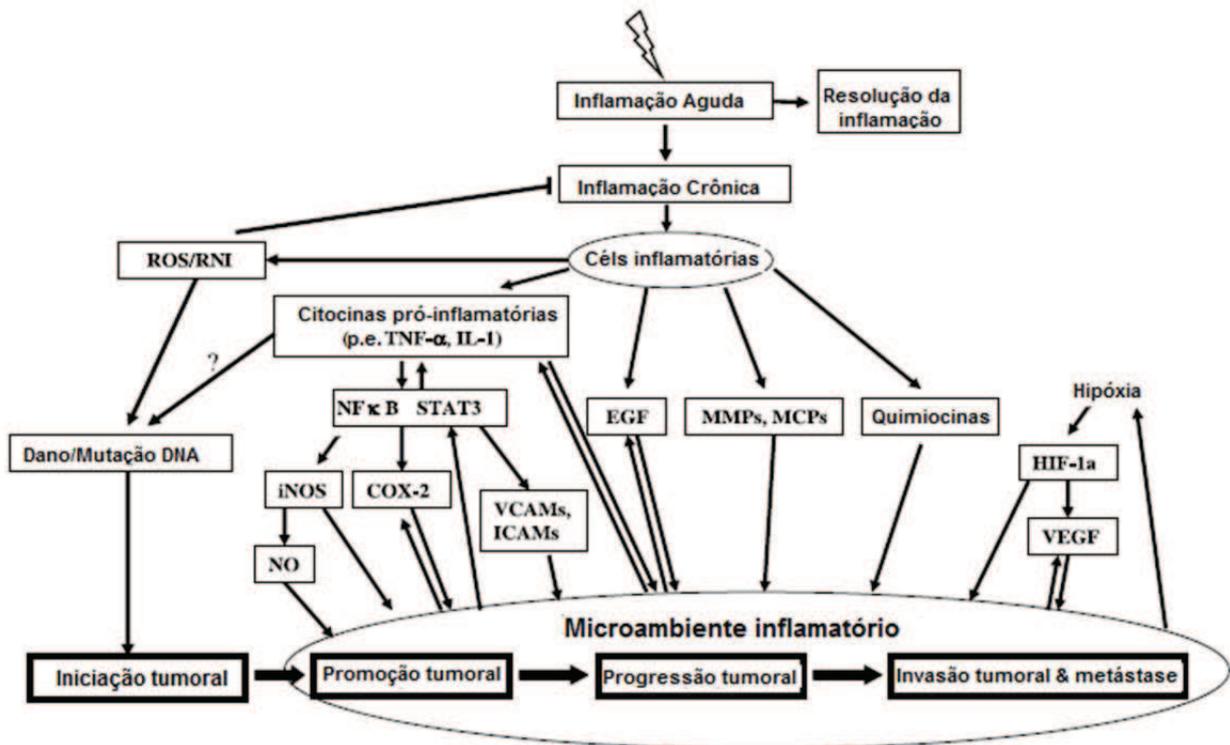


Figura 3: Resumo dos mecanismos desencadeados pela inflamação no desenvolvimento tumoral. (Adaptado de Lu *et al.*, 2006 - Inflammation, a Key Event in Cancer Development)

Os diferentes tipos celulares se comunicam entre si por meio do contato direto ou, como dito acima, pela produção de citocinas, de forma a controlar o crescimento tumoral e moldar o seu microambiente. A expressão de mediadores e moduladores imunes, somada a presença e ao estado de ativação dos diferentes tipos celulares determinam em qual direção a inflamação agirá, se promovendo o desenvolvimento do tumor ou a resposta anti-tumoral. Sabe-se que em tumores estabelecidos, o balanço existente entre essas duas respostas é, pronunciadamente, direcionado para a inflamação pró-

tumoral já que, sem qualquer intervenção, tumores em estágios avançados raramente regridem (Rev. GRIVENNIKOV *et al.*, 2010).

De acordo com o conceito de imunoeedição, células neoplásicas, constantemente, editam e modulam a resposta anti-tumoral do hospedeiro. Por outro lado, a resposta imune gerada pelo organismo molda a imunogenicidade tumoral e promove a seleção dos clones celulares. Durante esse processo, o balanço entre a resposta imune anti- e pró-tumorigênica pode se tornar a favor do crescimento tumoral (KOEDEL *et al.*, 2007). Caso ocorra a evasão do tumor à presença da vigilância imune, um equilíbrio entre o crescimento tumoral e a destruição de células neoplásicas pode ocorrer, levando à dormência do tumor por décadas. Propõe-se que células tumorais, para inclinar o equilíbrio a seu favor, editem o repertório de antígenos tumorais para os de baixa imunogenicidade, remodelando o microambiente tumoral por tornando-o imunossupressivo (KOEDEL *et al.*, 2007).

Contudo, vários autores acreditam que a inflamação promotora do crescimento tumoral e a imunidade anti-tumor co-existem em diferentes fases ao longo da progressão tumoral e são as condições do microambiente que ditam o equilíbrio entre tais respostas (Rev. GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). De acordo com Hanna e col. (2009), células do sistema imune pertencentes ao microambiente tumoral são alvos de interesse para novas terapias de combate ao câncer. Ainda de acordo com esses autores, a inabilidade da vigilância imune no controle de processos neoplásicos tem sido alvo de pesquisas para a descoberta de caminhos que promovam o aumento da imunidade natural do hospedeiro no sentido de promover o combate de células neoplásicas e barrar a progressão tumoral.

Modulação do processo inflamatório tumoral como perspectiva de tratamento do câncer

Com base no desenvolvimento tumoral, diferentes tratamentos de combate ao câncer têm sido propostos. Contudo, esses por muitas décadas se limitam a remoção cirúrgica, radiação, quimioterapia, hormonoterapia e imunoterapia, que podem ser usados de forma isolada ou combinada. O tratamento quimioterápico constitui um grande desafio para a medicina moderna visto que, geralmente, atua em nível celular, sem especificidade, interferindo no processo de crescimento e divisão celular, não destruindo seletiva ou exclusivamente células tumorais. A classe de fármacos mais utilizada é a dos agentes citotóxicos (alquilantes, antimetabólicos e antibióticos) que atuam de forma a interromper a divisão celular e desencadear o processo de apoptose (KASIBHATLA *et al.*, 2004). Os efeitos adversos da quimioterapia citotóxica estão relacionados à destruição de células saudáveis que estejam em mitose, e incluem: toxicidade hematológica, gastrointestinal e cardíaca, além de toxicidade hepática, pulmonar, neurológica, vesical/renal e dermatológica; alterações metabólicas e reações alérgicas e anafilaxia (ARAÚJO *et al.*, 2006).

Apesar do exponencial crescimento do uso de quimioterápicos citotóxicos para o tratamento do câncer, existem poucos relatos de remissões de tumores sólidos a partir da utilização exclusiva destes fármacos. Uma hipótese para esta ineficácia seria o ritmo acelerado das divisões de células neoplásicas que apresentam como subproduto instabilidade genética e a promoção rápida de mutações (Rev. BAILAR & GORNINK, 1997). Devido ao baixo índice de cura e a tantas outras limitações atribuídas ao uso de quimioterápicos, os elementos pertencentes ao microambiente tumoral, como leucócitos; células não transformadas e o processo inflamatório representam alvos alternativos no tratamento do câncer (KERBEL, 1991; BOEHM *et al.*, 1997). Os elementos pertencentes a esse microambiente inflamatório, por serem geneticamente homogêneos e estáveis, teriam suas atividades moduladas ou seriam combatidos seletivamente. Dessa forma, os tratamentos quimioterápicos seriam utilizados em menores doses, com isso apresentariam menor

toxicidade, e uma chance maior de sucesso na terapia de tumores resistentes ao tratamento tradicional (BROWDER *et al.*, 2000; QIU *et al.*, 2008).

Os achados sobre a influência do microambiente e da inflamação forneceram uma melhor compreensão sobre a etiologia do câncer e lançaram as bases para o uso de fármacos anti-inflamatórios na prevenção e no tratamento desta doença. Apesar das limitações, vários desses fármacos mostraram ser capazes de reduzir a incidência, quando utilizados como profilaxia, assim como, retardando a progressão e reduzindo a mortalidade, quando utilizados como tratamento (Rev. GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). A contraprova do envolvimento da inflamação no processo tumoral pode ser verificada pelo uso prolongado de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), incluindo o ácido acetilsalicílico e inibidores seletivos de COX-2 (Rev. GRIVENNIKOV *et al.*, 2010), que estão associados à significativa redução do risco de desenvolvimento de cânceres do colón e do reto (Rev. GARCIA-RODRIGUEZ & HUERTA-ALVAREZ, 2001), pulmonares, estomacais, esofagianos (Rev. BARON & SANDLER, 2000) e de mama (MANTOVANI *et al.*, 2008). Além disso, AINES apresentam ação potencializadora do efeito de agentes citotóxicos, e a sensibilização de células tumorais ao tratamento radioterápico (Rev. MASFERRER *et al.*, 1999). Trabalhos utilizando modelos tumorais murinos relatam mecanismos os quais poderiam estar contribuindo para a atividade antitumoral dessa classe de drogas. Propriedades como a inibição da formação de novos vasos e da produção de citocinas pró-angiogênicas, a indução de apoptose em células tumorais e endoteliais (CONNOLLY *et al.*, 2002; LEAHY *et al.*, 2002) são alguns desses mecanismos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais:

4.1.1. Biológicos

- Animais BALB/c fêmeas entre 8 e 10 semanas– adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO/ICB/UFMG) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
- Linhagem celular de adenocarcinoma de mama 4T1- adquirida da Coleção Americana de Tipos Celulares- American Type Culture Collection (ATCC).
- Látex exsudado de frutos imaturos de *Vasconcellea cundinamarcesis* originários do Chile, fornecidos pelo Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais (ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).
- Macrófagos obtidos do peritônio de fêmeas BALB/c, com idade entre 8 e 10 semanas, adquiridas do CEBIO/ICB/UFMG.

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas e regulamentos do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), protocolo de autorização nº 103/2007.

4.1.2. Fármacos utilizados

- Carboplatina (B-Platin®) – **Blausiegel Ind. e Com. Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil.**
- Celecoxibe (Celebra®)- **Laboratórios Pfizer Ltda, Guarulhos, São Paulo, Brasil.**
- Quetamina (Cetamin®) - **Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, São Paulo, Brasil.**
- Xilasina (Dopaser®)- **Laboratórios Calier S.A., Barcelona, Catalunha, Espanha.**

4.1.3. Kits e anticorpos

- Kits de imunoenaios (DuoSet ® IL-6, MCP-1, VEGF e TNF- α anti-mouse) - **R & B Systems, Mineapolis, Minnesota, EUA.**
- Kit imunoensaio KC (anti-mouse) – **Pepto Tech, Rocky Hill, New Jersey, EUA.**
- Kit substrato para imunoensaio (SigmaFast OPD ®) - Dicloridrato de o-Fenilenodiamina - **Sigma- Aldrich Co., St. Louis, Missouri, EUA.**

4.1.4. Reagentes químicos

- Ácido acético glacial P.A., bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, hidróxido desódio, glicina e peróxido de hidrogênio - **Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil.**
- Ácido cítrico monohidratado, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido N-(2-hidroxietil)-piperazino-N'-etaneusulfônico (Hepes), Ampicilina sódica, Anfotericina B, Brometo de hexa – 1,6 -bisdeciltrimetilamônio (HTAB), dimetil sulfóxido (DMSO), estreptomicina, Rodamina 6G, Tween 20, [2-(2'-amino-3'-metoxifenil)-oxanaftaleno-4-um] (PD98059), 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), 7-Hidroxi-3H-phenoxazina-3-ona 10-óxido de sódio (Resazurina) - **Sigma Chemical Co, St. Louis, Maryland, EUA.**
- Albumina de soro bovino tipo V- **Calbiochem, St. Diego, EUA.**
- Etileno-diamino-tetracetato dissódico dihidratado (EDTA), etanolabsoluto, fosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico e dibásico desódio, fluoreto de sódio, Glicerol, Triton X-100- **Merck, Darmstadt, Alemanha.**
- Meio de cultura RPMI 1640 desidratado, Solução aquosa detripsina (ATV)- **Cultilab Mat.Cult. Cel. Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil.**
- Meio de cultura tioglicolato- **Acumedia Manufacturers Inc., Lansing, Michigan, EUA.**
- Nitrogênio líquido- **White Martins do Brasil S/A, Contagem, Minas Gerais, Brasil.**

- Soro Fetal Bovino (FBS)- **Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland, EUA.**

4.1.5. Materiais Diversos

- Agitador magnético modelo 252- **Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil.**
- Barras magnéticas - **Fizatron, Equipamentos Eletrônicos para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil.**
- Béqueres, ehrlenmeyers, funis, pipetas graduadas, provetas, kitassatos, balões volumétricos- **Pyrex[®], Cidade do México, México.**
- Botijão de nitrogênio 10m³ de gás acoplado ao sistema de ultrafiltração- **Air Liquide Ltda, Ipiranga, SP, Brasil.**
- Garrafas de poliestireno (frasco de cultivo) de 25 cm² e 75 cm² paracultura, e placas de poliestireno multicavidades de 24 e 96 cavidades - **Nunc Inter Med A/S, Roskilde, Dinamarca.**
- Hemocitômetro (Câmara de Neubauer)- **(Neubauer Improved Bright-line) Kinittel Gläser.**
- Lâminas para microscopia, 25,4 x 76,2 mm(Solidor[®]) - **Médico Industries & Trade Co. Ltd., Shijiazhuang, China.**
- Lamínulas circulares para microscopia, 13 mm de diâmetro – (Glasscyto[®])
- Material cirúrgico - Pinças, tesouras e porta-agulhas, agulhas, fio de sutura SUTURIM- **Procure- Cirúrgica, Belo Horizonte, MG.**
- Membranas filtrantes de nitrato de celulose, com 0,45 µm e 0,22 µm de diâmetro de poro- **Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA.**
- Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000µl, acompanhados de ponteiros de polipropileno (FisherBrand Elite [®])- **ThermoScientific, Joensuu, Finlândia.**
- Tubos de polipropileno, com fundo cônico, de 15 e 50 ml de capacidadee dotados de tampa rosqueável - **Quimex Corning Incorporated, New York, NY, EUA.**
- Tubos tipo “ependorf” com capacidade para 0,5, 1,5 ; 2,0mL- **Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA.**

- Tubos de ensaio com 14 X 1 cm de dimensões- **Vidrolabor-Thermex Astra Brasil Ind. Vidros, F.Vasconcelos, SP, Brasil.**

4.1.6. Equipamentos

- Balança eletrônica analítica modelo AR-2140- **Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil.**
- Banho-maria calibrado a 37°C, centrífuga Excelsa 2 modelo 205 N- **Fanem, São Paulo, São Paulo, Brasil.**
- Bomba aspirante modelo “H”- **Nevoni Equipamentos Médicos e Odontológicos, São Paulo, São Paulo, Brasil.**
- Câmera digital para microscópio invertido, Moticam 2500 5.0 MPixel- **Motic, Xiamen, China.**
- Capela com fluxo laminar de ar ultrafiltrado- **Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, Campinas, São Paulo, Brasil.**
- Centrífuga refrigerada, Sorvall ST 16R - **ThermoFisher Scientific, Salisbury,Wiltshire, Inglaterra.**
- Deionizador de água por meio de osmose reversa - **Milipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EUA.**
- Estufa incubadora 36,5 °C, atmosfera controlada e contendo 5% CO₂ (v/v)- **Nuaire Equipaments, Pymouth, Minneapolis, EUA.**
- Freezer a temperatura de- 80 °C, Ultra Freezer modelo CL 374- 80V- **Cold lab, Piracicaba, São Paulo, Brasil.**
- Homogeneizador Ultraturrax- **Janke & Kunkel IKA, Labortenik, Alemanha.**
- Leitor de microplacas de ELISA- **Spectramax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA.**
- Medidor de pH modelo NT-PH2 - equipado com eletrodo modelo V-620 C - **Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, SP, Brasil- Novatécnica Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, São Paulo, Brasil.**
- Microscópio de epi-fluorescência AXIOIMAGER M2, Câmera AxioCam MRm- **ZEISS Inc., Jena, Turíngia, Alemanha.**

- Microscópio ótico linha CB, microscópio ótico invertido modelo CK2 - **Olympus Corporation, New York, EUA.**
- Paquímetro digital-**Mitutoyo Measuring Instruments Co. Ltd., Suzhou, P.R. China.**
- Refrigerador ajustado à temperatura de 4°C; freezer à temperatura de – 20°C- **Consul - Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil.**
- Shaker Roto Mix modelo 48200- **Thermolyne, Dubuque, Iowa, EUA.**
- Ultra-sonicador modelo FS-28H, Ultracentrífuga Sorvall ST16R- **Thermo Fisher Scientific, California, EUA.**

4.1.7. Programas computacionais

- Programa GraphPad Prism 5 para construção dos gráficos e realização das análises estatísticas;
- Programa *Axio Vision* (**Zeiss Inc., Jena, Alemanha**) acoplado a câmera digital *AxioCam MRm ZEISS* para a medição dos diâmetros dos vasos sanguíneos na técnica de intravital.
- Programa *Motic Image Plus 2.0* acoplado a câmera modelo *Moticam 2500* para obtenção de fotos de cultura celular em microscópio invertido.

4.1.8. Soluções

Solução anestésica (quetamina 10% e xilasina 2%) :

Quetamina 10%.....	10,00 mL
Xilasina 2%.....	7,50 mL

Cultivo e contagem celular

Meio RPMI 1640 pH 7,4:

Meio RPMI 1640 desidratado	10,43 g
Bicarbonato de sódio	2,00 g
Hepes	2,38 g
Ampicilina sódica	0,10 g
Estreptomicina	0,10 g
Anfotericina B	5,00mg
Água deionizada q.s.p.....	1,00 L

Esterilizado por filtração em membrana com porosidade absoluta de 0,22 µm.

Tampão PBS pH 7,4:

Fosfato dibásico de sódio P.A.	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio P.A.	0,25 g
Cloreto de sódio	8,20 g
Cloreto de potássio	0,20 g
Água destilada q.s.p.....	1,00 L

O pH é ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico 1 M e o tampão é esterilizado por autoclavagem a 120°C durante 40 minutos.

Tampão PBS/EDTA pH 7,4:

Fosfato dibásico de sódio P.A.	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio P.A.	0,25 g
Cloreto de sódio	8,20 g
Cloreto de potássio	0,20 g
EDTA	1,37 g
Água destilada q.s.p.....	1,00 L

O pH é ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico 1 M e o tampão é esterilizado por autoclavação a 120°C durante 40 minutos.

Solução corante de azul de tripan:

Azul de tripan	120,00 mg
Solução salina 0,9% q.s.p.....	30,00 mL

Solução de turk:

Violeta genciana	100,00 mg
Ácido acético glacial	30,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

O reagente violeta genciana foi solubilizado em solução contendo água destilada e ácido acético glacial.

Determinação da atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)**Solução NaCl 0,9% :**

NaCl.....	0,90 g
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução Triton X-100 a 0,1 %:

Triton X- 100.....	1,00 mL
Solução salina a 0,9% q.s.p.....	1,00 L

Tampão citrato/fosfato pH 5 :

Ácido cítrico a 0,1 M (Solução A)

Ácido cítrico monohidratado10,51 g
Água deionizada q.s.p.....500,00 mL

Fosfato de Sódio a 0,1 M(Solução B)

Fosfato de sódio dibásico7,10 g
Água deionizada q.s.p.....500,00 mL

Tampão citrato/ fosfato a 0,039 MpH 4,5:

Solução A.....300,00 mL
Solução B.....465,00 mL

p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glicosamina a 2,24 mM :

p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glicosamina.....0,77 mg
Tampão citrato/fosfato.....1,00 mL

Tampão Glicina a 0,2M pH 10,6

Glicina a 0,8 M :

Glicina.....15,01 g
Água destilada q.s.p.....250,00 mL

NaCl a 0,8 M:

NaCl.....11,70 g
Água destilada q.s.p.....250,00 mL

NaOH a 0,8 M :

NaOH.....8,00 g
Água destilada q.s.p.....250,00 mL

Tampão glicina:

Glicina a 0,8 M.....	100,00 mL
NaCl a 0,8 M.....	100,00 mL
NaOH a 0,8 M.....	100,00 mL

Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Tampão Fosfato de sódio pH 5,4:

Solução 1: Na₂HPO₄.12 H₂O (PM= 358,14) a 0,32 M

- Na₂HPO₄.12 H₂O 28,65g
- Água destilada q.s.p.....250,00 mL

Solução 2: NaH₂PO₄.H₂O (PM=137,99) a 0,32 M

- NaH₂PO₄.H₂O.....11,04 g
- Água destilada q.s.p.....250,00 mL

Solução Estoque: Tampão Fosfato de Sódio a 160 mM, pH 5,4

- Solução 1 3,00 mL
- Solução 247,00 mL
- Água destilada q.s.p.....100,00 mL

Solução de uso: Tampão Fosfato de Sódio a 80 mM, pH 5,4

- Solução Estoque50,00 mL
- Água destilada q.s.p50,00 mL

Solução de HTAB (brometo de hexa - 1,6 - bis- deciltrimetilamônio) a 0,5%:

HTAB.....	0,10 g
Tampão fosfato de sódio (80 mM, pH 5,4).....	20,00 mL

TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina) a 6,4 mM em DMSO :

TMB.....	1,54 mg
DMSO.....	1,00 mL

Solução de H₂O₂ a 1,2 mM em tampão fosfato de sódio:

H ₂ O ₂	1,60 µL
Tampão fosfato de sódio 80 mM.....	25,00 mL

Solução de H₂SO₄ a 4 M :

H ₂ SO ₄	115,00 mL
Água destilada q.s.p.....	500,00 mL

Quantificação de citocinas - Ensaio imunoenzimáticos**Solução para Extração de Citocinas :**

NaCl	0,40 M
Tween 20	500,00 µL
BSA	5,00 g
Phenil Metil Sulfoni Fluoride (PMSF).....	17,00 mg
DMSO	100,00µL
Cloreto de Benzetônio 0,1 mM	44,80 mg
EDTA 10 mM.....	372,00 mg
Aprotinina 20 Kj.....	20,00 µL
Água Deionizada q.s.p.....	1,00 L

Tampão PBS pH 7,4:

Fosfato dibásico de sódio P.A.	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio P.A.	0,25 g
Cloreto de sódio	8,20 g
Cloreto de potássio	0,20 g
Água destilada q.s.p.	1,00 L

O pH é ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico 1 M eo tampão é esterilizado por autoclavação a 120°C durante 40 minutos.

Reagente diluente :

BSA 0,1%.....	40,00 mg
Tampão PBS estéril.....	40,00 mL

Tampão de lavagem :

Polioxietilenosorbitano monolaurato 20 (Tween 20).....	650,00 µL
Tampão PBS.....	1,30 L

Tampão de bloqueio :

BSA 1%.....	0,40 g
Tampão PBS estéril.....	40,00 mL

Solução para paralisação da reação :

H ₂ SO ₄ 4M.....	30,00 mL
Água destilada q.s.p.....	10,00 mL

4.2. Métodos:**4.2.1. Obtenção e purificação da fração P1G10**

A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, o látex foi coletado e armazenado a 4°C, sendo a seguir liofilizado e novamente armazenado a -20°C (BAEZA *et al.*, 1990). No processo de separação cromatográfica foram dissolvidos 15,0 g do látex liofilizado em 75,0 mL em tampão de ativação. A seguir, a mistura foi agitada durante 30 min e centrifugada (9.000 G) durante 10 min a 4 °C. Após a filtração do sobrenadante, o resíduo obtido foi novamente submetido ao procedimento descrito acima, utilizando agora 25,0 mL de tampão de ativação. O produto filtrado foi aplicado em uma coluna de gel-filtração contendo resina Sephadex® G-10 equilibrada por 48 horas com tampão de acetado de sódio 1,0 M. As frações protéicas foram coletadas mediante um fluxo constante de 0,25 mL/minuto à temperatura ambiente. Foram coletadas frações de 5 mL as quais, posteriormente, foram triadas mediante a determinação da densidade óptica em 280 nm formando dois picos de perfis cromatográficos distintos, sendo as do primeiro pico reunidas para compor a fração P1G10 e do segundo para compor a fração P2G10 (GOMES *et al.*, 2005) (APÊNCIDE A). Para caracterização, a fração P1G10 foi submetida à determinação da atividade amidásica, utilizando o substrato

BAPNA (BAEZA *et al.*, 1990) e da concentração protéica (DAWSON *et al.*, 1995).

4.2.2. Avaliação da atividade antitumoral de P1G10

Cultivo da linhagem 4T1

As células 4T1 (adenocarcinoma de mama) foram cultivadas em meio RPMI 1640 a 5% (v/v) de FBS. A linhagem foi mantida em estufa a 5% de CO₂ e 37°C com atmosfera úmida. Ao atingirem aproximadamente 90% de confluência, subcultivos das linhagens foram realizados para ampliação da cultura e posterior congelamento. Para isso, células 4T1 foram inicialmente lavadas com PBS/EDTA pH 7,4 e em seguida adicionou-se tripsina a 0,2% (v/v) para a retirada das células aderidas à superfície do frasco de cultivo. Quando as células apresentavam-se completamente desprendidas, foi adicionado meio RPMI com 5% FBS para inativar a tripsina. O congelamento para a manutenção das células viáveis em estoque foi efetuado a partir da preparação de criotubos contendo alíquotas de 650 µL das linhagens celulares (em 25% FBS e 10% DMSO). As alíquotas foram inicialmente congeladas a -20 °C por duas horas e depois estocadas em nitrogênio líquido.

Inóculo tumoral e esquema de tratamento

Células 4T1 foram cultivadas e obtidas conforme descrito no item acima. Após a obtenção da suspensão celular uma alíquota foi retirada para a contagem do número de células e ajuste da densidade celular, com auxílio da câmara de Neubauer e da solução corante de azul de tripan. A suspensão celular foi, então, centrifugada e suspensa em volume adequado de RPMI 1640 (veículo utilizado na administração), e inoculada subcutâneamente (*s.c.*) no volume de 100 µL, contendo $2,5 \times 10^6$ células, na região do flanco esquerdo de camundongos BALB/c fêmeas.

Primeiramente, realizou-se a caracterização do perfil de desenvolvimento tumoral - modelo utilizado por Souza e col. (2012) - com o inóculo de animais

BALB/c fêmeas e acompanhamento do volume e da massa dos tumores nos dias 3, 7, 14 e 21 pós-inóculo. Posteriormente, para a avaliação da atividade antitumoral animais foram inoculados e divididos em 6 grupos: o controle negativo que recebeu somente veículo s.c (solução salina a 0,9%), o controle positivo fármaco anti-inflamatório da classe dos inibidores seletivos de COX-2 s.c. (Celecoxibe, 6 mg/Kg), o controle positivo fármaco quimioterápico da classe dos citotóxicos alquilantes *i.p.* (Carboplatina, 100 mg/kg) e os grupos testes que receberam P1G10 s.c. nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg. Os tratamentos foram iniciados no 3º dia após o inóculo das células tumorais e realizados diariamente durante 11 ou 18 dias, sendo os animais pesados de 2 em 2 dias para ajuste da dose. O tratamento com carboplatina também iniciou-se no 3º dia pós-inóculo, porém foi realizado em ciclos de 7 dias decorridos até o sacrifício dos animais.

Avaliação da variação do volume e da massa tumoral

Os tumores foram medidos, em dias alternados, com o auxílio de um paquímetro digital, o que possibilitou o cálculo do volume tumoral. A determinação do volume foi realizada através de duas medidas: uma no sentido da maior extensão e outra no sentido da menor extensão (GHONEUM *et al.*, 2008).

Assim, o volume tumoral (VT) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$VT (mm^3) = 0,52 AB^2$$

sendo A, a medida do menor eixo e B a do maior eixo.

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram os tumores retirados e pesados. Além disso, tumores de animais submetidos a avaliação da atividade antitumoral, foram fracionados e armazenados em microtubos tipo “ependorf” a -80°C para, subsequente, determinações da atividade de enzimas leucocitárias e de níveis de citocinas.

4.2.3. Avaliação do efeito de P1G10 sobre a Inflamação no Ambiente Tumoral

Os parâmetros utilizados para a avaliação da atividade de P1G10 sobre a inflamação tumoral foram: a contagem de leucócitos periféricos; o rolamento e a adesão leucocitária em vasos tumorais; a presença de neutrófilos (atividade da mieloperoxidase- MPO) e macrófagos ativos intratumor (atividade da N-acetil-b-D-glicosaminidase- NAG); os níveis de citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas em amostras de tumores.

Contagem global e diferencial de leucócitos periféricos

As avaliações do número de leucócitos foram realizadas em animais tratados portadores e não portadores do carcinoma de mama 4T1. Uma alíquota de 10 µL de sangue periférico, obtido através de corte com uma tesourada extremidade da cauda de camundongos Balb/c fêmeas, foi adicionada a 190 µL de solução de Turk. Agitou-se bem e cerca de 10 µL da suspensão formada foi colocada em uma câmara de Neubauer para realização da contagem do número de células, utilizando os quatro campos externos da câmara. Após a contagem, foi calculado o número total de leucócitos, pela fórmula:

$$\text{Número de células/mL} = (\text{número de células contadas} \times \text{Fator de correção}) \div 4$$

Sendo que :

$$\text{Fator de correção} = \text{fator de profundidade} (10^4) \times \text{fator de diluição} (20)$$

Para confecção do esfregaço sanguíneo uma gota do sangue total, obtido conforme descrito acima, foi colocada sobre uma lâmina limpa. Com a ajuda de outra lâmina, em uma inclinação de 45°, foi feito o esfregaço através do deslizamento de uma sobre a outra, em sentidos opostos. Após a secagem, as lâminas foram coradas por May-Grünwald e Giemsa (CARVALHO e SILVA *et al.*, 1988). A contagem diferencial foi feita até se obter uma soma igual a 100, que indica o percentual de leucócitos no esfregaço. Após a contagem, o

percentual encontrado foi multiplicado pelo valor global encontrado, sendo os resultados expressos em número de leucócitos por mL.

Análise do rolamento e da adesão de leucócitos em vasos tumorais

A microscopia intravital foi utilizada para avaliar o processo *in vivo* de rolamento e adesão leucocitária em vasos tumorais de animais portadores do carcinoma de mama 4T1 (BAATZ *et al.*, 1995; DIRKX *et al.*, 2003). Os animais, após 18 dias de tratamentos, foram previamente anestesiados *i.p.* com uma mistura de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (150 mg/Kg), e tiveram a veia da caudal canulada para administração de Rodamina 6G (0,3mg/Kg). Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para a realização de incisão na região abdominal, divulsão da pele e exposição de parte do tumor. A superfície tumoral foi coberta com salina e posteriormente com um filme plástico para manter a estrutura em posição ideal e evitar a desidratação. Os vasos tumorais foram localizados e os processos de rolamento e adesão foram avaliados em 10 vasos de pequeno (diâmetro 20- 70 μm) e em 5 vasos de grande calibre ($> 70 \mu\text{m}$). Um microscópio AXIOIMAGER M2 ZEISS, com objetiva 20X foi utilizado para observar os eventos de rolamento e adesão na vasculatura tumoral. A fluorescência associada à rodamina 6G foi visualizada com epi-iluminação a 510-560 nm, usando um filtro de emissão de 590 nm. Uma câmera de vídeo AxioCam MRm ZEISS foi utilizada para a projeção e gravação das imagens em microcomputador para posterior análise com auxílio do programa *Axio Vision*. O rolamento de leucócitos foi definido como células movendo a uma velocidade menor que o fluxo sanguíneo e foi expresso em n°cél/s rolando/minuto. Os leucócitos foram considerados aderidos se permanecessem estacionários ao endotélio por um período de pelo menos 30 segundos, e a adesão foi expressa como n° células/100 μm vaso.

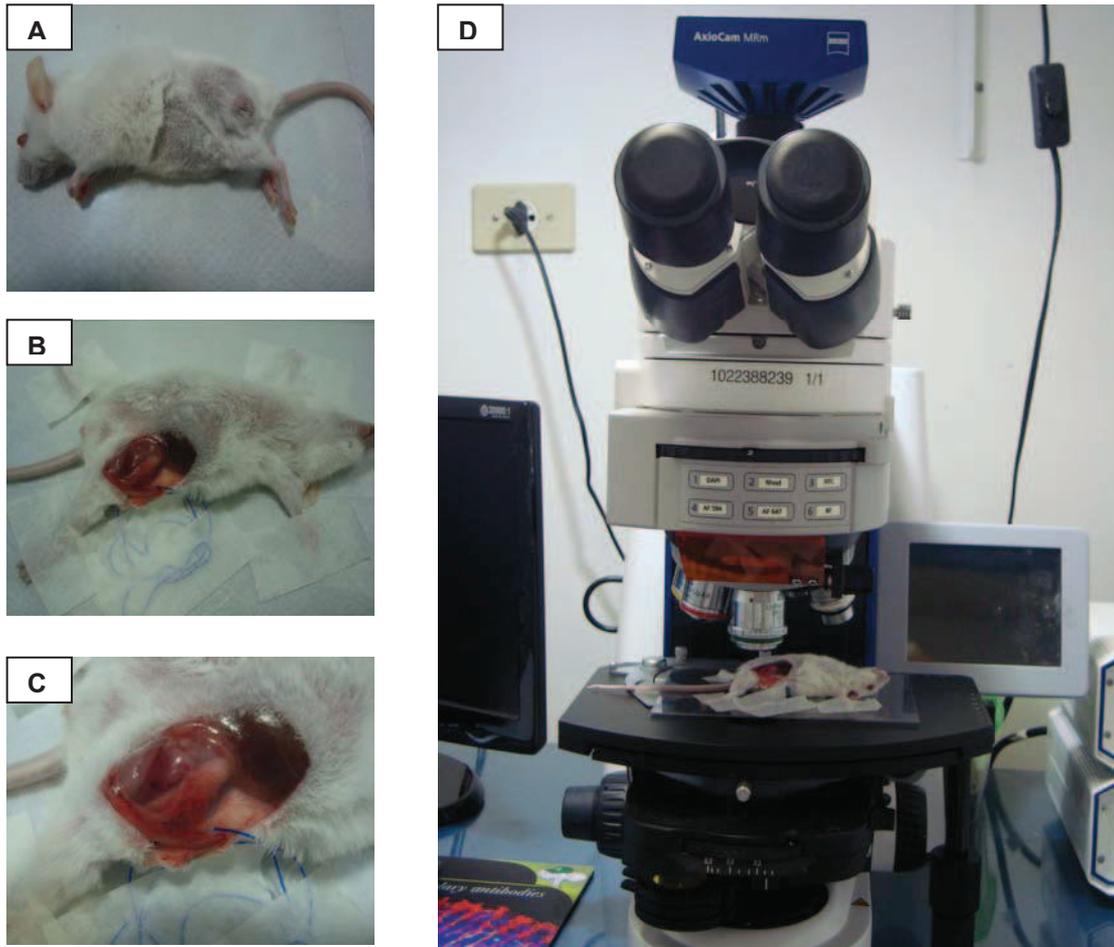


Figura 4: Imagens esquemáticas que mostram o posicionamento dos animais e exposição dos tumores na técnica de intravital. Camundongos Balb-C fêmeas receberam inoculo de $2,5 \times 10^6$ células na região do flanco. Após 18 dias de tratamento, os animais foram anestesiados, receberam injeção *i.v.* de rodamina 6G (A) e posicionados em decúbito dorsal para exposição de parte do tumor via incisão abdominal (B e C). Posteriormente, os animais foram posicionados e os vasos tumorais localizados através do sistema de epi-iluminação composto de microscópio de epiluminescência (AXIOIMAGER M2 ZEISS), câmera de vídeo-imagem (AxioCam MRm ZEISS), microcomputador e software para análise das imagens (Axio Vision(D)).

Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Inicialmente, o fragmento tumoral destinado à quantificação da atividade de mieloperoxidase foi homogeneizado com o auxílio do aparelho homogeneizador ultra-turrax em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Foram retirados então 100 µL do sobrenadante e adicionados 200 µL de tampão de fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexa-1,6-bisdecyltrimethylammonium bromide (HTAB). A atividade da enzima MPO no sobrenadante foi mensurada através da variação da absorbância (densidade óptica; DO) a 450nm. Às

amostras (100 μ L) foram adicionados 100 μ L de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina 1,6 mM (TMB) preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) concomitantemente com 100 μ L de tampão fosfato 80mM (pH 5,4) contendo peróxido de hidrogênio 0,3 mM. A reação foi interrompida com a adição de 100 μ L de ácido sulfúrico 4M e quantificada colorimetricamente à 450 nm em leitor de microplaca. Os resultados são expressos em D.O./mg de tecido úmido.

Avaliação da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)

Para este experimento, aos fragmentos tumorais foram adicionados 1 mL NaCl a 0,9% contendo 0,1 % (v/v) de Triton-X-100 e homogeneizados com o auxílio do aparelho homogeneizador ultra-turrax. Esse homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 3.000g a 4^oC. Para a realização do ensaio, 100 μ L da amostra foram diluídos em 400 μ L tampão citrato/fosfato (1:5) e colocadas em duplicada (100 μ L) em placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 μ L do substrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminidase, diluído em tampão citrato/fosfato (pH 4,5) em uma concentração final de 2,34 mM. Posteriormente, a placa foi incubada à 37° C durante 30 minutos. Finalmente, a reação foi interrompida adicionando-se 100 μ L de tampão glicina 0,2M (pH 10,6). A absorbância foi medida por leitor de microplaca em comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram expressos em D.O./mg de tecido úmido.

Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas

As dosagens de citocinas IL-6, MCP-1, KC, VEGF foram realizadas em homogenatos de tecidos tumorais, homogeneizados em 2,0 mL de solução extratora de citocinas com o auxílio do aparelho homogeneizador ultra-turrax. Em sobrenadante de culturas celulares foram dosadas as citocinas VEGF e TNF- α . As dosagens foram realizadas utilizando kits de imunoensaio, seguindo seus protocolos. A placa de microtitulação foi sensibilizada com 100 μ L/cavidade de anticorpo primário (anti-camundongo) específico para a citocina a ser avaliada e incubada a 4^oC *overnight*. A placa foi lavada por 6 vezes com 400 μ L de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem).

Foram, então, adicionados à placa 200 µL/ poço de PBS pH 7,4 com 1% BSA (Albumina de Soro Bovino), seguido de incubação por 1 hora para bloquear os sítios de ligações inespecíficas. A placa foi novamente lavada com tampão de lavagem. Os padrões e as amostras diluídas em PBS pH 7,4 com 0,1% BSA (100 µL por poço) foram adicionadas à placa e incubadas a 4^oC overnight. A placa foi lavada com o tampão de lavagem e foram adicionados 100 µL/cavidade do apropriado anticorpo de detecção biotinilado e incubado por 2 horas. A placa foi lavada com o tampão de lavagem novamente e foram adicionados 100 µL/ poço do conjugado estreptavidina-peroxidase e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem da placa, 100 µL/ poço de solução de OPD (0,4 mg/mL) diluído em tampão citrato a 0,03 M pH 5,0 contendo H₂O₂ 30 v/v foram adicionados. A placa foi incubada ao abrigo da luz durante 15 minutos. A reação foi interrompida por adição de 50 µL/cavidade de H₂SO₄ 1M. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos em µg/mg de tecido tumoral em pg ou ng/mL de sobrenadante de culturas celulares sendo que uma curva-padrão, com sete pontos, foi construída seguindo-se os protocolos de cada kit.

4.2.4. Determinação do valor de IC-50 para P1G10 sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais e da linhagem 4T1

Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais

Animais BALB/C fêmeas entre 8 e 10 semanas foram estimulados, por via intraperitoneal, com 2,0 mL de tioglicolato estéril a 4% (p/v). Após 4 dias, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, e submetidos a uma incisão abdominal (entre 1 e 2 cm), com auxílio de pinças e tesouras estéreis, para a realização do lavado peritoneal utilizando-se 10 mL de PBS estéril a 4^oC. Após massagem vigorosa na cavidade abdominal a suspensão celular obtida foi coletada com a utilização de pipetas de Pasteur estéreis, transferidas para tubos de fundo cônico estéreis com capacidade para 15 mL e centrifugada a 2.500 rpm por 10 minutos a 4^o C (LEIJH *et al.*, 1984). Em seguida o sobrenadante foi descartado, as células suspensas em meio RPMI, para contagem em câmara de Neubauer e ajuste da densidade celular. Após o

período de 2 horas, tempo necessário para adesão dos mesmos, adicionou-se a cada cavidade 200 μ L de PBS pH 7,4 seguido de aspiração com o objetivo de remover células não aderentes. Esse procedimento de lavagem foi realizado por mais 2 vezes, seguido do cultivo das células em RPMI a 5% (v/v) de FBS por 24 horas.

Avaliação da viabilidade/metabolismo celular pela metabolização do sal de resazurina

O teste utilizado para avaliação da citotoxicidade foi o teste da resazurina. As suspensões celulares obtidas foram semeadas em placas de poliestireno de 96 cavidades nas densidades de 2×10^3 células/cavidade (4T1); $1,0 \times 10^5$ células/cavidade (Macrófagos Peritoneais), em volume de 100 μ L de meio RPMI mais 5% (v/v) de FBS. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% (v/v) de CO₂. Após adesão dessas células na superfície das cavidades, por um período de 24 horas, estas foram expostas, por 72 horas, a concentrações diferenciadas da fração P1G10 (variando entre 10- 500 μ g/mL) ou Celecoxibe (20- 500 μ g/mL) ou Carboplatina (2- 50 μ g/mL), sendo que os controles receberam apenas meio/soro. Os testes foram realizados em hexaplicatas. Após o período de exposição, foi realizada a troca do meio de cultivo que continha os tratamentos por 100 μ L de solução de resazurina em RPMI na concentração de 10 μ g/mL. Depois de 4 horas as células viáveis são capazes de converter a resazurina (composto de roxo) em resorufina (composto vermelho), através de uma reação de redução via NADPH ou NADH. A leitura espectrofotométrica foi realizada em dois comprimentos de onda distintos: 570 nm (composto azul não metabolizado) e 600 nm (composto vermelho formado), sendo considerada a diferença entre os valores de densidades óticas (Δ D.O.). Para o cálculo da concentração inibitória para 50% da população, as médias aritméticas das Δ D.O dos controles foram consideradas como 100% de viabilidade celular. As curvas de Δ D.O versus concentração foram submetidas à análise de regressão linear ou não-linear dependendo das características apresentadas pelas mesmas.

4.2.5. Avaliação do efeito de P1G10 sobre cultura de macrófagos e co-culturas

A dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas, também, foi realizado em sobrenadante de culturas de macrófagos e de co-culturas (macrófagos/ células 4T1); além da determinação da citotoxicidade de macrófagos sobre células tumorais mediante exposição dos mesmos a P1G10.

Exposição dos macrófagos a P1G10 e coleta do sobrenadante

Após obtenção dos macrófagos peritoneais (conforme citado acima) estes foram semeados em placas de 24 cavidades na densidade 3×10^5 células/cavidade. Posteriormente, foram expostos, por 24 ou 48 horas, a diferentes concentrações de P1G10 (5, 10, 25 ou 50 $\mu\text{g/mL}$) em RPMI a 5% (v/v) de FBS. Decorrido o período de exposição, o meio de cultivo, juntamente, com a fração proteolítica foi removido, os poços lavados com tampão PBS pH 7,4 e a cultura mantida por 16 horas em RPMI 5% (v/v) de FBS. Neste momento, o meio de cultivo foi substituído por meio livre de fatores de crescimento (RPMI 0,25 % (p/v) de BSA) e a cultura mantida por mais 24 horas quando os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados a $400 \times G$ a 4°C por 5 min e armazenados a -80°C para a dosagem de citocinas. Os níveis de citocinas VEGF e TNF- α foram determinados, conforme descrito, e os resultados expressos em μg e ng de citocina por mL de sobrenadante, respectivamente, proveniente deculturas de macrófagos.

Confecção de co-culturas e coleta do sobrenadante

Células da linhagem 4T1 foram semeadas, em RPMI 5% (v/v) de FBS na densidade de $1,5 \times 10^5$ células/cavidade, em cavidades contendo macrófagos previamente expostos por 24 ou 48 horas a P1G10 (conforme descrito acima). Após um período de 16 horas, tempo suficiente para a adesão das células tumorais, o meio de cultivo foi substituído por RPMI 0,25% (p/v) de BSA. Ao final de 24 horas os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados a $400 \times G$ a 4°C por 5 min e armazenados a -80°C para a dosagem de citocinas. Os níveis

de citocinas VEGF e TNF- α foram determinados, conforme descrito, e os resultados expressos em μg e ng de citocina por mL de sobrenadante, respectivamente, proveniente de co-culturas.

Avaliação da viabilidade/metabolismo de culturas de macrófagos e de co-culturas

O teste de metabolização do sal de resazurina foi utilizado, também, para a avaliação da viabilidade/metabolismo de culturas de macrófagos e de co-culturas. Após o término do período de cultura e recolhimento do sobrenadante adicionou-se aos poços 1,0 mL de meio RPMI contendo resazurina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ao final do período de 1 hora as leituras espectrofotométricas foram realizadas, conforme já descrito.

Contagem do número de células em cultura

Para contagem do número de células, em cultura de macrófagos e em co-culturas, estas foram semeadas em poços contendo lamínulas de vidro circulares. Após o término dos experimentos as lamínulas após estarem totalmente secas foram retiradas e coradas por May-Grüwald e Giemsa. Essas foram observadas em microscópio óptico, aumento de 100x, e o número de células determinado. Os resultados são expressos como a média da contagem do número de células feita em 5 campos distintos da mesma lamínula.

4.3. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm e.p.m e as análises estatísticas realizadas por meio de análise de variância (*ANOVA*), seguidas pelo teste de múltipla comparação, utilizando-se o método de Student Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.