

VANESSA ALVES ARRUDA MARQUES

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DE
Tabebuia avellanedae E DO PRINCÍPIO ATIVO ISOLADO
 β -LAPACHONA SOBRE ALGUNS PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS PORTADORES DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

CAMPINAS

2006

VANESSA ALVES ARRUDA MARQUES

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DE
Tabebuia avellanedae E DO PRINCÍPIO ATIVO ISOLADO
 β -LAPACHONA SOBRE ALGUNS PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS PORTADORES DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Médica, área de concentração em
Medicina Experimental.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ar69i Marques, Vanessa Alves Arruda
Investigação dos efeitos do extrato bruto de *Tabebuia avellanedae* e do princípio ativo isolado β -Lapachona sobre alguns parâmetros imunológicos em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich. / Vanessa Alves Arruda. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hematopoese. 2. Extratos vegetais. 3. Cancer. I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em ingles: *Tabebuia avellanedae* crude extract and β -lapachone induced anti-tumor response in Ehrlich tumor-bearing mice

Keywords:

- **Hematopoiesis**
- **Plant extracts**
- **Cancer**

Área de concentração: Medicina experimental

Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Profª.Drª. Mary Luci de Souza Queiroz

Profª Drª Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Profº Drº Lício Augusto Velloso

Data da defesa: 27 / 07 / 2006

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Orientadora:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Dra. Leonilda M.B. dos Santos

Dr. Lício Augusto Velloso

Dr. Luiz Francisco Pianowski

Dra. Marize Valadares Bozinis

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/07 /2006

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelos esforços não poupados durante minha formação acadêmica;

À Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, pelo incentivo, apoio e confiança ao meu desenvolvimento científico e pessoal;

Aos amigos do Laboratório CFU, pela amizade e auxílio, imprescindíveis para a realização deste trabalho;

Às amigas Selma Pacheco e Walterly Accorsi, do laboratório de Plantas Medicinas Prof. Walter Radamés Accorsi, não apenas pela cooperação no decorrer das minhas atividades de doutoramento mas também pelo incentivo, motivação e amizade;

Agradeço aos animais, pois sem a existência deles, este trabalho não seria possível;

Ao Departamento de Fisiopatologia Médica, que possibilitou a realização deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro;

A muitas pessoas que me auxiliaram na realização desta tese e não estão aqui mencionadas.

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	<i>xi</i>
ABSTRACT.....	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO.....	17
1.1- Evolução da quimioterapia no tratamento do câncer.....	18
1.2- <i>Tabebuia avellaneda</i>.....	19
1.3- O tumor de Ehrlich.....	23
2- OBJETIVOS.....	27
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1- Animais.....	30
3.2- <i>Tabebuia avellaneda</i>.....	30
3.3- Beta-lapachona.....	30
3.4- Tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	31
3.5- Tratamento dos animais.....	31
3.6- Padronização da metodologia de cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C).....	32
3.7- Preparo do meio condicionado de células esplênicas.....	33
3.8- Obtenção do soro de animais portadores do tumor e tratados com ETA e B-LAP para avaliação da presença de fator estimulador de colônias (CSF).....	35
3.9- Atividade das células natural Killer (NK).....	35
3.9.1- Manutenção e preparo das células alvos.....	35

3.9.2- Células efetoras esplênicas.....	36
3.9.3- Ensaio de liberação de ⁵¹ Cr.....	36
3.10- Dosagem de citocinas.....	37
3.11- Avaliação da sobrevida.....	38
3.12- Análise dos resultados.....	39
4- RESULTADOS.....	40
4.1- Efeito do tratamento com ETA e B-LAP na sobrevida de animais inoculados com TAE.....	41
4.2- Avaliação dos efeitos do ETA e da B-LAP sobre o número de progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos da medula óssea e do baço (CFU-GM).....	44
4.3- Avaliação dos efeitos do ETA e da B-LAP sobre a produção de fatores estimuladores de colônias “CSFS”.....	50
4.4- Efeitos do tratamento com ETA e B-LAP sobre a atividade de células natural Killer de animais normais e portadores do TAE.....	51
4.5- Efeitos dos tratamentos ETA e B-LAP sobre os níveis de produção das citocinas IFN-γ, TNF-A E IL-10 em animais normais e portadores do TAE.....	54
5- DISCUSSÃO.....	61
6- CONCLUSÕES.....	68
7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8- APÊNDICES.....	87

		PÁG.
Figura 1-	Estrutura química do lapachol e da β -lapachona.....	22
Figura 2-	Camundongo portador de Tumor Ascítico de Ehrlich.....	26
Figura 3-	Células de Tumor Ascítico de Ehrlich coradas com PAS.....	26
Figura 4-	Coloração de Papanicolau em células de Tumor Ascítico de Ehrlich.....	26
Figura 5-	Curva de capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades por ml.....	34
Figura 6-	Curva de sobrevida (Kaplan Maier) de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/ animal) e tratados com ETA (30, 120 e 500mg/kg) por 7 dias consecutivos. O tratamento iniciou se 24h após a inoculação das células tumorais.* $p < 0,01$; Teste Cox Mantel.....	42
Figura 7-	Curva de sobrevida (Kaplan-Maier) de animais inoculados com TAE e tratados com β -lapachona (1, 2 ou 5mg/kg), por 3 dias consecutivos. O tratamento com a droga iniciou-se 24h após a inoculação das células do tumor de Ehrlich. * $p < 0,05$ Teste Cox-Mantel.....	43
Figura 8-	Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais e inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com extrato de <i>Tabebuia avellanedae</i> nas doses de 30, 120 e 500 mg/kg, por 7 dias após a inoculação do tumor. Os animais foram sacrificados 24h após o término do tratamento. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao TAE.....	46

- Figura 9-** Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais normais e inoculados com TAE (6×10^6 células/ml) e tratados com extrato de *Tabebuia avellanae* nas doses de 30, 120 e 500 mg/kg, por 7 dias após a inoculação do tumor. Os animais foram sacrificados 24h após o tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente do extrato. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $p < 0,01$ comparado ao controle, # $p < 0,01$ comparado ao TAE..... 47
- Figura 10-** Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais e inoculados com TAE (6×10^6 cel/animal) e tratados por 3 dias com β -lapachona (i.p.; 1, 2 e 5mg/kg). Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os grupos controle recebeu o diluente da droga. Os resultados indicam média e desvio padrão de 6 animais. ANOVA-Teste de Tukey. * $p < 0,01$ significativo em relação ao controle; # $p < 0,01$ significativo em relação ao TAE.... 48
- Figura 11-** Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais normais e inoculados com TAE (6×10^6 cel/animal) e tratados por 3 dias com β -lapachona (i.p.; 1; 2 e 5mg/kg). Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os grupos controle recebeu o diluente da droga. Os resultados indicam média e desvio padrão de 6 animais. ANOVA-Teste de Tukey. * $p < 0,01$ significativo em relação ao controle; # $p < 0,01$ significativo em relação ao TAE.... 49

Figura 12-	Atividade das células NK em animais normais e portadores do TAE e tratados com ETA 30, 120 ou 500mg/kg por 7 dias após a inoculação do tumor. Os animais foram sacrificados 24h após o tratamento. Os resultados indicam média e desvio padrão para as diferentes razões de células alvo: células efetoras (YAC-1). ANOVA-Teste de Tukey. * $p < 0,05$ significativo em relação ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao TAE.....	52
Figura 13-	Atividade das células NK em animais normais e portadores do TAE e tratados com β -lap 1mg/kg por 3 dias. Os animais foram sacrificados no oitavo dia após a inoculação tumoral. Os resultados indicam média e desvio padrão para as diferentes razões de células alvo: células efetoras (YAC-1). ANOVA-Teste de Tukey. * $p < 0,05$ significativo em relação ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao TAE.....	53
Figura 14-	Concentração de IFN γ (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 7 dias com 120mg/kg do ETA. Os tratamentos iniciaram 24h após inoculação e os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal Wallis, Teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$, comparado ao TAE.....	55
Figura 15-	Concentração de IFN- γ determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 3 dias com a β -lapachona (1mg/kg). Os tratamentos iniciaram 24h após inoculação e os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$, comparado ao TAE.....	56

- Figura 16-** Concentração de TNF α (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 7 dias com 120mg/kg do ETA. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal Wallis, Teste de Wilcoxon *p<0,05 comparado ao controle; # p<0,05, comparado ao TAE... 57
- Figura 17-** Concentração de TNF- α (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 3 dias com a β -lapachona (1mg/kg). Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon *p<0,05 comparado ao controle; # p<0,01, comparado ao TAE..... 58
- Figura 18-** Concentração de IL-10 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 7 dias com 120mg/kg do ETA ou com 1mg/kg de β -lap por 3 dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon *p<0,05 comparado ao controle; # p<0,05, comparado ao TAE..... 59
- Figura 19-** Concentração de IL-10 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 3 dias com a β -lapachona (1mg/kg/dia. Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon *p<0,05 comparado ao controle # p<0,05, comparado ao TAE..... 60

RESUMO



Com os recentes progressos na compreensão dos complexos mecanismos moleculares relacionados a diferentes aspectos da modulação imunológica, cada vez mais vem se tornando possível ampliar os conhecimentos acerca das potenciais interferências do ponto de vista imunopatogênico induzidas pela presença e evolução tanto de processos infecciosos quanto tumorais. Modelos experimentais vêm sendo desenvolvidos e aprimorados com a finalidade de criar condições controladas para avaliações de diferentes aspectos relativos a potenciais modificações no comportamento imunológico de linhagens celulares frente à ação de novos agentes. O modelo do Tumor Ascítico de Erlich apresentou-se como uma opção de interesse, uma vez que os conhecimentos experimentais sobre diferentes aspectos relativos a sua manipulação já fazem parte de consagrada linha de pesquisa nacional. Um dos comportamentos mais recentemente estudados a seu respeito se refere a condições onde ocorre a migração do fenótipo Th1 para Th2, relacionadas ao agravamento da doença. A busca de fontes naturais para conhecimento e aplicação de novos princípios ativos vem se caracterizando como uma das mais promissoras soluções do ponto de vista farmacêutico, e pode corresponder a uma importante área de exploração da biodiversidade nacional. Dessa forma, a proposta do presente estudo foi, unindo linhas de pesquisa bastante consolidadas e conhecimentos relativos à nossa biodiversidade, avaliar o potencial terapêutico, com foco em abordagens imunopatológicas, do extrato da planta *Tabebuia avellanedae* (ETA) através do modelo experimental Tumor ascítico de Ehrlich. Neste trabalho investigamos os efeitos do ETA e seu constituinte isolado, a β -lapachona (β -lap), sobre o crescimento e diferenciação de progenitores hematopoéticos [células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM)], a capacidade funcional das células “Natural Killer”(NK) e a produção das citocinas do perfil Th1 [fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ)] e do perfil Th2 [interleucina (IL)-10] de animais normais e portadores do TAE. Como esperado, o TAE produziu, concomitante à mielosupressão, um aumento no número de CFU-GM esplênico. O tratamento destes animais com a dose de 120mg/kg de ETA, administrado por 7 dias após a inoculação do tumor, demonstrou uma maior eficácia, produzindo aumento na mielopoiese, redução no número de colônias esplênicas e reversão dos fatores estimuladores de colônias (CSF) induzidos pelo TAE. Além disso, esta dose de ETA produziu a melhor eficácia na sobrevivência de animais portadores do TAE, aumentando em 42% a duração da sobrevivência. No

entanto, doses de 30 e 500mg/kg não afetaram a mielosupressão e a hematopoese extramedular induzidas pelo tumor. O tratamento dos animais portadores do TAE com 1, 2 ou 5mg/kg de β -lap por 3 dias após a inoculação do tumor resultou em um padrão semelhante de dose resposta, sendo a mielosupressão prevenida apenas com a dose de 1mg/kg. Interessante observar que esta dose prolongou a duração na sobrevivência de animais portadores do TAE de maneira similar à dose mais eficaz do ETA, ambos em 42%. Nosso estudo também demonstrou importantes diferenças entre os tratamentos com ETA e β -lap. Neste sentido, animais normais tratados com 2 e 5mg/kg de β -lap apresentaram hematopoese extramedular, respectivamente 2 e 3 vezes maior que o CFU-GM de animais normais. Além disso, uma drástica mielosupressão foi observada após tratamento com β -lap 5mg/kg, atingindo valores similares aos observados nos animais portadores do TAE e não tratados. Quanto à produção de citocinas, o tratamento com 120mg/kg de ETA impediu a polarização Th1-Th2 encontrada nos animais portadores do TAE. Neste sentido, o tratamento destes animais aumentou os níveis de secreção de TNF- α e IFN- γ e reduziu os níveis de IL-10, aumentados durante a evolução temporal do TAE. O estudo da atividade funcional das células NK em animais portadores do tumor e tratados com EAT demonstrou um aumento na capacidade citotóxica das células NK, a qual se encontrava reduzida. O tratamento destes animais com β -lap 1mg/kg impediu parcialmente a polarização Th1-Th2 em animais portadores, assim como demonstrou aumento parcial na capacidade citotóxica das células NK. Estes resultados sugerem que a eficácia antitumoral demonstrada pelo ETA pode estar relacionada com seu constituinte, a β -lap. Por outro lado, a ausência de constituintes associados presentes no extrato bruto pode ser responsável pelos efeitos inibitórios dose-dependentes deste composto na hematopoese de animais normais. A comparação entre efeitos de um extrato vegetal e um de seus constituintes ativos isolado é outro aspecto a ser considerado, sendo importante etapa no desenvolvimento de novos fármacos de origem vegetal.

ABSTRACT



In accordance with the recent progress in the understanding of immunological and molecular mechanisms related to the different aspects of immunological modulation, the improvement of knowledge about the potential interferences, at the immunopathogenic point of view, induced by the presence and evolution of infectious diseases or neoplastic process has increased. Experimental models have been developed and refined in order to create appropriate conditions to evaluate different aspects related to potential changes in the immunological behaviors of determinate cell lines with the presence of new pharmacological agents. The Ehrlich ascites tumor (EAT) model is an option of interest, since the accumulated experimental knowledge about its manipulation is part of a consolidated research line. One of its more recently studied behaviors is concerned with situations where the migration from Th1 to Th2 phenotype occurs, at the same time with the disease impairment. The search for new natural sources of pharmaceutical active principles and the careful and detailed studies about them, has been characterized as one of most promising therapeutic solutions at the moment, and would be seen as a strategic way to explore the national biodiversity. Therefore, the aim of the present study was to combine the well known techniques related to the Ehrlich ascites tumor changing behavior with a potential active principle from our botanical biodiversity, the *Tabebuia avellanadae* extract (TACE), in order to evaluate its immunological therapeutic potential. The effects of TACE and its isolated naphthoquinone, β -lapachone (β -lap), on the growth and differentiation of granulocyte-macrophage progenitor cells in normal and EAT-bearing mice were studied. Myelosuppression concomitant with an increased number of spleen CFU-GM was observed in tumour-bearing mice. Treatment of these animals with the dose of 120mg/Kg TACE given for seven days after tumour inoculation elicited optimal modulatory effects on bone marrow formation and also produced a favourable response for the reduction of splenic haematopoiesis. Increased serum colony-stimulating activity induced by the tumour was also reversed with this dose-regimen. In addition, this dose-schedule showed the better efficacy in prolonging life span of EAT-bearing mice, with an extension of 42% in the duration of survival. Conversely, the doses of 30 and 500mg/kg hardly affected the myelosuppression and extramedular hematopoiesis induced by the tumor. Treatment of tumour-bearing mice with 1, 2 and 5mg/kg β -lap given for 3 days after tumour inoculation resulted in a similar pattern of dose response, with tumour-induced myelosuppression being

prevented only with the 1mg/kg dose. Surprisingly, this dose-schedule prolonged the duration of survival by the same rate of 42% observed with the optimal dose of TACE. However, an important divergent response of β -lap was its stimulating effect on the extramedullary hematopoiesis of normal mice treated with the doses of 2 and 5mg/kg, which produced, respectively, 2 and 3-fold increases of CFU-GM in the spleen. In addition, in the group of normal mice exposed to the dose of 5mg/kg, a drastic reduction in the number of bone marrow CFU-GM was observed, reaching levels as low as those found in non-treated tumour bearers. We also investigated the effects of TACE and β -lap on the natural killer cell activity (NK) and on Th1 [tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ)] and Th2 [interleukin (IL)-10] responses in normal and EAT-bearing mice. Regarding the production of cytokines, the treatment with TACE blocked the Th1-Th2 polarization found during the EAT progression. In this respect, the treatment of these animals with TACE 120mg/kg increased the TNF- α and IFN- γ levels and reduced the levels of IL-10, increased during the temporal evolution of EAT. In relation to the functional activity of NK cells, the treatment with this same dose of TACE enhanced the NK cell function, reduced during the EAT growth. The treatment of these animals with β -lap 1mg/kg produced a significant, but partial response on NK cell activity on EAT-bearing mice. In this respect, this compound only partially increased the TNF- α and IFN- γ levels and reduced the levels of IL-10, increased during the temporal evolution of EAT. These findings suggest that the antitumoral efficacy demonstrated by the crude extract of *T. avellanedae* might be related to its constituent, the β -lapachone. On the other hand, the absence of the associated constituents present in the crude extract might be responsible for the dose-dependent inhibitory effect of this biosynthetic compound on normal murine hematopoiesis. The comparison between a total vegetal extract and some of its isolated compounds remain another significant aspect in phytochemical research, specially focused in new medicines discovery.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Evolução da quimioterapia no tratamento do câncer

O objetivo da pesquisa quimioterápica visa, principalmente, a descoberta de novos agentes capazes de inibir especificamente a multiplicação viral e de células neoplásicas, sem afetar a divisão celular normal. A partir da década de 40, ocorreu enorme progresso na compreensão dos processos neoplásicos, havendo uma rápida expansão no arsenal de agentes citotóxicos disponíveis. Entretanto, o avanço no tratamento de tumores de ocorrência freqüente é ainda modesto. Somente no Brasil, estima-se a ocorrência de aproximadamente 90.000 óbitos por ano, chegando-se a mais de 4 milhões em todo o mundo (SARDENBERG, 1996). Além disso, a mortalidade por câncer em nosso país vem crescendo desde 1979 (8%) até 2004 (12,7%), representando um aumento em torno de 150% em apenas 15 anos (BRASIL 2005 INCA – MINISTÉRIO DA SAÚDE). Isto faz do câncer uma doença emergencial, sendo fundamental o desenvolvimento de novas drogas, visando terapias mais eficientes.

Os tratamentos de primeira escolha atualmente empregados na terapia do câncer, a quimioterapia e a radioterapia, são destituídos de toxicidade seletiva, provocando efeitos colaterais graves, dentre eles a inibição da resposta imune, crítica para a recuperação do paciente. Neste contexto, citoredução induzida quimicamente tem sido utilizada não apenas no tratamento de neoplasias, mas também para abrogar a medula óssea em situações de transplante deste órgão. Entretanto, a eficácia da quimioterapia contra tumores avançados depende da intensidade das drogas utilizadas (HRYNINK & LEVINE, 1986; GRISWOLD *et al.*, 1987). O tratamento com tais agentes é limitado principalmente por mielossupressão e imunossupressão, além de outros efeitos colaterais em células normais (FISHER & PETERS, 1994; TANOSAKI *et al.*, 1994; PARKER & PRAGNELL, 1995). Neste caso, a indução farmacológica de uma resposta imune apropriada, ou a modulação do sistema imune, são ferramentas úteis que visam, principalmente, aumentar ou restabelecer os mecanismos de defesa próprios do hospedeiro para agir contra as células cancerosas.

O potencial para o tratamento de pacientes portadores de tumores empregando-se estratégias complementares (coadjuvantes), vem crescendo à medida que novos avanços são conquistados na compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da resposta imune. Diferentes estágios da resposta imune constituem alvos atrativos para o

desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Com relação à potencialização da resposta imune, o amplo espectro das citocinas, quimiocinas e seus receptores fornecem o principal alvo para a intervenção imune (MALE *et al.*, 1996). Resultados encorajadores quanto ao potencial de compostos sintéticos ou naturais para modificar a resposta imune através de mecanismos que mimetizam a ação das citocinas, têm ampliado o interesse na exploração de drogas alternativas com atividades direta ou indireta sobre diferentes alvos celulares.

Uma vez que a natureza da resposta imune é definida não apenas pela sua especificidade, mas também pelos mecanismos efetores que são induzidos, a compreensão dos fatores que determinam o perfil de secreção das citocinas é fundamental para o estabelecimento de terapias alternativas baseadas na seleção de uma resposta imunológica efetiva. A esse respeito, nos últimos anos, o estudo das conseqüências biológicas da diferenciação de células T precursoras em Th1 ou Th2, em termos de suscetibilidade ou resistência a uma doença em particular, tem atraído grande atenção, e, como conseqüência, as bases moleculares para a diferenciação de células Th (O’GARRA, 1996). Além disso, pesquisas recentes têm associado uma alteração no fenótipo de Th1 para Th2 durante a evolução tumoral (GHOSH *et al.*, 1995). Desde que cada uma destas subpopulações de células Th produz uma série de citocinas reguladoras (TRINCHIERI, 1996), torna-se evidente a importância de se estabelecer o impacto destes novos agentes sobre estas células, contribuindo para o esclarecimento de importantes aspectos da resposta imunológica comprometidos com a inibição da progressão tumoral.

1.2- *Tabebuia avellanedae*

A família Bignoniaceae compreende 120 gêneros, amplamente distribuídos nas regiões tropicais de todo o mundo, especialmente freqüentes nos trópicos americanos. São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas e também trepadeiras (JOLY, 1998). O gênero *Tabebuia* conta com cerca de 100 espécies, e dentre elas a *T. avellanedae* merece atenção especial devido ao seu efeito terapêutico promissor e sua riqueza em naftoquinonas, cujos níveis são expressos em porcentagem de lapachol; principal constituinte químico identificado neste gênero.

A *Tabebuia avellanedae* é uma árvore de grande porte, originária das Américas do Sul e Central, sendo muito comum no Brasil, da Amazônia até o Centro Sul. Os nomes populares Pau D'arco e Ipê são usados para diversas Bignoniaceae, sobretudo dos gêneros *Tabebuia* e *Tecoma*. Diversas espécies são conhecidas nos países latino-americanos como Lapacho. Os índios Tupis e Guaranis denominavam esta árvore de “tajy”, que significa “possuir força e vigor”, e utilizavam sua casca no tratamento de diversas patologias, como malária, anemia, problemas respiratórios, micoses, febre, artrite e reumatismo, picadas de cobra, sífilis e câncer. Seu uso popular é descrito por toda a América Latina (ESTRELLA, 1995; FETROW & ÁVILA, 2001; ALONSO, 2004); onde é largamente empregada como antianêmica, imunoestimulante, tônica, para enfermidades das vias respiratórias e como antitumoral; utilizada na forma de decocção ou maceração do córtex. O decocto também é utilizado externamente em casos de feridas, queimaduras, contusões e candidíase.

O perfil fitoquímico da planta foi extensivamente estudado, e muitos constituintes ativos foram identificados e isolados, como furanonaftoquinonas, quinonas, derivados benzaldeídicos, flavonóides, iridóides, glicosídeos fenólicos e naftoquinonas (ALONSO, 2004). Atividades farmacológicas têm sido atribuídas principalmente à presença de naftoquinonas, que constitui o mais prevalente grupo químico ativo no vegetal, sendo o lapachol o constituinte presente em maior concentração. Muitas atividades terapêuticas do vegetal têm sido atribuídas ao lapachol, tais como atividades antimicrobiana e antifúngica (BINUTU *et al.*, 1994), cercaricida (prevenção da penetração de cercarias de *Schistosoma mansoni* na pele) (AUSTIN *et al.*, 1977), ação moluscicida (atividade contra caramujos *Biophalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*) (SANTOS *et al.*, 2000), leishmanicida (TEIXEIRA *et al.*, 2001), tripanossomicida (PINTO *et al.*, 2000), antimalárica (CARVALHO *et al.*, 1988), antiinflamatória (ALMEIDA *et al.*, 1990) e antiulcerante (GOEL *et al.*, 1987).

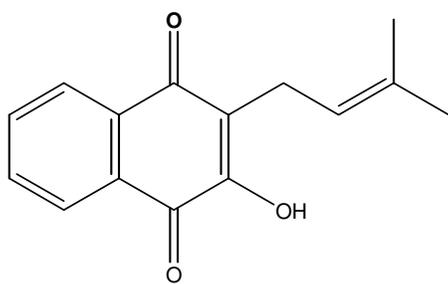
Poucos estudos *in vivo* foram realizados com o extrato bruto de *Tabebuia avellanedae*. MIRANDA *et al.*, (2001) realizaram ensaios no qual foram verificadas as atividades antiedematogênica e antinociceptiva em ratos. A toxicidade aguda demonstrou baixo perfil tóxico, onde doses de até 5g/kg não apresentaram efeito letal.

Estudos experimentais demonstraram uma significativa atividade antitumoral do lapachol contra carcinoma de Walker 256 e sarcoma de Yoshida (FERREIRA DE SANTANA *et al.*, 1968). Estes achados encorajaram o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos a investigar o potencial antitumoral deste constituinte em pacientes portadores com câncer. Na década de 70, iniciaram-se estudos pré-clínicos e toxicológicos por meio da administração oral de lapachol, em doses que variaram entre 250 e 3750mg. Entretanto, demonstrou-se que doses maiores que 1500mg diários ocasionavam náuseas, vômitos e aumento do tempo de protrombina. Dessa maneira, estes estudos não comprovaram a atividade antitumoral largamente utilizada na medicina popular. Anos mais tarde, questionou-se a metodologia empregada nestes ensaios, uma vez que foi utilizado um único constituinte ativo, e não o extrato bruto da *T. avellanae* (JONES, 1994; ALONSO, 2004). Estes resultados negativos reduziram drasticamente o interesse da comunidade científica por novas investigações com este composto.

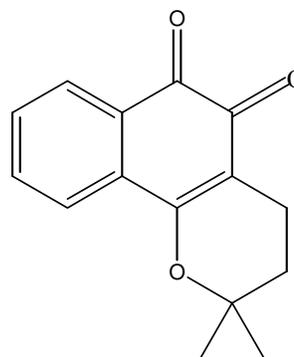
Outro constituinte da planta que tem atraído interesse é a β -lapachona (β -lap; 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2-b]piran-5,6-diona), uma naftoquinona lipofílica com potente atividade citotóxica frente a várias linhagens tumorais, como as de leucemia murina (SCHAFFNER-SABBA *et al.*, 1984), câncer epidermóide laríngeo (FRYDMAN *et al.*, 1997; DOLAN *et al.*, 1998), melanoma (BOOTHMAN *et al.*, 1989), hepatoma (LAI *et al.*, 1998), câncer de ovário (DEGRASSI *et al.*, 1993), câncer de mama (LI *et al.*, 1999; PINK *et al.*, 2000a, 2000b), câncer de pulmão, de próstata (DOLAN *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1999) leucemia humana (CHAU, *et al.*, 1998; PLANCHON *et al.*, 1999; SHIAH *et al.*, 1999), carcinoma de cólon (LI *et al.*, 1995, 1999; DOLAN *et al.*, 1998; CHAU *et al.*, 1998; HUANG & PARDEE, 1999), linfoma e glioma (MANNA *et al.*, 1999). Na maioria destes estudos, a citotoxicidade da β -lap foi avaliada verificando sua capacidade em inibir a proliferação celular *in vitro*, avaliada por contagem de células, citometria de fluxo ou produção de colônias. Estes estudos demonstraram efeitos citotóxicos reproduzíveis com concentrações entre 1.0 e 10 μ M na maioria dos tumores estudados.

Esta atividade se atribui à sua capacidade em induzir a síntese de produtos reativos do oxigênio (ROS; anion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio) (FERNANDÉZ VILLAMIL *et al.*, 1997). Um melhor conhecimento dos mecanismos

moleculares afetados pela β -lap permitiram identificar também suas ações diretas em enzimas ou sistemas enzimáticos, como a DNA Topoisomerase I (LI *et al.*, 1993) Topoisomerase II (FRYDMAN *et al.*, 1997) e a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). A ação da β -lap sobre as topoisomerases leva à inibição da replicação do DNA, com conseqüente morte da célula, enquanto que a PARP constitui um fator essencial para a manutenção da estrutura de DNA e a integridade genômica. A inibição destas enzimas reparadoras de DNA contribui para o efeito apoptótico da β -lap, que implica em um complexo processo que também inclui: produção de ROS, ativação da quinase c-JUN Nh2-quinase terminal (JNK); ativação da caspase 3 (CCP32/Yama) e outras, dano irreversível ao DNA nuclear por ativação de nucleases (DUBIN *et al.*, 2001). Neste sentido, KIU *et al.* (2002) demonstraram que a β -lap age em células de osteocarcinoma humano (U2-OS) por necrose celular independente do estresse oxidativo, e não por apoptose, indicando que o seu mecanismo de atuação está relacionado também com o tipo de célula cancerígena. LEE *et al* (2005) demonstraram que a β -lap reduz o crescimento de células tumorais de próstata por indução de apoptose através de um aumento na expressão de Bax/Bcl2 e ativação da caspase-3, concomitante com diminuição de PGE₂ e atividade da telomerase, por diminuir os níveis de COX₂ e hTert (telomerase transcriptase reversa).



lapachol



beta-lapachona

Figura 1- Estrutura química do lapachol e da β -lapachona.

1.3- O Tumor de Ehrlich

Em 1905, Ehrlich e Apolant descreveram o aparecimento de um tumor espontâneo na região da glândula mamária de um camundongo fêmea. Naquela ocasião foi observado se tratar de um tumor maligno e testes de transplantabilidade mostraram a capacidade de crescimento em camundongos receptores. Desde então, o tumor de Ehrlich tem sido amplamente utilizado em estudos fisiopatológicos associados aos efeitos sistêmicos comprometidos com a evolução temporal do tumor. Por outro lado, o tumor de Ehrlich oferece inúmeras vantagens como modelo tumoral experimental para a avaliação da atividade e mecanismo antitumoral de diferentes compostos. Tais características incluem, basicamente, a sua inespecificidade frente a diferentes linhagens murinas, sendo facilmente transplantável, com porcentagem de “pega” de até 100%. Além disso, diferentes vias de inoculação podem ser utilizadas para a administração das células tumorais possibilitando desde o crescimento subcutâneo de tumores sólidos, até a formação abundante de líquido ascítico como resultado da inoculação de uma suspensão de células tumorais na cavidade peritoneal dos animais (Fig.2, 3 e 4). Desta forma, as células do TAE crescem rapidamente em praticamente qualquer linhagem de camundongos, podendo induzir tumores sólidos ou ascíticos que levam o hospedeiro à morte, mesmo quando administradas em doses extremamente baixas.

Inúmeros estudos acerca dos mecanismos imunológicos envolvidos no tumoral têm explorado o papel das respostas imunes humoral e celular contra este tumor. Apesar da sua inespecificidade, proteção pode ser facilmente induzida em camundongos por imunização prévia com células ascíticas inativadas (DONALDSON & MITCHELL, 1959; MCKEE *et al.*, 1959; LITTMAN *et al.*, 1968; SETHI & BRANDIS, 1974). Além disso, já está bem estabelecido que os mecanismos envolvidos na inibição do crescimento tumoral não são direcionados contra os antígenos do complexo de histocompatibilidade principal nas células tumorais (CHEN & WATKINS, 1970). Desta forma, antígenos tumorais específicos tornaram-se os principais candidatos para o estabelecimento de uma resposta imune, fornecendo uma oportunidade ao estudo das relações entre resposta mediada por anticorpos e resistência do hospedeiro ao crescimento tumoral (SUBIZA *et al.*, 1987; GIL *et al.*, 1990).

Por outro lado, imunidade celular foi sugerida inicialmente por análise citológica (THUNOLD, 1968) e em estudos de transferência celular (MAZUREK & DUPLAN, 1961; LINDEMANN, 1969). MARUSIC (1979) investigou a resposta imune contra o TAE utilizando camundongos deficientes em células T, onde resultados demonstraram que a indução de imunidade é também dependente destas células. Trabalhos mais recentes têm demonstrado que a supressão na resposta de linfócitos Th e células NK é uma consequência inevitável do crescimento tumoral (PARHAR & LALA, 1988; TAKAHASHI *et al.*, 1992; SHEWCHUK *et al.*, 1996; SEGURA *et al.*, 1997). Vários mecanismos têm sido descritos como sendo responsáveis pela supressão imune induzida pelo tumor, incluindo a regulação negativa de fatores de crescimento, a produção de citocinas imunossupressoras e a indução de macrófagos e células T supressoras (PARHAR & LALA, 1988; UTSUMI *et al.*, 1990; WATSON *et al.*, 1991; MANTOVANI *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1995; ELGERT *et al.*, 1998).

A influência do crescimento tumoral na proliferação e diferenciação das células pluripotentes (CFU-S) e nas células progenitoras (CFU-C) tem sido sugerida por inúmeras observações. Como muitos outros tumores experimentais, o tumor de Ehrlich produz alterações severas no sistema hematopoético do hospedeiro (DELMONTE *et al.*, 1966; CLERICI *et al.*, 1971; LALA *et al.*, 1977; KEEB & LALA, 1978; WHITNEY *et al.*, 1978; PESSINA *et al.*, 1982^{a,b}; RUIZ DE MORALES *et al.*, 1999). Neste aspecto, o envolvimento de fatores solúveis produzidos pelas células tumorais ou pela interação tumor-hospedeiro nos mecanismos homeostáticos da medula óssea tem sido proposto. PESSINA *et al.* (1982a) verificaram que o pré-tratamento *in vitro* de células de medula óssea normais com fluido ascítico de Ehrlich produz uma redução severa no número de colônias formadas a partir de células precursoras da medula óssea (CFU-C) e de células pluripotentes (CFU-S). Ademais, foi observada uma maior sensibilidade do compartimento granulocítico-macrofágico aos efeitos provocados pelo crescimento tumoral (PESSINA *et al.*, 1982b) (Fig.5).

Vários exemplos estão disponíveis na literatura relatando o emprego do TAE como modelo experimental para o estudo da atividade antineoplásica e imunoreguladora de diversos compostos. Tais compostos incluem: polissacarídeos provenientes da parede

celular de bactérias ou raízes; extratos naturais de plantas e algas; moléculas sintéticas; organometálicos ou ainda sais inorgânicos (KOPF-MAIER & HESSE, 1984; SUZUKI *et al.*, 1985; ABOUL-ENEIN, 1986; TAKAHASHI *et al.*, 1986; MIYAZAWA *et al.*, 1988; ONO *et al.*, 1988; KITA *et al.*, 1989; OLINESCU *et al.*, 1989, 1991; ORRACA *et al.*, 1989; RIOS-OLIVARES *et al.*, 1989; YOSHIDA *et al.*, 1991; KUTTAN & KUTTAN, 1992; SINGH *et al.*, 1992; YAN, 1992; XIANG & LI, 1993; CAI & JIANG, 1994; WONG *et al.*, 1995; BEEKMAN *et al.*, 1997; SUR *et al.*, 1997; MORGAN *et al.*, 1998; MYLONAKI-CHARALAMBOURS *et al.*, 1998; VALADARES *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 2006; JAGETIA & RAO, 2006). Diferentes parâmetros da imunidade celular, imunidade humoral e imunidade inespecífica são estudados a fim de se caracterizar o mecanismo de ação antitumoral frente ao sistema imunológico do hospedeiro.

Resultados encorajadores vêm sendo obtidos em nosso laboratório com o uso deste modelo experimental. Dos produtos naturais ou sintéticos que até agora mostraram atividade antitumoral podemos citar a *Chlorella vulgaris* (JUSTO *et al.*, 2001), *Pluchea quitoc* (QUEIROZ *et al.*, 2001a), *Caesalpinia ferrea* (QUEIROZ *et al.*, 2001b), Geléia real (BINCOLETTO, 2005), produto do metabolismo fúngico (MAPA) (JUSTO *et al.*, 2000 e 2003), *Euphorbia tirucalli* (VALADARES *et al.*, 2006) e derivados titanoceno (VALADARES *et al.*, 1998; 2003; 2004; 2006). Um perfil da resposta terapêutica dos compostos em estudo consiste na reversão da profunda mielossupressão medular e da acentuada mieloestimulação extra-medular (esplênica) induzida pelo tumor. Resultados positivos são aqueles que aumentam a taxa ou a duração da sobrevivência e reduzem o crescimento tumoral na cavidade abdominal. Em adição aos inúmeros trabalhos disponíveis na literatura, estes resultados vêm corroborar o emprego do tumor de Ehrlich como modelo tumoral experimental e também sua utilização em estudos da atividade imunomoduladora de diferentes compostos.

O uso etnofarmacológico da *Tabebuia* como agente antitumoral, associado à falta de estudos *in vivo* com este vegetal e seus constituintes, nos levaram a investigar as propriedades mieloprotetoras da *T. avellanedae* e da β -lapachona no modelo experimental tumor ascítico de Ehrlich.



Figura 2- Camundongo portador de Tumor Ascítico de Ehrlich.

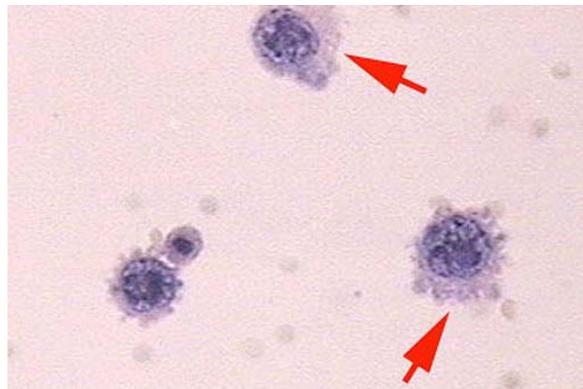


Figura 3- Células de Tumor Ascítico de Ehrlich coradas com PAS

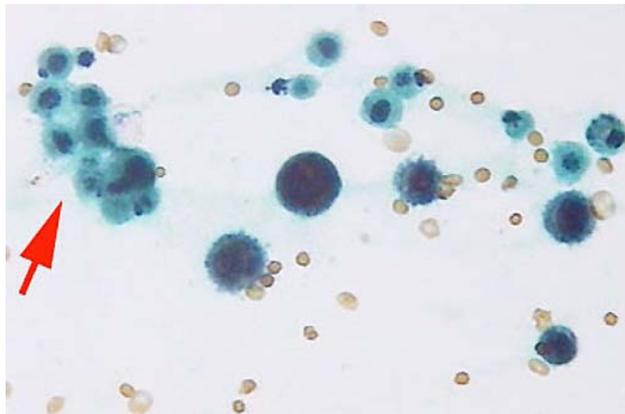


Figura 4- Coloração de Papanicolau em células de Tumor Ascítico de Ehrlich.

2- OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram avaliar os efeitos do extrato bruto de *Tabebuia avellanedae* (ETA) e do princípio ativo isolado β -lapachona (β -lap) sobre a resposta imunohematopoiética de camundongos portadores do Tumor ascítico de Ehrlich. Os parâmetros avaliados foram:

- ⌘ Avaliar a eficácia terapêutica dos compostos, através do prolongamento da sobrevivência de animais portadores do TAE
- ⌘ Investigar os efeitos dos dois compostos sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço para a série granulócito e macrófago (CFU-GM) em animais normais e portadores do Tumor ascítico de Ehrlich
- ⌘ Verificar a atividade estimuladora do soro (CSA) de animais portadores do TAE e tratados com ETA e β -lap.
- ⌘ Investigar os efeitos do ETA e β -lap sobre a atividade das células NK em animais normais e portadores do tumor;
- ⌘ Avaliar a atividade moduladora dos dois compostos sobre a produção das citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α) e Th2 (IL-10).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Para realização dos experimentos *in vivo* utilizamos camundongos machos BALB/c, com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas em sala climatizada com ciclos claro-escuro de 12 h. Ração comercial e água foram fornecidas aos animais *ad libitum*. O protocolo experimental foi submetido à Comissão de Ética em pesquisa animal desta universidade.

3.2- *Tabebuia avellaneda*

O extrato hidroalcoólico de *Tabebuia avellaneda* (ETA) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Plantas Medicinais Prof. Walter Radamés Accorsi (Escola Agrícola Luiz de Queiroz ,ESALQ, USP, Piracicaba, SP). O extrato foi preparado de acordo com a Farmacopéia Brasileira 1º ed. e padronizado quanto ao teor de naftoquinonas (0,3% de naftoquinonas totais).

O extrato foi diluído em solução salina imediatamente antes do uso em concentrações apropriadas.

Grupos de animais normais e portadores do tumor ascítico de Ehrlich receberam ETA (0.2 ml/animal) por gavagem de acordo com os protocolos descritos no item 3.5.

3.3- Beta-lapachona

Beta-lapachona (SigmaTM) foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em solução salina imediatamente antes do uso. Grupos de animais normais ou portadores do tumor de Ehrlich receberam, intraperitoneamente, 1, 2 ou 5mg/kg (0,1mL/ animal) ao dia, por 3 dias consecutivos. O tratamento com β -lapachona iniciou-se 24 h após a inoculação do tumor.

3.4- Tumor ascítico de Ehrlich (TAE)

A linhagem tumoral de Ehrlich foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Szulim Zyngier, do Departamento de Farmacologia do ICB-USP, sendo originalmente obtida de uma linhagem do Hospital do Câncer, São Paulo. Ela é mantida nas dependências do laboratório por meio de passagens sucessivas intraperitoneais entre animais.

As células tumorais de Ehrlich crescem como células ascíticas na cavidade peritoneal do camundongo. Para o desenvolvimento do tumor de Ehrlich, camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 0,1ml de uma suspensão de células tumorais contendo 6×10^7 células/ml, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos.

Após a retirada do líquido ascítico do peritônio de camundongos doadores, o número e a viabilidade das células tumorais foram determinados pela exclusão do corante azul-tripan 0,2%, em câmara de Neubauer.

3.5- Tratamento dos animais

Os animais foram divididos em grupos, e cada grupo foi submetido ao tratamento de acordo com o protocolo experimental, a saber:

- 1- animais controle que receberam somente o veículo;
- 2- animais apenas inoculados com TAE;
- 3- animais apenas tratados, durante 7 dias, com o extrato de *Tabebuia avellanedae* (ETA), nas doses de 30, 120 e 500mg/kg;
- 4- animais inoculados com TAE e tratados com ETA nas doses de 30, 120, 500mg/kg. O tratamento iniciou-se 24 h após a inoculação do tumor, e os animais foram tratados por 7 dias, sendo sacrificados 24 h após o último dia de tratamento.

5- animais apenas tratados, durante 3 dias, com β -lap, nas doses de 1, 2 e 5mg/kg. Os animais foram sacrificados no oitavo dia após o início do tratamento.

6- animais inoculados com TAE e tratados, durante 3 dias, com β -lap, nas doses de 1, 2 e 5mg/kg. O tratamento iniciou-se 24 h após a inoculação do tumor e os animais foram sacrificados no oitavo dia de progressão tumoral.

3.6- Padronização da metodologia de cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C)

Após sacrificar-se o animal por meio de deslocamento cervical, a pele foi limpa com álcool iodado. Após a exposição do fêmur, a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal foi removida e o osso na junção superior cortado. A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI-1640 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Os baços foram removidos assepticamente, lavados com salina estéril e preparados como suspensões celulares em meio RPMI com o auxílio de um macerador. As suspensões foram mantidas no gelo.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em eosina 10%.

Preparou-se o meio mais ágar (Bacto-ágar, DifcoTM), o qual consiste de:

- 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium-DifcoTM) 2x concentrado;
- 20% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab®);
- 50% de ágar (0,6%, Bacto-ágar, DifcoTM).

A seguir, adicionou-se o volume apropriado de células da medula (1×10^5 células/mL) ou do baço (2×10^5 células/ml) quando o meio mais ágar estava a 37°C . As células foram ressuspensas e distribuídas em volumes de 2,0ml em cada placa de Petri, as quais já continham o estímulo apropriado (100 μL de SCM). O conteúdo foi distribuído por toda a superfície da placa de Petri e deixou-se gelificar. Incubou-se por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO_2 no ar e a seguir contou-se o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40 x. Para o estudo morfológico, as colônias foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/hematoxilina (METCALF, 1984).

3.7- Preparo do Meio condicionado de células esplênicas

Baços de camundongos Balb/c foram removidos sob condições assépticas e delicadamente passados em peneira de aço inoxidável estéril. Em seguida, preparou-se uma suspensão contendo 2×10^6 células/mL de meio RPMI contendo 10% de soro humano inativado (30 minutos a 56°C). A este meio foi adicionado 5×10^{-5} mol/L de 2-mercaptanol (concentração final) e 0,05mL de Pokeweed mitogen (GibcoTM, Grand Island, NY, USA)/ ml de meio. Incubou-se por sete dias a 37°C em estufa de CO_2 . Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em filtro membrana de 0,22 μm (MilliporeTM).

A atividade funcional do CSF foi determinada mediante os estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoéticas de animais normais em meio semi-sólido.

De acordo com Van Den Engh & Bol, 1975, a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias será considerada como 1 unidade de CSF/mL. A curva obtida mostrando a capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades por ml deste lote de SCM está apresentada na fig.5.

Podemos observar que a resposta supramáxima, ou seja, aquela que permite que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar, foi obtida com diluições de até 1:4 do concentrado de SCM, sendo esta diluição a escolhida para a utilização desse lote de SCM (Tab.1, Fig 5)

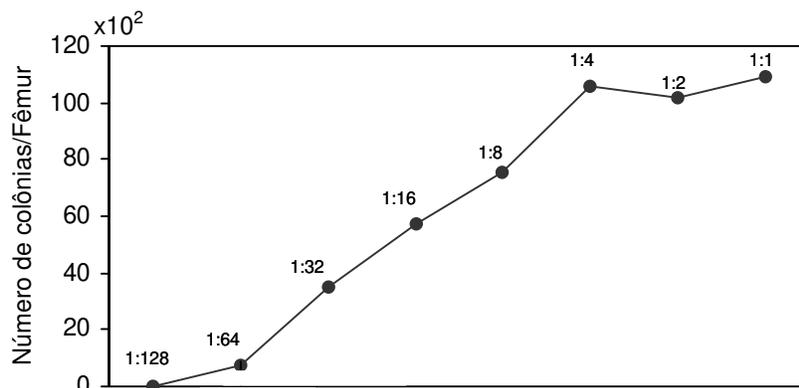


Figura 5- Curva de capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades por ml.

Tabela 1- Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c.

Diluição SCM	CFU-C x 10 ^{2*}
1:1	108,2 ± 4,2
1:2	101 ± 3,5
1:4	103,6 ± 5,1
1:8	74,6 ± 4,2
1:16	54,6 ± 4,0
1:32	33,2 ± 3,0
1:64	7,62 ± 1,2
1:128	0

* Número total de colônias por fêmur

Resultados obtidos em duplicata por diluição (Média ± SD)

3.8- Obtenção do soro de animais portadores do tumor e tratados com ETA e β -lap para avaliação da presença de fator estimulador de colônias (CSF)

O sangue de animais apenas portadores do TAE, e portadores do tumor e tratados com ETA (30, 120 e 500mg/kg) ou β -lap 1mg/kg foi coletado através de punção do plexo ocular, sendo separado em “pools”, centrifugado para a obtenção do soro, e este armazenado a -20°C. A produção de CSF do soro destes animais foi determinada através de sua capacidade promotora de crescimento e diferenciação de precursores da medula óssea de animais normais.

3.9- Atividade das células Natural Killer (NK)

3.9.1- Manutenção e preparo das células alvos

Para o ensaio de atividade das células Natural Killer (NK), as células alvo utilizadas pertencem à linhagem tumoral YAC-1. Esta linhagem utilizada *in vitro* é uma sublinhagem do linfoma de células T murino AC (induzido pelo vírus Maloney), adaptado para crescer em suspensão. Esta foi mantida em cultura contínua *in vitro* em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Células YAC-1 incorporam o isótopo crômio-51 (⁵¹Cr), que se liga a proteínas. As células NK (células efectoras) ao serem colocadas em contato com as células alvo (YAC-1) promovem a lise e a liberação do crômio para o sobrenadante da cultura. A atividade citotóxica das células NK é proporcional à quantidade de crômio liberada no meio.

Em relação ao ensaio de citotoxicidade, 5 x 10⁶ células alvo foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% SBF e ressuspendidas em 0,2 mL de SBF. Em seguida, as mesmas foram marcadas com 100 μ Ci de cromato de sódio marcado (IPEN) por um período de 90 minutos a 37°C sob agitação periódica. Novamente, lavou-se e ressuspendeu-se as células em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF e ajustou-se a concentração de 1 x 10⁵ células por ml.

3.9.2- Células efetoras esplênicas

Oito dias após a inoculação do TAE, baços de camundongos submetidos aos referidos tratamentos, foram coletados assepticamente e homogeneizados utilizando-se meio RPMI-1640. As células mononucleares foram separadas em gradiente Ficoll-Hypaque (d=1,077; Ficoll-Sigma; Hypaque-Pharmacia, Piscataway, USA) e lavadas e ressuspensas em 10 ml de meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF e incubadas em placa de Petri por 90min em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂. Após este período, as células não aderentes (sobrenadante) foram cuidadosamente aspiradas da placa, lavadas e ressuspensas em 10 ml de meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF, ajustando-se a concentração para 5 x 10⁶ células por ml. A atividade citotóxica das células NK foi avaliada contra as células alvo YAC-1 (célula de referência para NK), em ensaio de liberação de ⁵¹Cr.

3.9.3- Ensaio de liberação de ⁵¹Cr

Em microplacas de cultura (Corning – 96 wells) foram adicionados 100µL da suspensão de células efetoras, efetuando-se diluições seriadas em triplicatas, e com reserva de três orifícios para a lise espontânea (100 µL de SBF ou meio de cultura) e outros três para a lise máxima (100 µL de Extran).

A seguir, 100 µL de células alvo previamente marcadas com ⁵¹Cr foram distribuídos nos orifícios de reação e controles. Após centrifugação a 800 rpm por 5 minutos, a placa foi incubada por 4 h em estufa úmida a 37° com 5% de CO₂. A seguir, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm e 100 µL do sobrenadante foi transferido para tubos plásticos. A leitura foi realizada em contador gama (Gamma Counter 5500B-BeckmannTM, Irvine, USA) e os resultados expressos em porcentagem de lise específica.

$$\text{Porcentagem de lise específica} = \frac{\text{lise teste} - \text{lise espontânea}}{\text{lise máx.} - \text{lise espontânea}} \times 100$$

3.10- Dosagem de citocinas

As concentrações de IFN- γ , IL-10 e TNF- α foram dosadas no sobrenadante de culturas de células esplênicas pelo método imunoenzimático – ELISA de captura – utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para cada citocina e as especificações do fabricante (PharmingenTM, San Diego, CA, USA)

Baços de camundongos foram coletados assepticamente e homogeneizados utilizando-se meio RPMI 1640. Células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise ao botão celular previamente concentrado. Após lavagem em meio RPMI, as células foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF).

Em placa de cultura de 24 poços (Corning) contendo 800 μ L de meio RPMI enriquecido com 5% de SBF, foram adicionados 200 μ L de suspensão celular e 50 μ L de solução de Con A (2,5 μ g/mL). Concomitantemente também foram incubadas células de cada amostra sem Con A. As placas então foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Após 48 h de incubação, foram coletados os sobrenadantes para a dosagem das citocinas (IFN- γ e IL10).

As citocinas foram dosadas pelo método imunoenzimático, utilizando-se os anticorpos monoclonais correspondentes (PharmingenTM, San Diego, CA, USA).

Nos orifícios de uma placa de microcultura para ELISA (“maxi sorp”- 96 wells, NuncTM) foram adicionados 100 μ L do anticorpo monoclonal de captura anti-citocina (0,5-4 μ g/mL). A placa protegida adequadamente foi incubada overnight a 4°C. Após este período, os orifícios foram lavados duas vezes com solução PBS /Tween (0,5mL de Tween-20 em 1L de PBS). Em seguida, adicionou-se 200 μ L de PBS contendo 10% de SBF por orifício e a placa foi mantida à temperatura ambiente por 2 h. Lavou-se novamente duas vezes com solução PBS/Tween.

As amostras (sobrenadante proveniente das culturas) e os padrões (anticorpo recombinante diluído em PBS enriquecido com 10% de SBF) foram adicionados a um volume de 100 μ L por orifício e a placa foi incubada novamente overnight, à

temperatura ambiente. Após este período, lavou-se a placa de cultura quatro vezes utilizando-se solução PBS/Tween.

O anticorpo monoclonal de detecção anti-citocinas (biotinilado) foi diluído em PBS enriquecido com 10% de SBF (0,5- 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 100 μL foram adicionados por orifício. Incubou-se a temperatura ambiente por 45 minutos e em seguida lavou-se seis vezes com solução PBS/Tween.

Adicionou-se 100 μL de uma solução de avidina-peroxidase diluída em PBS contendo 10% de SBF (1:400 de uma solução 1 mg/mL , Sigma). Incubou-se por mais 30 minutos a temperatura ambiente e lavou-se oito vezes com solução PBS/Tween.

Nesta etapa o substrato foi preparado adicionando-se 10 μL de H_2O_2 30% e um comprimido de OPD (diidrocloreto de o-fenilenodiamina) a 10mL de tampão citrato, pH 5,6. Adicionou-se 100 μL do substrato por orifício e deixou-se desenvolver a cor por um período de 10-80 minutos, à temperatura ambiente. A reação pôde ser interrompida adicionando-se 20 μL de H_2SO_4 4 N em cada orifício. A leitura foi realizada em leitor de ELISA ($\lambda= 492\text{nm}$) (Labsystems, Finland). A concentração de cada citocina nas amostras foi expressa em pg/ml calculada por meio de uma curva padrão realizada com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes em questão.

3.11- Avaliação da sobrevida

Com a finalidade de avaliar a proteção dos animais tratados com ETA e β -lap, realizou-se a curva de sobrevida. Consideraram-se os seguintes grupos experimentais (n=20): animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal); animais inoculados com TAE e tratados por 7 dias com ETA (30, 120 e 500 mg/kg); animais inoculados com TAE e tratados por 3 dias com β -lap (1, 2 e 5 mg/kg)

O tratamento foi iniciado 24h após a inoculação tumoral. Os animais foram observados diariamente para controle da mortalidade.

3.12- Análise dos resultados

A Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar as seguintes variáveis: CFU-C do fêmur e baço; fatores estimuladores de colônias; atividade de células NK. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Tukey que detecta diferenças significativas entre os grupos. As curvas de sobrevida foram realizadas utilizando-se a Curva de Kaplan-Maier e Teste Cox-Mantel. As diferenças entre os grupos para as citocinas foram verificadas utilizando-se ANOVA de Kruskal-Wallis e Teste a posteriori de Wilcoxon.

4- RESULTADOS

4.1- Efeito do tratamento com ETA e β -lap na sobrevida de animais inoculados com TAE

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na Fig.6 e 7 e tabelas 3 e 4 (apêndice). Pode-se observar que 100% dos animais apenas inoculados com células tumorais morreram no período de 14 a 21 dias após a inoculação tumoral. Nos animais tratados com o ETA, o resultado mais favorável foi obtido com o tratamento com 120mg/kg representado por uma sobrevida de 30 dias, o que representa um aumento de 42% na duração da sobrevida destes animais, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, as doses de 30 e 500mg/kg não produziram qualquer proteção nos animais portadores do tumor ($p < 0,01$; Teste de Cox-Mantel). Não foi observada toxicidade com o extrato bruto mesmo com a maior dose (Fig.6).

Em relação ao tratamento com β -lap, o mesmo aumento de 42% na duração da sobrevida foi observado em animais portadores do tumor tratados com a dose de 1mg/kg ($p < 0,01$) (Fig.7). Doses de 2mg/kg demonstraram menor proteção (24%). Entretanto, toxicidade deste constituinte foi evidente com a dose de 5mg/kg, com a morte de 33% dos animais portadores do tumor nas primeiras 24h após a administração da droga, quando comparado ao prazo de 14 dias para o início da mortalidade dos animais portadores do tumor e não tratados.

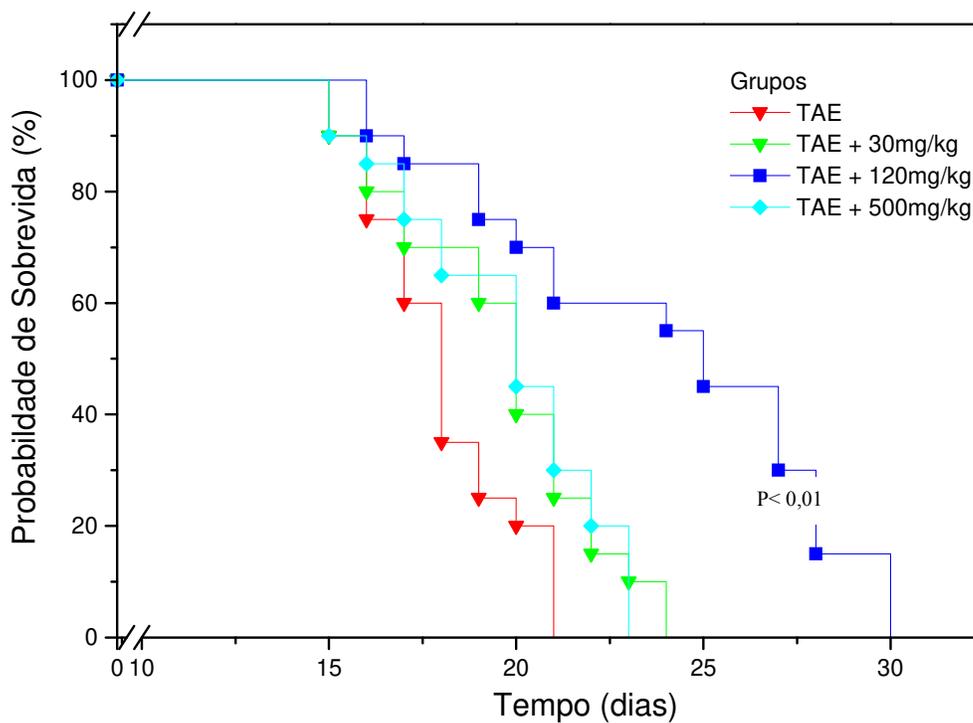


Figura 6- Curva de sobrevida (Kaplan-Maier) de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/ animal) e tratados com ETA (30, 120 e 500mg/kg) por 7 dias consecutivos. O tratamento iniciou-se 24h após a inoculação das células tumorais.* $p < 0,01$; Teste Cox-Mantel.

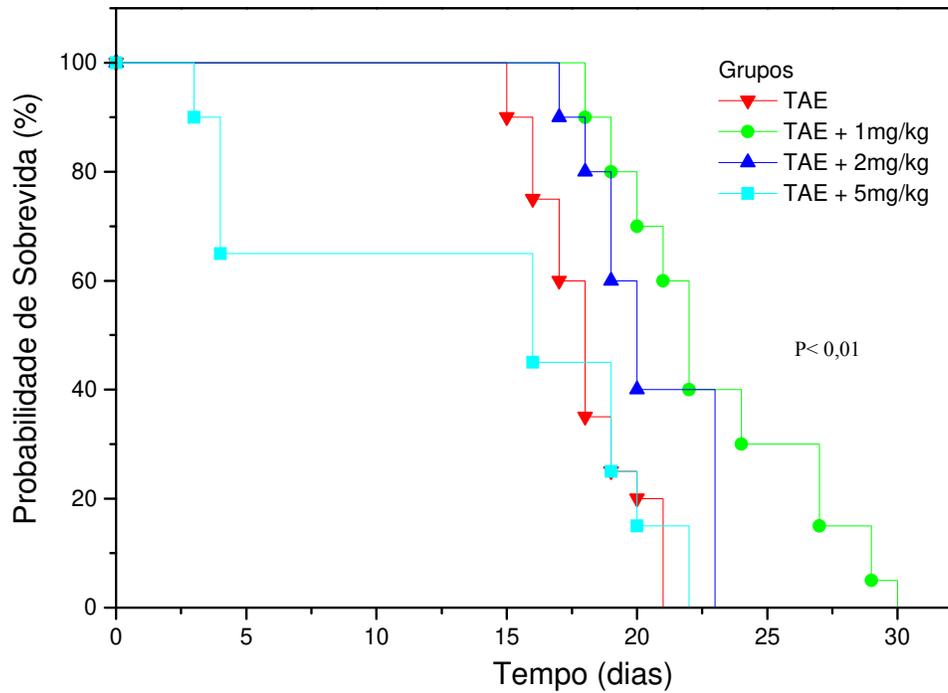


Figura 7- Curva de sobrevida (Kaplan-Maier) de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/ animal) e tratados com β -lap (1, 2 ou 5mg/kg), por 3 dias consecutivos. O tratamento com a droga iniciou-se 24h após a inoculação das células tumorais. * $p < 0,01$; Teste Cox-Mantel.

4.2- Avaliação dos efeitos do ETA e da β -lap sobre o número de progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos da medula óssea e do baço (CFU-GM)

Nossos resultados confirmam dados anteriores do nosso laboratório (MIRANDOLA *et al.*, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2001, 2002; VALADARES *et al.*, 1998, 2002, 2006) que demonstram que a mielosupressão verificada nos animais portadores do tumor é expressa através de uma diminuição do número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM). Como demonstrado na figura 8, a administração de 30, 120 e 500mg/kg de ETA, após a inoculação tumoral, aumentou o número de colônias de granulócitos e macrófagos nos animais portadores do tumor de maneira dose-dependente. O tratamento destes animais com a dose de 120mg/kg levou a um aumento no número de CFU-GM, atingindo valores similares aos observados nos animais controle ($p < 0,05$). Por outro lado, as doses de 30 e 500mg/kg não preveniram a mielosupressão induzida pelo tumor.

A avaliação da hematopoese extramedular, observada pelo número de CFU-GM no baço, demonstrou um dramático aumento de 5.5 vezes no número de colônias esplênicas após a inoculação do tumor ($p < 0,01$). Este efeito foi revertido pelo tratamento com a dose de 120mg/kg de ETA, atingindo valores de CFU-GM similares aos observados em animais controle. Por outro lado, doses de 30 e 500mg/kg não preveniram o aumento da hematopoese extramedular induzida pelo tumor (Fig.9). Não foi observada diferença significativa no número de CFU-GM da medula óssea ou baço de animais normais tratados, quando comparados com animais controle (Figs.8 e 9, Tabs. 5 e 6).

O tratamento de animais com 1, 2 ou 5mg/kg de β -lap em três administrações após a inoculação tumoral resultou em um padrão similar de dose-resposta, onde a mielosupressão induzida pelo tumor foi prevenida apenas com a dose de 1mg/kg ($p < 0,01$) (Fig.10, Tab.7). O aumento no número de colônias esplênicas foi parcial, mas significativo, sendo revertido pelo tratamento com esta dose de β -lap, resultando em redução de 2.5 vezes no número de CFU-GM no baço (Fig.11, Tab.8). Interessante observar que esta mesma dose prolongou a duração de sobrevivência no mesmo valor que a dose ótima do ETA (Fig.6 e 7). Entretanto, uma importante resposta divergente demonstrada pela β -lap foi seu

efeito estimulante sobre a hematopoese extramedular em animais normais tratados com as doses de 2 e 5mg/kg, atingindo valores 2 e 3 vezes maiores sobre valores controle, respectivamente (Fig. 11), indicando uma alteração para um padrão anormal de formação de colônias esplênicas após tratamento. Adicionalmente, no grupo de animais controle tratados com a dose de 5mg/kg, observou-se uma redução aproximada de 3 vezes no número de CFU-GM na medula óssea, atingindo valores tão reduzidos quanto os encontrados em animais portadores do tumor e não tratados, sugerindo um efeito inibitório dose-dependente deste composto biosintético na hematopoese normal dos animais.

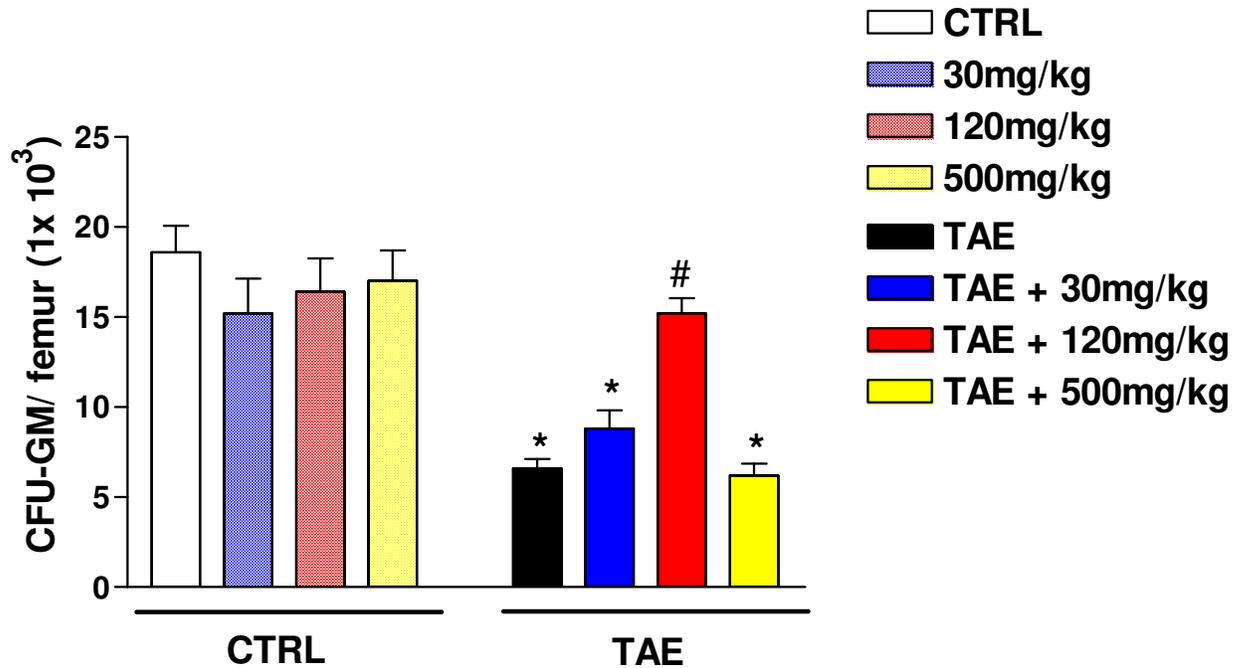


Figura 8- Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais e inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com extrato de *Tabebuia avellanedae* nas doses de 30, 120 e 500 mg/kg, por 7 dias após a inoculação do tumor. Os animais foram sacrificados 24h após o término do tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente do extrato. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao TAE.

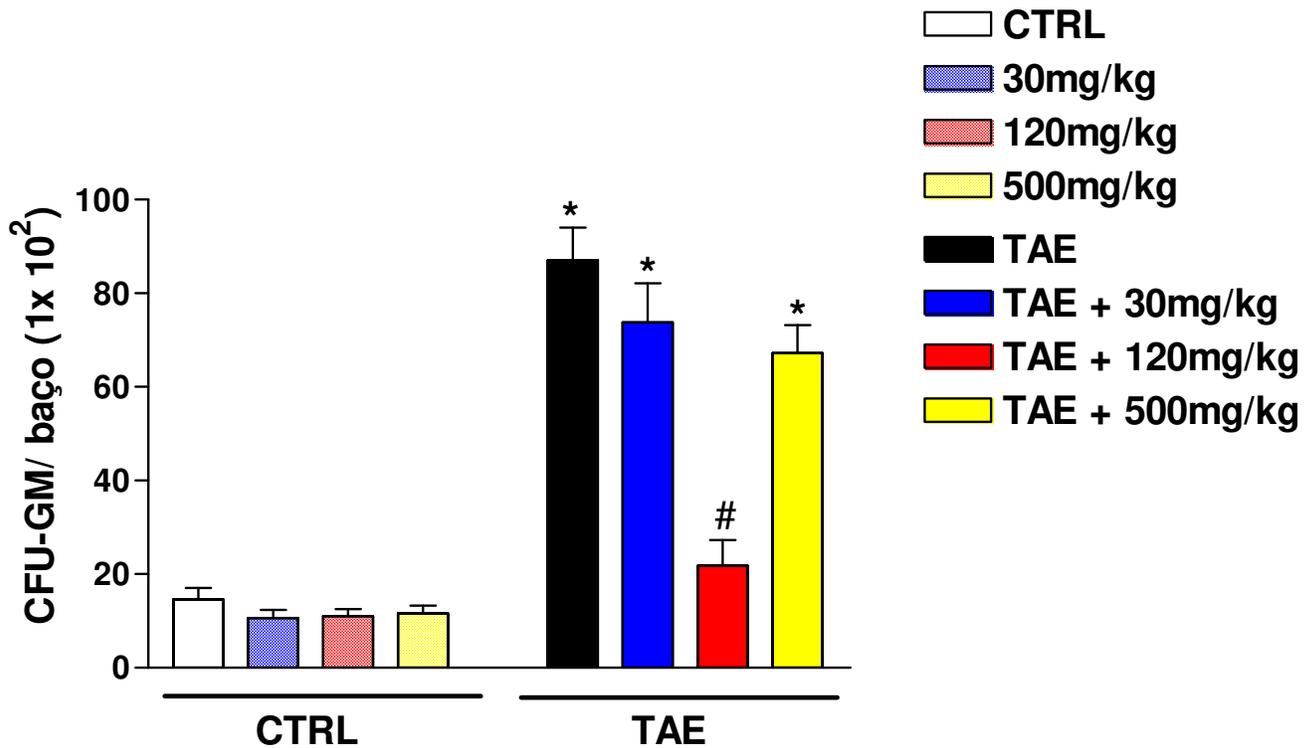


Figura 9- Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais normais e inoculados com TAE (6×10^6 células/ml) e tratados com extrato de *Tabebuia avellanedae* nas doses de 30, 120 e 500 mg/kg, por 7 dias após a inoculação do tumor. Os animais foram sacrificados 24h após o tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente do extrato. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $p < 0,01$ comparado ao controle, # $p < 0,01$ comparado ao TAE.

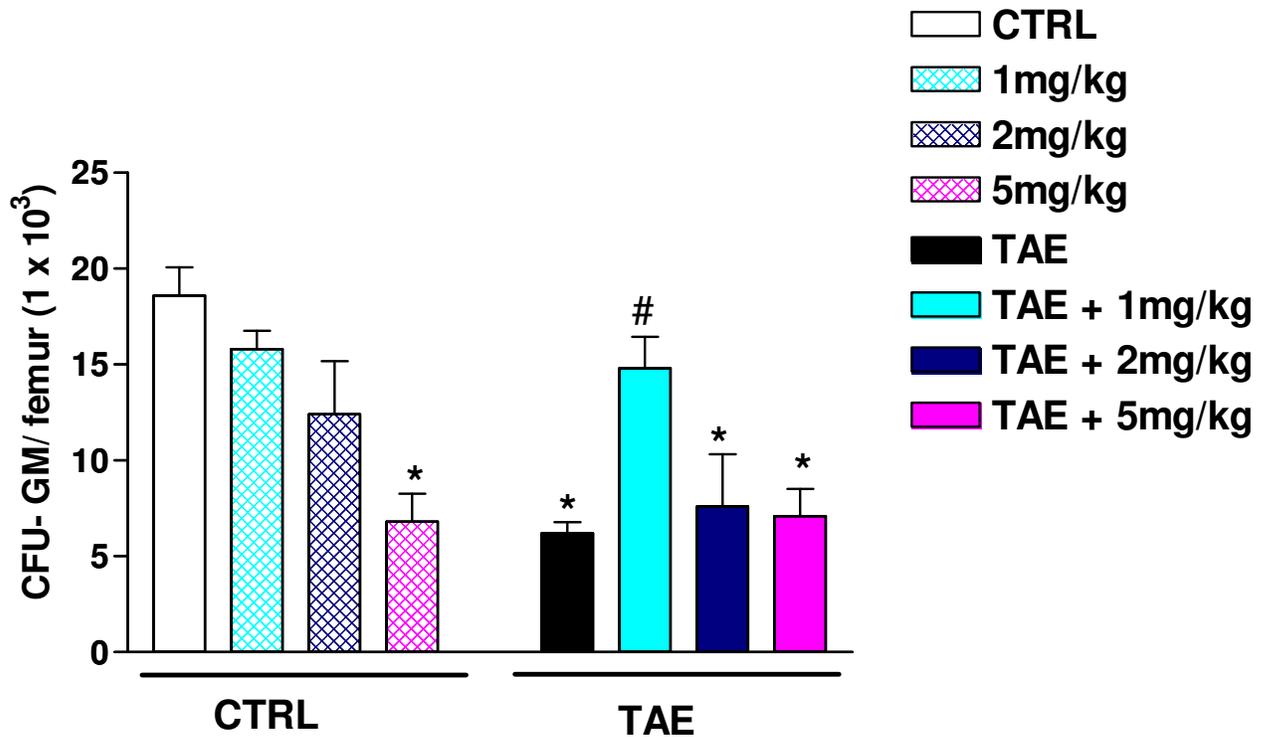


Figura 10- Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais e inoculados com TAE (6×10^6 cel/animal) e tratados por 3 dias com β -lapachona (i.p.; 1, 2 e 5mg/kg). Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os grupos controle recebeu o diluente da droga. Os resultados indicam média e desvio padrão de 6 animais. ANOVA-Teste de Tukey. * $p < 0,01$ significativo em relação ao controle; # $p < 0,01$ significativo em relação ao TAE.

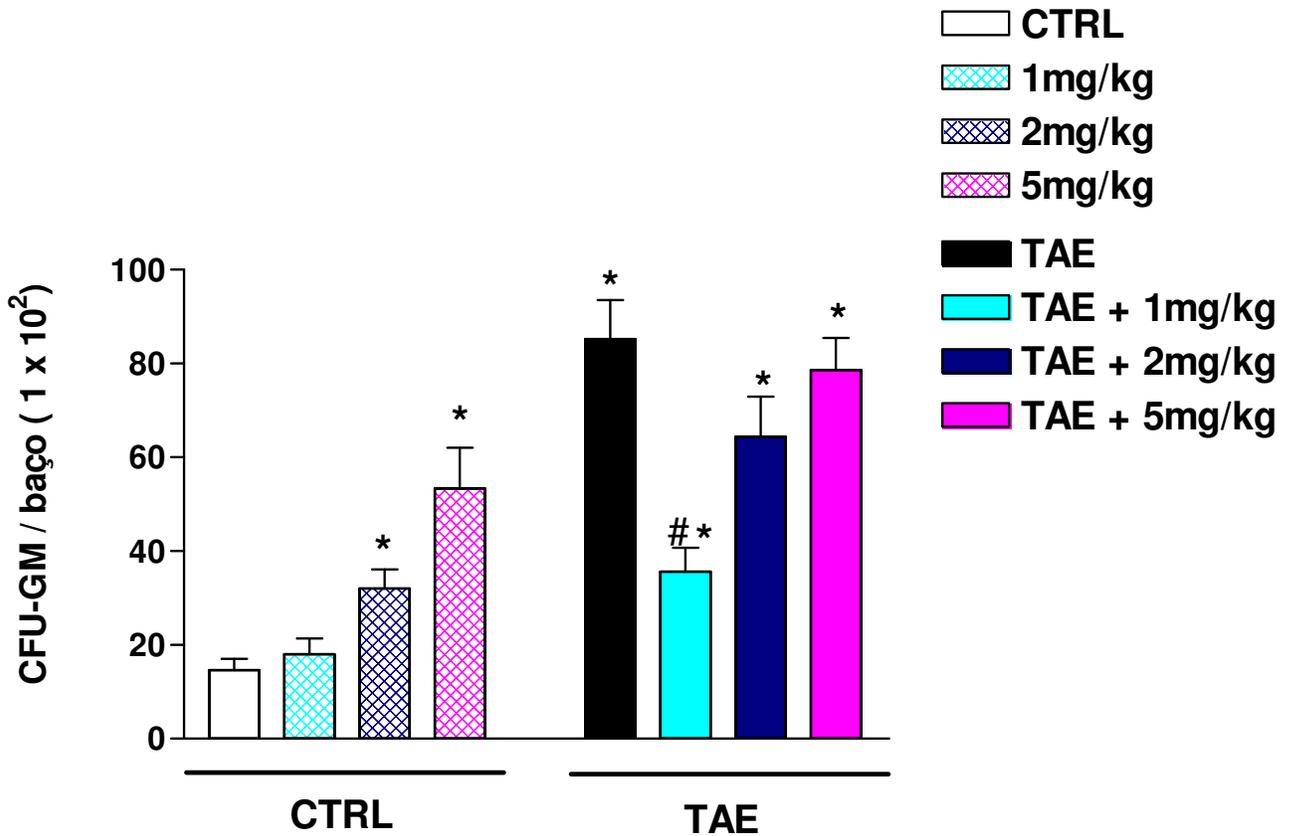


Figura 11- Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais normais e inoculados com TAE (6×10^6 cel/animal) e tratados por 3 dias com β -lapachona (i.p.; 1; 2 e 5mg/kg). Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os grupos controle recebeu o diluente da droga. Os resultados indicam média e desvio padrão de 6 animais. ANOVA-Teste de Tukey. * $p < 0,01$ significativo em relação ao controle; # $p < 0,01$ significativo em relação ao TAE.

4.3- Avaliação dos efeitos do ETA e da β -lap sobre a produção de fatores estimuladores de colônias “CSFs”.

A presença de CSF no soro obtido de animais portadores do TAE no oitavo dia após a inoculação tumoral foi avaliada em cultura contendo 1×10^5 células precursoras da medula óssea de animais normais e está apresentada na Tabela 2. Como esperado, verificou-se que a presença do TAE induziu aumento nos níveis de fatores estimuladores de colônias (CSFs) do soro destes animais ($p < 0,05$, ANOVA, Teste de Tukey).

O tratamento dos animais portadores do TAE com ETA ou β -lap nas suas doses ótimas ativas produziram redução parcial, porém significativa, nos níveis de CSF de animais portadores do tumor, resultando em uma inibição de 3.5 e 1.8 vezes no número de CFU-GM, respectivamente. A análise morfológica das colônias permitiu identificá-las como predominantemente das linhagens granulocítica e macrofágica.

Tabela 2- Efeitos do soro de animais portadores do tumor e tratados com ETA e β -lap sobre CFU-GM da medula óssea de animais normais.

Estímulo	Número de colônias
rmGM-CSF	126 ± 24
Controle	3 ± 1^a
ETA 120mg/kg	4 ± 1^b
β -lap 1mg/kg	4 ± 2^c
TAE	28 ± 8^d
TAE + ETA 120mg/kg	$8 \pm 4^{e\#}$
TAE + β -lap 1mg/kg	$13 \pm 5^{f*}$

rmGM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos murino

^aSoro de animais controle.

^bSoro de animais tratados com ETA 120mg/kg

^cSoro de animais tratados com β -lap 1mg/kg

^dSoro de animais portadores do TAE

^eSoro de animais portadores do TAE e tratados com ETA 120mg/kg

^fSoro de animais portadores do TAE e tratados com β -lap 1mg/kg

Resultados indicam média e desvio padrão de 6 animais. ANOVA-Teste de Tukey.

* $p < 0.05$; comparado ao grupo controle

$p < 0.05$; comparado ao grupo de animais portadores do TAE.

4.4- Efeitos do tratamento com ETA e β -lap sobre a atividade de células Natural killer de animais normais e portadores do TAE

Os efeitos dos tratamentos com ETA (30, 120 e 500mg/kg) e β -lap (1mg/kg) sobre a atividade lítica de células NK de animais normais e inoculados com TAE estão apresentados nas Figs. 12 e 13, Tabelas 9 e 10. Podemos observar que nos animais normais a atividade lítica das células NK foi de aproximadamente 23% (razão célula alvo/ célula efetora 50:1). No oitavo dia após inoculação tumoral a atividade citotóxica das células NK foi drasticamente reduzida atingindo a capacidade de apenas 6 % ($p < 0,05$ ANOVA, Teste de Tukey). A redução na capacidade funcional das células NK produzida pela presença do tumor foi completamente restabelecida após tratamento com 120mg/kg de ETA. Por outro lado, as doses de 30 e 500mg/kg não reverteram a capacidade funcional destas células. Em animais normais, não portadores do TAE, a administração do ETA não produziu qualquer alteração na atividade citotóxica destas células.

Em relação aos efeitos da β -lap, da mesma forma que o tratamento com ETA, não houve alterações na atividade funcional das células NK em animais normais (Tab. 10). No entanto, em animais portadores do TAE, o aumento produzido pelo tratamento com esta droga, ainda que significativo em relação ao portador do TAE, não atingiu a capacidade funcional observada no grupo-controle ($p < 0,05$ ANOVA, Teste de Tukey).

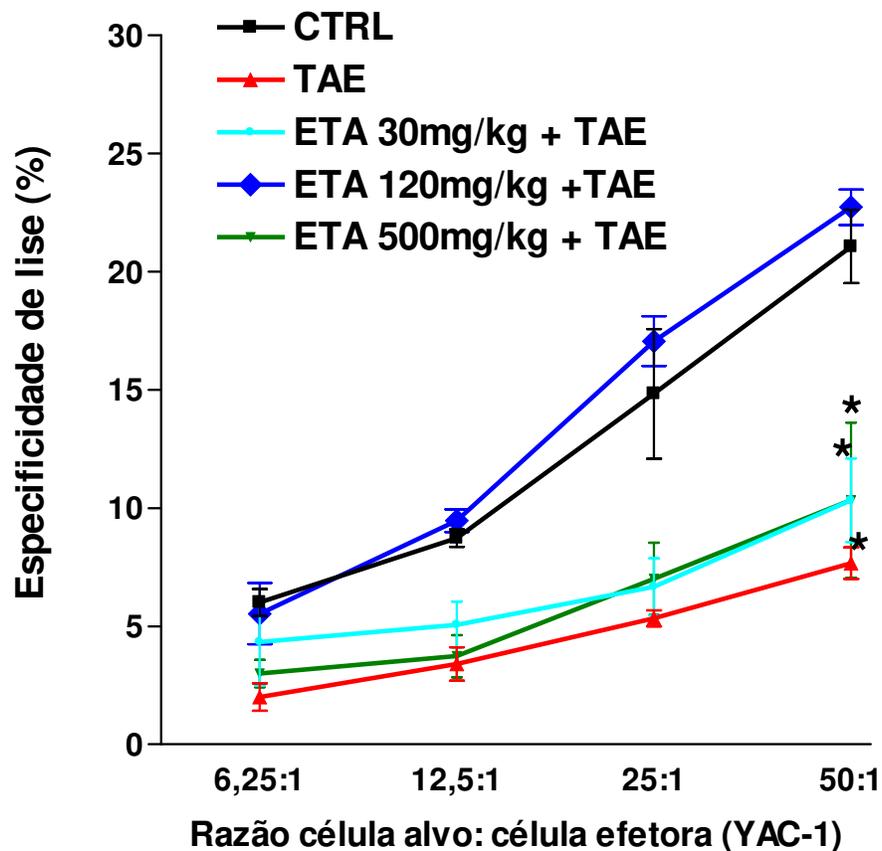


Figura 12- Atividade das células NK em animais normais e portadores do TAE e tratados com ETA 30, 120 ou 500mg/kg por 7 dias após a inoculação do tumor. Os animais foram sacrificados 24h após o tratamento. Os resultados indicam média e desvio padrão para as diferentes razões de células alvo: células efetoras (YAC-1). ANOVA-Teste de Tukey. * $p < 0,05$ significativo em relação ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao TAE

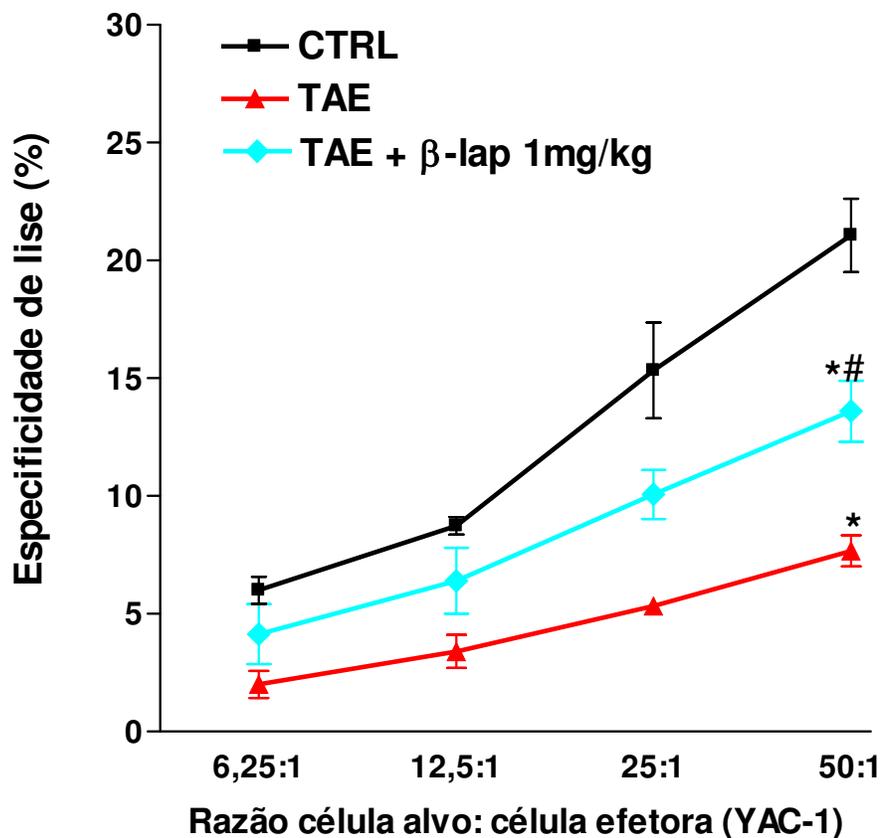


Figura 13- Atividade das células NK em animais normais e portadores do TAE e tratados com β -lap 1mg/kg por 3 dias. Os animais foram sacrificados no oitavo dia após a inoculação tumoral. Os resultados indicam média e desvio padrão para as diferentes razões de células alvo: células efetoras (YAC-1). ANOVA-Teste de Tukey. * $p < 0,05$ significativo em relação ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao TAE

4.5- Efeitos dos tratamentos com ETA e β -lap sobre os níveis de produção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 em animais normais e portadores do TAE

No oitavo dia de crescimento tumoral, ou seja, na fase exponencial da progressão tumoral, detectamos uma redução progressiva na secreção de IFN- γ e TNF- α , atingindo valores inferiores aos níveis basais encontrados no grupo controle ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon). Paralelamente, a avaliação da produção de IL-10 revelou que durante o crescimento tumoral ocorre um aumento significativo nos níveis de produção desta citocina. Nos animais normais não observamos alterações nos níveis de IL-10, IFN- γ ou TNF- α após tratamento com ETA ou β -lap ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon).

No entanto, em animais portadores do tumor e tratados com ETA, verificamos uma reversão da migração do perfil Th1 (IFN- γ e TNF- α) para Th2 (IL-10) induzida pela evolução tumoral. Nesse sentido, a diminuição acentuada nos níveis de IFN- γ na fase exponencial da doença foi revertida após tratamento com 120mg/kg de ETA, atingindo níveis similares aos encontrados nos animais controle ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon), (Fig.14, Tab.11). Em relação aos níveis de TNF- α , observamos que o tratamento com o ETA impede a redução nos níveis desta citocina em animais portadores do tumor ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon), (Fig.16, Tab.13). Quanto ao aumento progressivo nos níveis de IL-10, observados na fase exponencial da evolução tumoral, o tratamento com ETA proporcionou níveis desta citocina equivalentes aos encontrados nos animais controle ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon), (Fig.18, Tab.15). Em animais tratados com β -lap observamos uma inibição parcial na migração do perfil Th1 para Th2. Neste sentido, os níveis aumentados de produção de IFN- γ foram parcialmente inibidos pelo tratamento com três doses de 1mg/kg de β -lap ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon), (Fig.15, Tab.12). A avaliação da produção de TNF- α , reduzida com a presença do tumor, foi revertida com o tratamento com este princípio ativo, porém, da mesma maneira, os valores não atingiram os níveis basais. ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon), (Fig.17, Tab.14). Em relação aos níveis de IL-10, aumentados durante o crescimento tumoral, o tratamento com a β -lap proporcionou níveis reduzidos em relação ao animal apenas portador do tumor, porém não alcançando os valores basais ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon), (Fig.19, Tab.16).

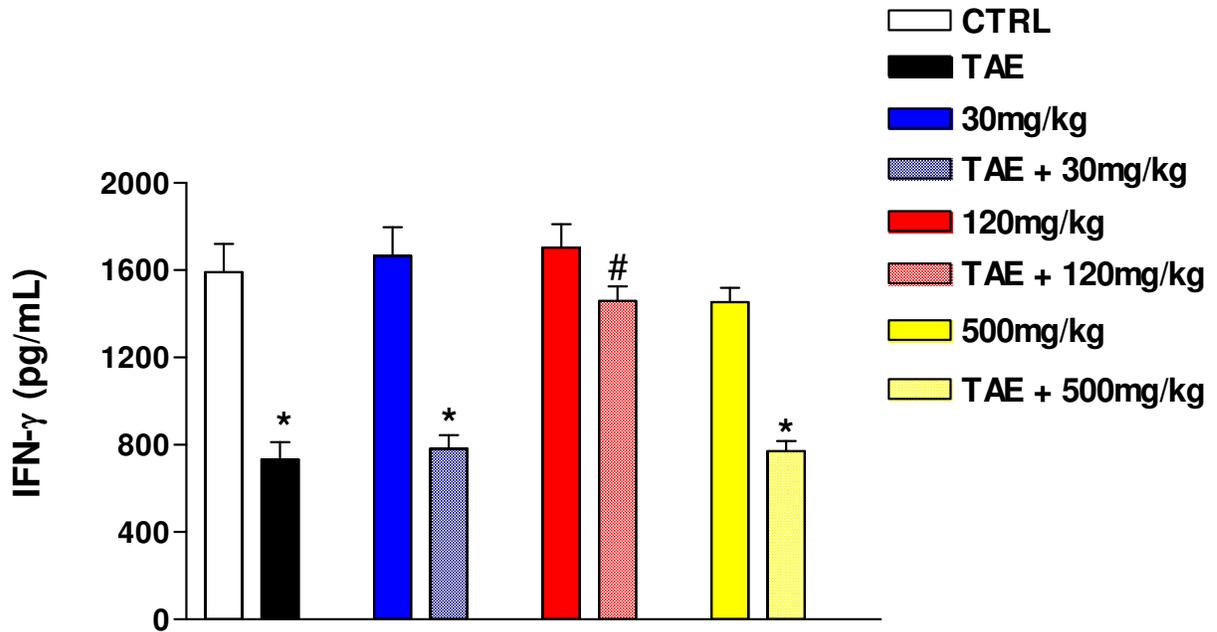


Figura 14- Concentração de IFN- γ (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 7 dias com 120mg/kg do ETA. Os tratamentos iniciaram 24h após inoculação e os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$, comparado ao TAE.

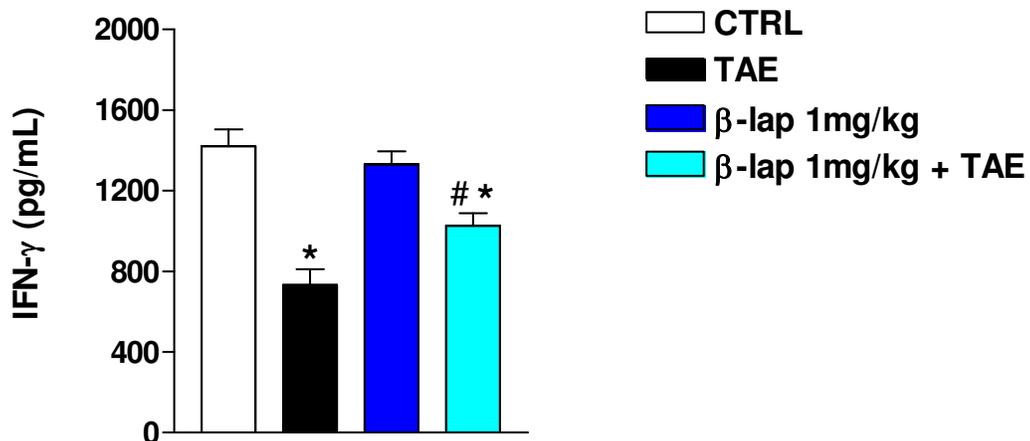


Figura 15- Concentração de IFN- γ determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 3 dias com a β -lapachona (1mg/kg). Os tratamentos iniciaram 24h após inoculação e os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$, comparado ao TAE.

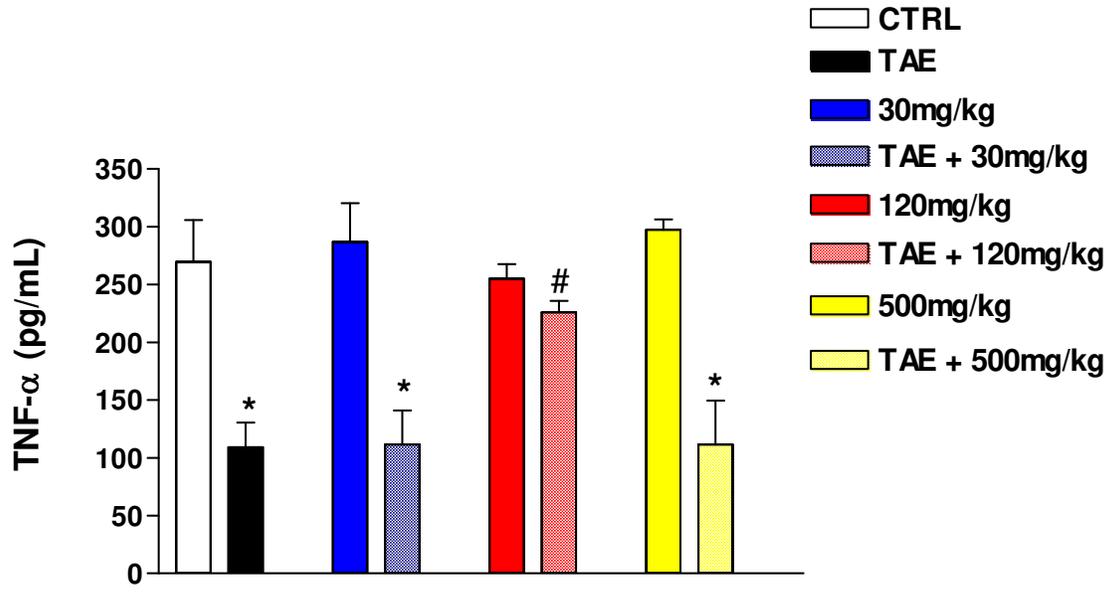


Figura 16- Concentração de TNF- α (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 7 dias com 120mg/kg do ETA. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$, comparado ao TAE.

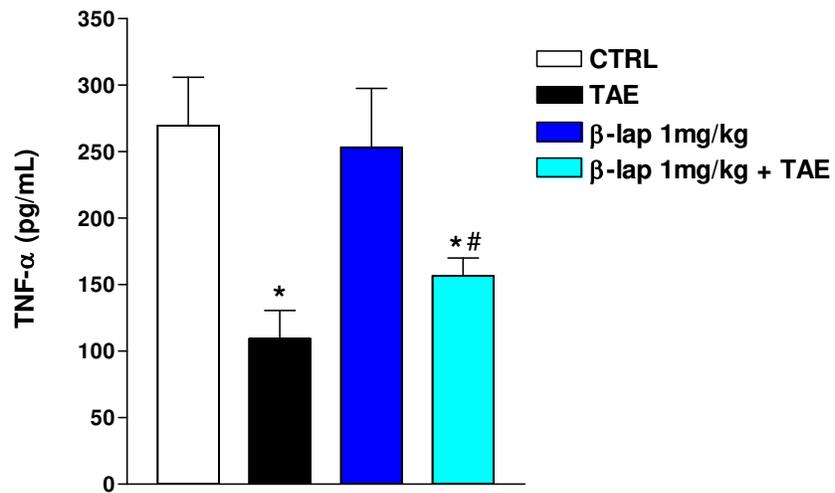


Figura 17- Concentração de TNF- α (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 3 dias com a β -lapachona (1mg/kg). Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,01$, comparado ao TAE.

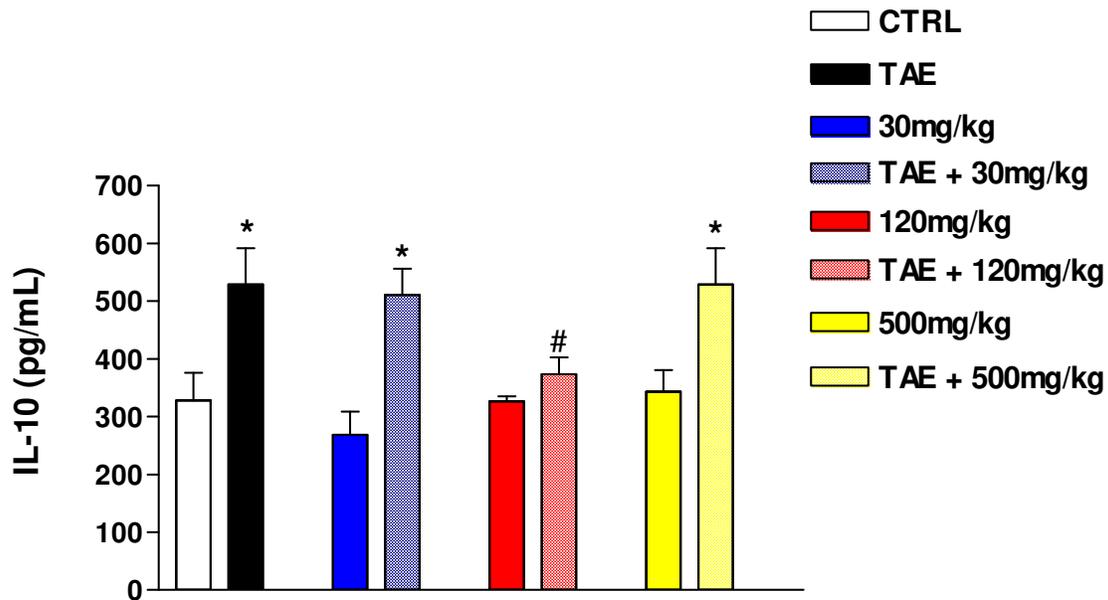


Figura 18- Concentração de IL-10 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 7 dias com 120mg/kg do ETA ou com 1mg/kg de β -lap por 3 dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$, comparado ao TAE.

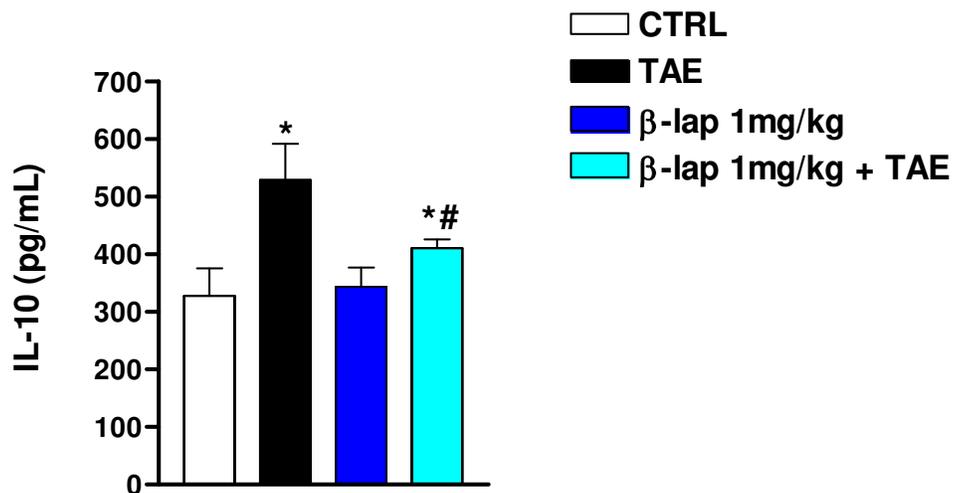


Figura 19- Concentração de IL-10 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados por 3 dias com a β -lapachona (1mg/kg/dia. Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$, comparado ao TAE

5- DISCUSSÃO

A resposta hematopoética é fundamental para a manutenção da homeostase do organismo. Vários trabalhos têm demonstrado que a presença de tumores, tanto em humanos como em animais, resulta em um declínio na resposta hematopoética e imunológica do hospedeiro (RUSZALA-MALLON *et al.*, 1992; TAKAHASHI *et al.*, 1992). A avaliação da integridade da hematopoese na medula óssea é importante para compreender como um composto altera a produção de células sanguíneas e como estas alterações afetam o sistema imune do hospedeiro. O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) produz alterações severas na resposta hematopoética medular e extramedular do hospedeiro, sendo utilizado para elucidar os mecanismos farmaco-toxicológicos da resposta antitumoral induzida por compostos naturais ou sintéticos (QUEIROZ *et al.*, 2004). PESSINA *et al.* (1982) demonstraram que a progressão tumoral em animais afeta seriamente o compartimento hematopoético, levando à anemia, depleção do timo, imunossupressão e leucocitose granulócito-dependente. Estudos em nosso laboratório têm demonstrado a atividade mielopoética de vários compostos naturais ou sintéticos e sua capacidade em inibir o crescimento do TAE (QUEIROZ *et al.*, 2001, 2004; MIRANDOLA *et al.*, 2002; BINCOLETTO *et al.*, 2005; VALADARES *et al.*, 2002, 2004, 2006). No presente estudo, avaliamos os efeitos do extrato bruto de *Tabebuia avellaneda* (ETA) e seu composto isolado, a β -lapachona (β -lap) sobre a resposta hematopoética de animais portadores do TAE.

Corroborando estudos prévios de nosso laboratório, no presente trabalho demonstramos que, durante o desenvolvimento do TAE, ocorre redução no número de CFU-GM da medula óssea e drástico aumento destes precursores no baço. O tratamento de animais portadores do tumor com ETA nas doses de 30 a 500mg/kg e β -lap nas doses de 1 a 5mg/kg recuperaram a mielossupressão induzida pelo TAE de maneira dose-dependente, com doses de 120mg/kg de ETA e 1mg/kg de β -lap demonstrando efeitos moduladores ótimos na formação da medula óssea. A dose de 120mg/kg do ETA também reverteu o aumento no número de CFU-GM esplênico a valores similares aos observados nos animais controle, enquanto que o tratamento com 1mg/kg de β -lap reverteu parcialmente este efeito, porém de maneira significativa, resultando em inibição de 37% no número de CFU-GM do baço de animais portadores do tumor. Paralelamente, o tratamento com estas duas doses ótimas demonstrou melhor eficácia em prolongar a sobrevivência de animais portadores do

TAE, ambas aumentando em 42% a duração da sobrevida. Por outro lado, a administração de 30 e 500mg/kg de ETA e 2.0 e 5.0mg/kg da β -lap não afetaram o número de CFU-GM na medula óssea ou na hematopoese extramedular induzida pelo tumor. Estes resultados indicam que a atividade antitumoral do ETA e da β -lap pode estar relacionada à capacidade de ambos os compostos modularem positivamente o desequilíbrio hematopoiético e imunológico decorrente da evolução do TAE, o que deve resultar de alterações no comportamento de vários tipos celulares locais, particularmente células T e macrófagos.

Sabe-se que células tumorais modificam a atividade dos macrófagos para promover o crescimento tumoral (FECCHIO *et al* 1990; BONTA *et al.*, 1993; ELGERT *et al*, 1995). Nossos resultados a respeito das alterações na hematopoese induzidas pelo tumor adicionam evidências quanto à capacidade do TAE de afetar o sistema receptor de células progenitoras de granulócitos e macrófagos e alterar as capacidades funcionais de macrófagos (QUEIROZ *et al.*, 2004). A este respeito, tem sido demonstrado que compostos de origem vegetal aumentam a atividade citotóxica de macrófagos contra células tumorais e microorganismos, através da ativação da atividade fagocítica, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), modulação da produção de óxido nítrico (NO) e aumento da secreção de citocinas e quimiocinas, como TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 (SCHEPETKIN & QUINN, 2006). O mecanismo comum dos efeitos imunomoduladores, antitumorais, bactericidas e outros efeitos terapêuticos destes compostos ocorrem via estimulação de macrófagos e modulação do sistema complemento. Neste sentido, foi demonstrado que alguns constituintes da *Tabebuia avellanedae* possuem atividade inibitória sobre a produção de NO, justificando o efeito antiinflamatório largamente utilizado na medicina popular (AWALE *et al.*, 2005).

Nosso estudo também demonstrou importantes diferenças entre os tratamentos com ETA e β -lap. Neste sentido, em animais normais, uma drástica mielosupressão e aumento na hematopoese extramedular associada com esplenomegalia foram observadas após tratamento com β -lap na dose de 5mg/kg, atingindo valores similares aos observados nos animais portadores do TAE e não tratados. Além disso, animais normais tratados com 2mg/kg também apresentaram aumento na hematopoese extramedular, apesar da capacidade desta dose em reduzir parcialmente a hematopoese esplênica em animais

portadores do tumor. Interessante observar que estes efeitos colaterais já são aparentes com dose próxima à dose ótima ativa, sugerindo uma estreita margem de segurança para este composto biosintético. Evidências adicionais quanto à toxicidade da β -lap é demonstrada pela mortalidade de 33% dos animais portadores do tumor nas primeiras 24h após a última administração de 5mg/kg, quando comparado aos 17 dias tardios da morte dos animais portadores do tumor e não tratados.

Está bem esclarecido na literatura (ABDEL-DAYEM *et al.*, 1999; VALADARES *et al.*, 2002) que a presença de hematopoese extramedular associada com hiperplasia esplênica constitui grave efeito colateral que contribui para um prognóstico menos favorável. Hematopoese extramedular é um dos aspectos mais importantes da influência do tumor na ascite maligna, sendo considerado como resultado do comportamento agressivo de fatores liberados pelo tumor que estimulam a proliferação de células esplênicas com alterações fenotípicas e funcionais, compatíveis com a presença de uma população de macrófagos supressores no baço de camundongos portadores do TAE (PESSINA *et al.*, 1982; TOMIDA *et al.*, 1984; PARHAR & LALA, 1988; SUBIZA *et al.*, 1987; ELGERT *et al.*, 1998; RUIZ DE MORALES *et al.*, 1999). A origem destas alterações não foi totalmente elucidada, porém, a liberação de fatores estimuladores de colônias (CSFs) pelas células tumorais possa estar envolvida (PESSINA *et al.*, 1982a; OGHISO *et al.*, 1993). Corroborando estes achados, demonstramos que a β -lap reverte apenas parcialmente a atividade estimuladora do soro de animais portadores do TAE, podendo este constituir um dos fatores que contribuem para as suas manifestações tóxicas.

Entre os fatores imunossupressores induzidos pela evolução tumoral, merecem destaque a IL-10, o TGF- β e as prostaglandinas (PAHAR & LALA, 1988). IL-10 é uma citocina produzida por células T helper2 (Th2) a qual não apenas inibe a síntese das citocinas do perfil Th1, mas também a função apresentadora de antígeno às células T promovida pelos macrófagos (CHOUAIB *et al.*, 1997). O aumento de prostaglandinas E₂ (PGE₂), característico da evolução do TAE, está associado a um fraco influxo de células inflamatórias na cavidade peritoneal e a inibição da liberação das citocinas IL-2 e IFN- γ pelos linfócitos T (FECCHIO *et al.*, 1990). Sabe-se que IFN- γ e TNF- α , sozinhos ou combinados, vão atuar na regulação da ativação de macrófagos, contribuindo assim para a

resposta antitumoral do hospedeiro (YAMAMOTO *et al.*, 1995). A este respeito, nossos resultados sobre os níveis de produção das citocinas do perfil Th1 (IFN- γ e TNF- α) e Th2 (IL-10) em animais portadores do TAE, corroboram resultados na literatura que demonstram uma migração do fenótipo Th1 para Th2, no processo de evolução tumoral (YAMAMOTO *et al.*, 1995; SEGURA *et al.*, 1997). Neste sentido, animais portadores do tumor apresentaram redução significativa nos níveis de produção de IFN- γ e TNF- α , nos estágios mais avançados da evolução tumoral, enquanto que os níveis de IL-10 se encontravam aumentados. O tratamento com ETA 120mg/kg reverteu a migração do fenótipo Th1 para Th2 induzido pelo tumor, enquanto que nos animais tratados com β -lap 1mg/kg, esta reversão foi apenas parcial. Trabalhos na literatura demonstram que o aumento na liberação de TNF- α em camundongos portadores de TAE e tratados com diversos compostos pode ser responsável pela maior sobrevivência destes animais e indução de apoptose das células tumorais (SNYDERMAN, *et al.*, 1976; KURLAND *et al.*, 1977; GOODWIN *et al.*, 1980; MONDAL *et al.*, 2002a, 2002b; DAS *et al.*, 2002). Corroborando estes estudos, o aumento na duração da sobrevivência de animais tratados com ETA 120mg/kg e β -lap 1mg/kg poderia ser explicado, em parte, pela modulação dos níveis de produção destas citocinas em animais portadores do tumor. Interessante observar que nas doses de 30 e 500mg/kg, onde não houve aumento na duração de sobrevivência, não observamos recuperação dos níveis de produção das citocinas estudadas.

Células “natural killer” (NK), principalmente pela capacidade de produzir citocinas, particularmente o IFN- γ , possuem um papel primordial na rejeição dos tumores. Está bem esclarecido na literatura que o IFN- γ ativa as funções fagocíticas de macrófagos e potencializa a reatividade das células NK (YAMAMOTO *et al.*, 1995; MILLER *et al.*, 2001). Durante o crescimento do TAE, há uma progressiva diminuição da atividade das células NK, mediada pelos fatores supressores liberados durante o desenvolvimento do tumor. (PARHAR & LALA, 1988; YAMAMOTO *et al.*, 1995; SEGURA *et al.*, 1997, 2000; ELGERT *et al.*, 1998; RAHAL, *et al.*, 2001). O tratamento de animais portadores do TAE com ETA, na dose de 120mg/kg, produziu um aumento significativo na atividade lítica das células NK, atingindo valores equivalentes aos encontrados nos animais normais, enquanto que, com a β -lap 1mg/kg, a atividade funcional das células NK não foi restaurada aos níveis observados nos animais controle, embora o

aumento produzido por esta droga na atividade citotóxica destas células tenha sido significativo, quando comparado ao efeito observado no animal portador do TAE. Foi demonstrado que em pacientes portadores de tumor, a presença de um infiltrado rico em células NK proporciona uma maior inibição na progressão da doença, correlacionada com diminuição nas metástases e menor invasão linfática (MILLER *et al.*, 2001).

Nossos resultados sugerem que, apesar da eficácia antitumoral demonstrada pelo tratamento com ETA possa depender da presença de β -lap, a ausência dos constituintes associados presentes no extrato bruto pode ser responsável pela toxicidade hematopoiética dose-dependente deste composto biosintético. Estes resultados corroboram achados anteriores demonstrando que vários constituintes da *Tabebuia avellanae* (flavonóides, naftoquinonas e saponinas) possuem diversas atividades farmacológicas, e suas concentrações no extrato parecem estar relacionadas com o efeito terapêutico do extrato total. Neste sentido é importante ressaltar a potente atividade citotóxica frente a várias linhagens celulares em cultura demonstradas pela β -lap, evidente a concentrações micromolares (PARDEE *et al.*, 2002). Tem sido sugerido que a β -lap exibe seus efeitos citotóxicos através da geração de produtos reativos do oxigênio (ROS), inibição de enzimas reparadoras do DNA, como as topoisomerasas I e II e PARP. Recentemente demonstrou-se evidências da participação da enzima NQO1 no processo de ativação da β -lap na apoptose, o que contribui para sua citotoxicidade. A NQO1 é expressa em maior grau em vários tipos de tumores, como mama, pulmão, e colo-retal, do que em células normais (PINK *et al.*, 2000; PLANCHON *et al.*, 2001). Por outro lado, os flavonóides, outro grupo importante presente na *Tabebuia avellanae*, possuem potente atividade antioxidante associada a uma diminuição do risco de câncer (WLEKLIK *et al.*, 1997; MORENO *et al.*, 2000; ORSOLIC & BASIC, 2003). Sabe-se que os flavonóides constituem uma classe de antioxidantes nutricionais, sendo capazes de aumentar a concentração intracelular de glutathiona redutase (GSH), um potente agente antioxidante capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio, impedindo a ocorrência de lesões oxidativas que possam provocar a morte celular.

Estes resultados corroboram estudos que indicam que constituintes isolados podem não apresentar a mesma resposta terapêutica que o extrato bruto da planta.

Frequentemente, a atividade de extratos brutos vegetais não é reproduzida por substâncias ativas isoladas, sendo a sua ação determinada por mais de um componente do extrato, que pode eventualmente atuar sobre os mesmos processos bioquímicos, mas pode também contribuir de outras maneiras, como modificando a solubilidade, alterando fenômenos de absorção, influenciando sobre a estabilidade ou agindo sinérgica ou antagonicamente (SIMÕES *et al.*, 2000; ALONSO, 2004).

Embora o mecanismo pelos quais os efeitos do ETA e da β -lap tenham sido parcialmente elucidados, os dados apresentados quanto aos efeitos antitumorais destes compostos, agindo sinergicamente com outros fatores como citocinas específicas, podem resultar da ativação de macrófagos contra células do tumor ascítico de Ehrlich. Neste sentido, a redução no número de CFU-GM no baço de animais portadores do tumor poderia ser devido a uma reduzida produção de fatores solúveis derivados do tumor, responsáveis pelas alterações neste órgão. Estes dados sugerem que substâncias liberadas pelos macrófagos supressores são efetivamente menos afetadas pela β -lap, devido à capacidade limitada deste princípio ativo em restaurar a hematopoese esplênica e os níveis de CSF séricos induzidos pelo tumor. Em conjunto, podemos sugerir que o número de macrófagos e a modulação de suas atividades funcionais podem ser responsáveis pelos possíveis efeitos terapêuticos de ambos os compostos frente ao tumor ascítico de Ehrlich.

6- CONCLUSÕES

A partir dos experimentos realizados podemos concluir sobre o ETA na dose de 120mg/kg:

- ☒ Aumenta a duração da sobrevivência dos animais em 42%;
- ☒ Estimula o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos na medula óssea de camundongos portadores do TAE;
- ☒ Impede a hematopoese extramedular induzida pelo desenvolvimento do tumor;
- ☒ Reverte o aumento dos fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSF) induzidos pelo tumor;
- ☒ Aumenta a atividade citotóxica de células NK, reduzida na presença do TAE;
- ☒ Induz aumento nos níveis de produção de IFN- γ , TNF- α e diminuição de IL-10;
- ☒ Protege contra a polarização Th1-Th2 desenvolvida neste modelo tumoral;
- ☒ A dose de 30mg/kg não apresentou eficácia neste modelo;
- ☒ A dose de 500mg/kg não alterou os parâmetros hemato e imunológicos analisados em animais normais ou portadores do tumor.

Sobre a β -lap na dose de 1mg/kg, concluímos:

- ☒ Aumenta a duração da sobrevivência dos animais em 42%, como observado com o ETA;
- ☒ Estimula o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos na medula óssea de camundongos portadores do TAE;
- ☒ Impede parcialmente a hematopoese extramedular induzida pelo desenvolvimento do tumor;

- ☞ Aumenta parcialmente a atividade citotóxica de células NK, reduzida na presença do TAE;
- ☞ Induz aumento parcial nos níveis de produção de IFN- γ , TNF- α e diminuição de IL-10;
- ☞ As doses de 2 e 5mg/kg aumentaram a hematopoese extramedular em animais normais;
- ☞ A dose de 5mg/kg apresentou toxicidade, demonstrada por mielosupressão e morte de alguns animais.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-DAYEM, H.M., ROSEN, G., EL-ZEFTAWY, H., NADDAF, S., KUMAR, M., ATAY, S., CAVACIO, A. Fluorine-18 Fluorodeoxyglucose splenic uptake from extramedullary hematopoiesis after granulocyte colony-stimulating factor stimulation. *Clin. Nucl. Med.* 24, 319-322, 1999.

ABOUL-ENEIN, A.M. Inhibition of tumor growth with possible immunity by Egyptian garlic extracts. *Nahrung*, 30, 161, 1986.

ALMEIDA, E.R.; DA SILVA FILHO, A.A.; DOS SANTOS, E.R.; LOPES, C.A. **Antiinflammatory action of lapachol.** *J Ethnopharmacol.*, 29:239-241, 1990.

ALONSO, J. Tratado de fitofarmacos y nutraceuticos. **1 ed. Argentina, Rosario. Corpus Libros**, Lapacho, 659-664, 2004.

AUSTIN, F. G. *Am J Trop Med Hyg*, 23, 412, 1974.

AWALE, S.; KAWAKAMI, T.; TEZUKA, Y.; UEDA, J.; TANAKA, K.; KADOTA, S. Nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of *Tabebuia avellanedae* from **Brazil.** *Chem Pharm Bull.*, 6:710-713, 2005.

BARTH, M.W.; MORAHAN, P.S. Role of macrophages in the host response to Lewis lung peritoneal carcinomatosis. *Cancer Immunol. Immunother.*, 38: 233-242, 1994.

BEEKMAN, A.; WPERDENBAG, H.J.; VAN-UDEN, W.; PRAS, N.; KONINGS, A.W.T. & WIKSTROM, H. Stability of artemisinin in aqueous environments: impact on its cytotoxic action to Ehrlich ascites tumor. *J Pharm Pharmacol*, 49, 1254, 1997.

BINCOLETTO, C.; EBERLIN, S.; FIGUEIREDO, C.A.V.; LUENGO, M.B.; QUEIROZ, M.L.S. Effects produced by royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *International Immunopharmacology.*, 679-688, 2005.

BINUTU, O.A.; ADESOGAN, K.E.; OKOGUN, J.I. – Antibacterial and antifungal compounds from *Kigelia pinnata*. *Planta Med.*, 62: 352-3, 1994.

BONTA, I.L. AND BEN-EFRAIM, S. Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumour activity. *J. Leukocyte Biol.*, 54: 613, 1993.

BOOTHMAN, D.A.; TRASK, D.K.; PARDEE, A.B. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by β -lapachone, an activator of topoisomerase I. **Cancer Res.**, 49: 605-12, 1989.

BOVERIS, A.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J.F.; STOPPANI, A.O.M. Acción de β y α -lapachona sobre la producción de H_2O_2 y el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. **Rev Arg Microbiol.**, 9:54-61, 1977.

BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E.E.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J.F.; STOPPANI, A.O.M. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J.**, 188: 643-8, 1980.

BOVERIS, A.; STOPPANI, A.O.M. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. **Experientia.**, 33:1306-8, 1977.

CAI, B. & JIANG, T. Study on preventive and curative effects of liu wei di huang tang on tumors. **J Tradit Chin Med.**, 14, 207, 1994.

CARVALHO, L. H.; ROCHA, E. M. M.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRA, A. B.; KRETTLI, A. U. **Braz J Med Biol Res.**, 21, 485, 1988.

CHAU, Y.P.; SHIAH, S.G.; COM, M.J.; KUO, M.L. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. **Free Radical Biol Med.**, 24:660-70, 1998.

CHEN, L. & WATKINS, J.F. Evidence against the presence of H-2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumor cells. **Nature**, 25, 734, 1970.

CHOUAIB, S.; ASSELIN-PATUREL, C.; MAMI-CHOUAIB, F.; CAIGNARD, A.; BLAY, Y.B. the host tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. **Immunology Today**, 18: 493, 1997.

CLERICI, E.; MOCARELLI, P.; VILLA, M.L. & NATALE, N. Influence of Ehrlich ascites carcinoma and repopulating ability of mouse bone marrow cells. **J Natl Cancer Inst.**, 47, 555, 1971.

DAS, T.; SA, G.; CHATTOPADHYAY, S.; RAY, P.K. Protein A-induced apoptosis of cancer cells is effected by soluble immune mediators. **Cancer Immunol Immunother.**, 51(7), 376-80, 2002.

DEGRASSI, F.; DE SALVIA, R.; BERGHELLA, L. The production of chromosomal alterations by β -lapachone, an activator of topoisomerase I. **Mutat Res.**, 288: 263-7, 1993.

DELMONTE, L.; LIEBELT, A. & LIEBELT, R. Granulopoiesis and thrombopoiesis in mice bearing transplanted mammary cancer. **Cancer Res.**, 26, 149,1966.

DOLAN, M.E.; FRYDMAN, B.; THOMPSON, C.B. *et al.* Effect of 1,2-naphthoquinones on human tumor cell growth and lack of cross-resistance with other anticancer agents. **Anti-cancer Drugs**, 9: 437-48, 1998.

DONALDSON, D.M. & MITCHELL, J.R. Immunization of mice against Ehrlich's ascites carcinoma with X-irradiated tumor cells. **Proc Exp Biol.**, 101, 204, 1959.

DREW, J. Immunopharmacology: principles and perspectives. **New York, Springer-Verlag**, 219, 1990.

DUBIN, M.; VILLAMIL, S.H.F.; STOPPANI, A.O.M. Citotoxicidad de la b-lapachona: una o-naftoquinona con posibles usos terapeuticos. **MEDICINA (Buenos Aires)**, 61: 343-350, 2001.

ELGERT, K.D.; ALLEVA, D.G. AND MULLINS, D.W. Tumour induced immune dysfunction: the macrophage connection. **J. Leukocyte Biol.**, 64: 275, 1998.

ESTRELLA, E. Plantas medicinales Amazonicas: realidad y Perspectiva. **Tratado de Cooperación amazónica**. Secretaría Pro-Tempore. Lima, Perú. P.192-193.

FECCHIO, D.; RUSSO, M.; SIROIS, P.; BRAQUET, P. AND JANCAR, S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF-antagonists. **Int. J. Immunopharmacol.**, 12: 57, 1990.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M. AND JANCAR, S. STUDIES. On inflammatory response induced by Ehrlich tumour in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, 14: 125, 1990.

FERNÁNDEZ VILLAMIL, S.H.; DUBIN, M.; MOLINA PORTELA, M.P.; PERISSINOTTI, L.J.; BRUSA, M.A.; STOPPANI, A.O.M. Semiquinone production by lipophilic o-naphthoquinones. **Redox Report**, 3: 245-52, 1997.

FERREIRA DE SANTANA, C.; DE LIMA, O.; DÁLBQUERQUE, I.L.; LACERDA, A.L.; MARTINS, D.G. Antitumoral and toxicological properties of extracts of bark and various wood components of Pau d'arco (*Tabebuia avellanadae*). **Rev.Inst.Antibio.** (Recife), 8:89-94, 1968.

FETROW, C. AVILA, J. **Professional's Handbook of complementary and alternative medicine** 2nd. Ed. Springhouse, USA, 2001.

FRYDMAN, B.; MARTON, L.J.; SUN, J.S. *et al.* Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by β -lapachone and related naphthoquinones. **Cancer Res.**, 57: 620-27, 1997.

GHOSH, P.; KOMSCHLIES, L.; CIPPITELLI, M.; LONGE, D.L.; SUBLESKI, J.; YE, J.; SICA, A.; YOUNG, H.A.; WILTROUT, R.H. & OCHOA, A.C. Loss of T-helper 1 (Th1) population in the spleen of mice during progressive tumor growth. **J Natl Cancer Inst.**, 87, 1478, 1995.

GIL, J.; ALVAREZ, R.; VIÑUELA, J.E.; MORALES, J.G.R.; BUSTOS, A.; DE LA CONCHA, E.G. & SUBIZA, J.L. Inhibition of *in vivo* tumor growth by a monoclonal IgM antibody recognizing tumor cell surface carbohydrates. **Cancer Res.**, 50, 7301, 1990.

GIRARD M.; KINDACK, D.; DAWSON, B.; ETHIER, J.; AWANG, D.; GENTRY, A. Naphthoquinone constituents of *Tabebuia* sp. **J Nat Prod.**, 51: 1023-1024, 1988.

GOEL, R. K.; PATHAK, N. K. R.; BISWAS, M.; PANDEY, V. B.; SANYAL, A. K. **J Pharm Pharmacol.**, 39,138, 1987.

GONG, H.Y. & LUI, G.Z. Effect of electrochemical therapy on immune functions of normal and tumor-bearing mice. **Eur J Surg Suppl.**, 574, 73, 1994.

GOODWIN, J.S.; WEBB, D.R. Regulation of the immune response by prostaglandins. **Clin Immunol Immunopathol.**, 15(1), 106-22, 1980.

GOTTLIEB, O.R. & BORIN, M.R.M.B. Natural products research in Brazil. **Ciência e Cultura**, 49, 315, 1997.

GRISWOLD, D.P.; TRADER, M.W.; FREL, E.; PETERS, W.P.; WOLPERT, M.K. & LASTER, W.R. Response of drug-sensitive and resistant L1210 leukemias to high-dose chemotherapy. **Cancer Res.**, 47, 2323, 1987.

GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, J.E.; PAMPLONA, S.S.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, 65(8):687-9, 1999.

HRYNINK, W. & LEVINE, M.N. Analysis of dose intensity for adjuvant chemotherapy trials in stage II breast cancer. **J Clin Oncol.**, 4, 1162, 1986.

HRYNINK, W. & LEVINE, M.N. Analysis of dose intensity for adjuvant chemotherapy trials in stage II breast cancer. **J Clin Oncol.**, 4, 1162, 1986.

HUANG, L.; & PARDEE, A.B. β -Lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Mol Med.**, 5: 711-20, 1999.

HUDSON, W.S.; LUZZE, H.; HURST, T.J.; QUIGLEY, M.A. KYOSIIMIRE, J.; NAMUJJU, P.B.; JOHNSON, J.L.; KALEEBU, P.; OKWERA, A.; ELLIOTT, A.M. HIV-1 related pleural tuberculosis: elevated production of interferon-gamma, but failure of immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **AIDS**, 15: 467, 2000.

JAGETIA, G.C. & RAO, S.K. Evaluation of the antineoplastic activity of guduchi (*Tinospora cordifolia*) in Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. **Biol Pharm Bull.**, 29(3): 460-466, 2006.

JOLY, A.B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. **Biblioteca universitária**, São Paulo, 12: 595-6, 1998..

JONES, K. Pau d'Arco: Immune power from the rainforest. **Healing Art Press, USA**, 1994.

JUSTO, G.Z.; DURÁN, N.; & QUERIROZ, M.L.S. Myelopoietic response in tumour-bearing mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Eur J Pharmaol.**, 388: 219, 2000.

JUSTO, G.Z.; SILVA, M.R, QUEIROZ, M.L.S. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol** **23**:119-32, 2001.

KEEB, G & LALA, P.K. Effect of Ehrlich ascites tumour transplantation in mice on the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies in vitro. **Eur J Cancer**, **14**: 331-342, 1978.

KITA, E.; NISHIKAWA, F. YAGYU, Y.; HAMURO, A.; OKU, D.; EMOTO, M.; KATSUI, N.; TANIKAWA, I. & KASHIBA, S. Nonspecific stimulation of host defense by *Corynebacterium kutscheri*. I. Antitumor effect. **Nat Immun Cell Growth Regul.**, **8**, 313, 1989.

KIU, T.J.; LIN, S.T.; CHAU, Y.P. **Toxicol Appl Pharmacol.**, **182**, 116, 2002.

KOPF-MAIER, P. & HESSE, A. Immunologic response to the treatment of Ehrlich ascites tumor with titanocene dichloride. **J Cancer Res Clin Oncol.**, **108**, 254, 1984.

KURLAND, J.I.; KINCADE, P.W.; MOORE, M.A. Regulation of B-lymphocyte clonal proliferation by stimulatory and inhibitory macrophage-derived factors. **J Exp Med.**, **146**: 1420, 1977.

KUTTAN, G. & KUTTAN, R. Immunomodulatory activity of a peptide isolated from *Viscum album* extract (NSC 635 089). **Immunol Invest.**, **21**, 285, 1992.

LALA, P.K.; PARHAR, R.S.; SINGH, P. & LALA, P.K. Cure of murine Ehrlich ascites tumors with chronic oral indomethacin therapy combined with intraperitoneal administration of LAK cells and IL-2. **Cancer Lett.**, **51**, 27, 1990.

LALA, P.K.; TERRIN, M.; LIND, C. & KAIZER, L. Hemopoietic redistribution in tumor-bearing mice. **Exp. Hematol.**, **6**, 283, 1977.

LEE, J.H.; CHEONG, J; PARK, Y.M.; CHOI, Y.H. Down –regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacol Research.**, **51**: 553-560; 2005.

LI, C.J.; LI, Y.Z.; PINTO, A.V.; PARDEE, A.B. Potent inhibition of tumor survival in vivo by β -lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proc. Natl.**

LI, C.J.; WANG, C.; PARDEE, A.B. Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells. **Cancer Res.**, 55: 3712-5, 1995.

LI, C.J.; ZHANG, L.; DEZUBE, B.; CRUMPACKER, C.; PARDEE, A. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Proc Natl Acad Sci.**, 90:1839-1842, 1993.

LI, Y. Z.; LI, C. J.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B.; *Mol. Med.* **1999**, 5, 232.

LI, Y.Z.; LI, C.J.; VENTURA PINTO, A.; PARDEE, A.B. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by β -lapachone in human carcinoma cells. *Mol Med* 1999; 5: 232-9. *Acad. Sci. USA* 1999, 96:13369-74.

LINDEMANN, J. Immunity to transplantable tumors following viral oncolysis. I. Mechanism of immunity to Ehrlich ascites tumor. **J Immunol.**, 92, 912, 1969.

LITTMAN, M.L.; KIM, Y.C. & SUK, D. Immunization of mice to sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma with ultraviolet-killed tumor vaccine. **Proc Exp Biol.**, 127, 7, 1968.

MALE, D.; COOKE, A.; OWEN, M.; TROWSDALE, J. & CHAMPION, B. (eds.). “**Advanced Immunology**”, Mosby, London, 3rd edition, 1996.

MANNA, S.; GAD, Y.P.; MUKHOPADHYAY, A.; AGGARWAL, B.B. Suppression of tumor necrosis factor-activated nuclear transcription factor-kB, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis by β -lapachone. **Biochem Pharmacol.**, 57: 763-74, 1999.

MANS, D.R.A.; JUNG, F.A. & SCHWARTSMANN, G. Anticancer drug discovery and development. **Ciência e Cultura**, 46, 70, 1994.

MANTOVANI, A.; BOTTAZZI, B.; COLOTTA, F.; SOZZANI, S. & RUCO, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today**, 13, 265, 1992.

MARUSIC, M. Immune mechanisms in Ehrlich ascites tumor growth in mice. **Exp J Cancer**, 15, 39, 1979.

MAZUREK, C. & DUPLAN, J.F. Transfert de l'immunité acquise contre la tumeur solide d'Ehrlich. **Bull Ass Franç Cancer**, 48, 68, 1961.

MCKEE, R.W.; GARCIA, E.; TROCH, M.R. & SLATER, C. Establishment of resistance to growth of Ehrlich ascites carcinoma in C57 black mice. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 102, 591, 1959.

METCALF, D. The basic biology of haematopoiesis. **In: Metcalf, D., Editor, *The haemopoietic colony stimulating factors*, Elsevier, Amsterdam, 1–26, 1984.**

MILLER, J.S. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. **Experimental Hematology**, 29: 1157, 2001.

MIRANDA, F.G.; VILAR, J.C.; ALVES, I.A.N.; DE HOLANDA CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. Inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, 1:6, 2001.

MIRANDOLA, L.; JUSTO, G.Z. & QUEIROZ, M.L.S. Modulation by *Acanthospermum australe* extracts of the tumor induced hematopoietic changes in mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 24(2), 275-288, 2002.

MIYAZAWA, Y.; MURAYAMA, T.; OOYA, N.; WANG, L.F.; TUNG, Y.C. & YAMAGUCHI, N. Immunomodulation by a unicellular green algae (*Chlorella pyrenoidosa*) in tumor-bearing mice. **J Ethnopharmacol.**, 24, 135, 1988.

MORENO, M., ISLÃ, M., SAMPIETRO, A., VATTUONE, M.. Comparison of the free radical-scavenging activity of popolis from several regions of Argentina. *Journal of ethnopharmacol*, 71: 109-114, 2000.

MONDAL, T.K.; BHATTA, D.; BISWAS, S.; PAL, P. Repeated treatment with *S. aureus* superantigens expands the survival rate of Ehrlich ascites tumor bearing mice. **Immunol Invest.**, 31(1), 13-28. 2002

MONDAL, T.K.; BHATTA, D.; BISWAS, S.; PAL, P. Superantigen-induced apoptotic death of tumor cells is mediated by cytotoxic lymphocytes, cytokines, and nitric oxide. **Biochem Biophys Res Commun.**, 290(4), 1336-42, 2002.

MORGAN, C. D.; LEFKOWITZ, S.S. & EVERSE, J. Synergism of dimethoxybenzosemiquinone free radicals and CD4+ T-lymphocytes to suppress Ehrlich ascites tumor. **P.S.E.B.M.**, 217, 89, 1998.

MYLONAKI-CHARALAMBOURS, E.; MOURELATOS, D. E.; KOTSIS, A. A comparative study of the cytogenetic and antineoplastic effects induced by carboplatin in combination with niacin in human lymphocytes in vitro and in Ehrlich ascites tumor cells in vivo. **Chemotherapy**, 44, 121, 1998.

O'GARRA, A. Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. **Chem Immunol.**, 63, 1, 1996.

OGHISO, Y., YAMADA, Y., ANDO, K., ISHIHARA, H., SHIBATA, Y.- Differential induction of prostaglandin E2 –dependent and independent immune suppressor cells by tumour-derived GM-CSF and M-CSF. **J. Leukocyte Biol.**, 53, 86-92, 1993.

OLINESCU, A.; HRISTESCU, S.; SALAGEANU, A.; MANDA, G. & NEAGU, M. In vivo and in vitro effect of Cantastim, an immunomodulatory agent extracted from a highly pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strain. **Neoplasma**, 38, 119, 1991.

OLIVEIRA, M.M. & BRAGGIO, M.M. Analogues and products, permanent useful alternatives to improve the effectiveness of natural anticancer compounds: enhanced activity of slightly soluble salts of olivacine in L₁₂₁₀ leukemia. **Ciência e Cultura**, 49, 370, 1997.

ONO, M.; URABE, T.; OKAMOTO, Y.; MURAKAMI, H.; TATEMOTO, A.; OHNO, S.; YAMAMOTO, H.; WATANABE, R.; HIZUTA, A.; TANAKA, N. *et al.* Augmentation of murine organ-associated natural immune responses by cepharanthin. **Gan To Kagaku Ryoho**, 15, 127, 1988.

ORRACA, Z.M.; RIOS-OLIVARES, E.; CARRASCO-CANALES, J.A.; AQUINO, E.; MARCHAND, A.M. & COLON, J.I. Characterization of the antitumor activity of a polyantigenic immunomodulator (PAI): II - Involvement of NK cells and adoptive immunotherapy. **Bol Asoc Med P R.**, 81, 254, 1989.

ORSOLIC N., BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis (WSDP) a factor of antitumor reactivity. **Journal of ethnopharmacol**, 84:265-273, 2003.

PARDEE, A.B.; LI, Y.Z.; LI C.J.. Cancer therapy with beta-lapachone. *Curr Cancer Drug Targets*, 227-242, 2002.

PARHAR, R.S.; LALA, P.K. Prostaglandin E2-mediated inactivation of various Killer lineage cells by tumour-bearing host macrophages. *J Leukoc Biol.*, 44, 185– 190, 1988.

PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; VILLA, S. & MOCARELLI, P. CFU-S and CFU-C proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich Ascitic Fluid. *Oncology*, 39: 391, 1982.

PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; VILLA, S.; MAROCCHI, A. & MOCARELLI, P. Factors produced by macrophages and tumour cells: Influence on the granulocytic precursors cells (CFU-C) in normal and tumour bearing mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 102: 235, 1982.

PINK, J.J.; PLANCHON, S.M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M.E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D.A. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β -lapachone cytotoxicity. *J Biol Chem.*, 275: 5416-24, 2000.
PINK, J.J.; WUERZBERGER-DAVIS, S.; TAGLIARINO, C. *et al.* Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone-mediated apoptosis. *Exp Cell Res.*, 255: 144-55, 2000.

PINTO, C. N.; DANTAS, A. P.; DE MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; OLEQUEVITCH, P. F.; PINTO, M. C. F. R.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A. V.; *Arzneim.-Forsch.*, 12, 1120, 2000.

PLANCHON, S.M.; WUERZBERGER-DAVIS, S.M.; PINK, J.J.; ROBERTSON, K.A.; BORNHANN, W.G.; BOOTHMAN, D.A. Bcl-2 protects against β -lapachone-mediated caspase 3 activation and apoptosis in human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Oncol Rep.*, 6: 485-92, 1999.

QUEIROZ, M.L.S.; JUSTO, G.Z.; VALADARES, M.C.; PEREIRA-DA SILVA, F.R.R. Evaluation of *Caesalpinia férrea* extract bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 23:215-228, 2001.

QUEIROZ, M.L.S.; VALADARES, M.C.; BINCOLETTO, C.; DIEAMANT, G. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, 26 (4): 511-525, 2004.

RAHAL, D.M.; REINSH, E.; OSMOND, D.G. Changes in the populations of null, NK1.1+ and Thy1¹⁰ lymphocytes in the bone marrow of tumor-bearing mice: effect of indomethacin treatment. **Cellular Immunology**, 23:215, 2001.

RAISUDDIN, S.; ZAIDI, S.I.; SINGH, K.P. & RAY, P.K. Effect of subchronic aflatoxin exposure on growth and progression of Ehrlich's ascites tumor in mice. **Drug Chem Toxicol.**, 14, 185, 1991.

RIOS-OLIVARES, E.; ORRACA, Z.M.; CARRASCO-CANALES, J.A.; ALVARADO, L.; MARCHAND, A.M. & COLON, J.I. Characterization of the antitumor activity of a polyantigenic immunomodulator (PAI): I - Utilization of cimetidine and cyclosporine A. **Bol Asoc Med P R.**, 81, 246, 1989.

RUIZ DE MORALES, J.; VE'LEZ, D.; SUBIZA, J.L. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Exp.Hematol.**, 27, 1757– 1767, 1999.

RUSZALA-MALLON, V.; SILVA, J.; LUMANGLAS, A.L.; DURR, F.E.; WANG, B.S. Depresión of cell-mediated immunity in plasmacytoma-bearing mice. **Immunol Cel Biol.**, 63: 11-16, 1991.

SANTOS A. F.; FERRAZ, P. A. L.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F.R.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. **Int J Parasitol.**, 30, 1199, 2000.

SARDENBERG, I. A guerra ao câncer. **Revista Veja**, 17 de abril, 76, 1996.

SCHAFFNER-SABBA, K.; SCHMIDT-RUPPIN, K.H.; WEHRLI, W.; SCHUERCH, A.R.; WASLEY, J.W.F. β -lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. **J Med Chem.**, 27: 990-4, 1984.

SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Intern. Immunopharmacol.**, 6: 317-333, 2006.

SCHEPETKIN, I.A., FAULKNER, T.G.; NELSON-OVERTON, L.K.; WILEY, J.A.; QUINN, M.T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **Int. Immunopharmacol.** 5: 1783-99, 2005.

SEGURA, J.A.; BARBERO, L.G.; MARQUES, J. Early tumour effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Lett.** 414, 1– 6, 1997..

SEGURA, J.A.; BARBERO, L.G.; MARQUES, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. **Immunol. Lett.**, 74, 111 – 115, 2000.

SETHI, K.K. & BRANDIS, H. Protection of mice from malignant tumor implants by enucleated tumor cells. **J Natl Cancer Inst.**, 53, 1175, 1974.

SHEWCHUK, L.D.; BARACOS, V.E. & FIELD, C.J. Reduced splenocyte metabolism and immune function in rats implanted with the Morris Hepatoma 7777. **Metabolism-Clin Exp.**, 45, 848, 1996.

SHIAH, S.G.; CHUANG, S.E.; CHAU, Y.P.; SHEN, S.C. KUO, M.L. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis through an oxidation dependent pathway. **Cancer Res.**, 59: 391-8, 1999.

SILVA, L.A.; NASCIMENTO, K.A.; MACIEL, M.C.; PINHEIRO, M.T.; SOUSA, P.R.; FERREIRA, S.C.; AZEVEDO, A.P.; GUERRA, R.N. Nascimento FR.Sunflower Seed Oil-Enriched Product Can Inhibit Ehrlich Solid Tumor Growth in Mice. **Chemotherapy**, 52(2):91-94, 2006.

SILVA, R.J.; DA SILVA, M.G.; VILELA, L.C.; FECCHIO, D. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom. **Mediat. Inflamm.**, 11, 197– 201, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **2 ed.rev. Porto Alegre: Florianopolis. Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC**, p.291-320, 2000..

SINGH, K.P.; ZAIDI, S.I.; RAISUDDIN, S.; SAXENA, A.K.; MURTHY, R.C. & RAY, P.K. Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, 14, 813, 1992.

SNYDERMAN, R.; PIKE, M.C. An inhibitor of macrophage chemotaxis produced by neoplasms. **Science**, 192(4237):370-2, 1976.

SUBIZA, J.L.; COLL, J.; ALVARES, R.; VALDIVIESO, M.; DE LA CONCHA, E.G. IgM response and resistance to ascites tumour growth. **Cancer Immunol Immunothe.**, 25: 87-92, 1987.

SUBIZA, J.L.; VINUELA, J.E.; RODRIGUEZ, R.; GIL, J.; FIGUEREDO, M.A.; DE LA CONCHA, E.G. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumour-bearing mice. **Int J Cancer**, 44, 307-313, 1989.

SUR, P.; BAG, S.P.; SUR, B. & KHANAM, J.A. Chloroaceto hydroxamic acid as antitumor agent against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Neoplasma**, 44, 3, 1997.

SUZUKI, F.; BRUTKIEWICZ, R.R. & POLLARD, R.B. Importance of T-cells and macrophages in the antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132). **Anticancer Res.**, 5, 479, 1985.

TAKAHASHI, M.; MARUYAMA, S.; MORIYAMA, Y.; SHIBATA, A. Applicability of antimyeloid monoclonal antibodies (L4F3, 1G10) to autologous bone marrow transplantation for patients with acute myelogenous leukemia. **Transp Proc.**, 24: 416-418, 1992.

TAKAHASHI, M.; USHIJIMA, T. & OZAKI, Y. Biological activity of *Pityrosporium*. II. Antitumor and immune stimulating effect of *Pityrosporium* in mice. **J Natl Cancer Inst.**, 77, 1093, 1986.

TANOSAKI, R.; OKAMOTO, S.; AKATSUKA, N.; ISHIDA, A.; MICHIKAWA, N.; MASUDA, Y.; UCHIDA, H.; MURATA, M.; KISAKI, M. & IKEDA, Y. Dose escalation of biweekly cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone using recombinant human granulocyte colony stimulating factor in non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer**, 74, 1939, 1994.

TEIXEIRA, M. J.; DE ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA FILHA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA, J. R. C. JR.; COELHO, I. C. B.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M. L. **Phytoter Res.** 15, 44, 2001.

THUNOLD, S. Local cellular reactions and splenic weight in mice with Ehrlich's ascites carcinoma. **Acta Path Microbiol Scand.**, 72, 542, 1968.

TOMIDA, M.; YAMAMOTO-YAMAGUCHI, Y.; HOZUMI, M. Purification of a factor inducing differentiation of Mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of Mouse fibroblast L929 cells. **J Biol Chem.**, 259: 10978-82, 1984.

TRINCHIERI, G. Role of interleukin-12 in human Th1 response. **Chem Immunol.**, 63, 14, 1996.

UTSUMI, K.; TAKAI, Y.; TADA, T.; OHZEKI, S.; FUJIWARA, H. & HAMAOKA, T. Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. **J Immunol.**, 145, 397, 1990.

VALADARES, M.C.; CARRUCHA, S.G.; ACCORSI, W.; QUEIROZ, M.L.S. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. **International Immunopharmacol.**, 6:294-299, 2006.

VALADARES, M.C.; KLEIN, S.I.; GUARALDO, A.M.A.; QUEIROZ, M.L.S. enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumour. **European J Pharmacol.**, 473: 191-196, 2003.

VALADARES, M.C.; KLEIN, S.I.; QUEIROZ, M.L.S. Titanocene modulation of cytokine imbalance induced by Ehrlich ascites tumour progression. **European J Pharmacol.**, 503: 203-208, 2004.

VALADARES, M.C.; KLEIN, S.I.; ZYNGIER, S.B.; QUEIROZ, M.L.S. Growth and differentiation of bone marrow haematopoietic cells in mice bearing Ehrlich ascites tumour and treated with dicyclopentadienyldichlorotitanium (IV). **Int J Immunopharmacol.**, 20, 573– 581, 1998.

VALADARES, M.C.; QUEIROZ, M.L.S. The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C₅H₅)₂ NCS₂, on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **Eur J Pharmacol.**, 439, 35– 42, 2002.

VALADARES. M. C.; RAMOS, A.L.; REHMANN, F.J.K.; SWEENEY, N.J.; STROHFELDT, K.; TACKE, M.; QUEIROZ, M.L.S. antitumour activity of [1,2-di(cyclopentadienyl)-1,2-di(p-N,N-dimethylaminophenyl)-ethanediyl] titanium dichloride in xerografted Ehrlich's ascites tumour. **European J Pharmacol.**, 2006 in press.

VERTESI, C. Immune response developing in tumorous organism as a result of immunotherapy. Chance of recovery? **Med Hypotheses**, 40, 335, 1993.

WATSON, G.A.; FU, Y.X. & LOPEZ, D.M. Splenic macrophages from tumor-bearing mice co-expressing MAC-1 and MAC-2 antigens exert immunoregulatory functions via 2 distinct mechanisms. **J Leukoc Biol.**, 49, 126, 1991.

WHITNEY, R.B.; KELLY, B.S. & LEVY, J.G. Immunosuppression in mice bearing primary tumors. **Eur J Cancer**, 14, 699, 1978.

WLEKLIK, M.; ZAHORSKA, R.; LUCZAK, V.,. Interferon-inducing activity of flavonoids. *Acta Microbiologica Poland*, 32: 1141-1148, 1997.

WONG, C.K.; FUNG, K.P.; KONG, S.K.; LEE, C.Y. & CHOY, Y.M. Endogenous production of tumor necrosis factor alpha in combination with hyperthermia for the treatment of mice bearing Ehrlich ascites tumor. **Chemotherapy**, 41, 378, 1995.

XIANG, D.B. & LI, X.Y. Antitumor activity and immuno-potentiating actions of *Achyranthes bidentata* polysaccharides. **Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao.** 14, 556, 1993.

YAMAMOTO, N.; ZOU, J.P.; LI, X.F.; TAKENAKA, H.; NODA, S.; FUJII, T.; ONO, S.; KOBAYASHI, Y.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T. Regulatory mechanisms for production of IFN- γ and TNF- α by antitumour T-cells or macrophages in the tumour-bearing state. **J Immunol.**, 154, 2281– 2290, 1995.

YAN, Y.S. Effect of Chinese tea extract on the immune function of mice bearing tumor and their antitumor activity. **Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih.**, 26, 5, 1992.

YOSHIDA, J.; TAKAMURA, S. & SUZUKI, S. Antitumor action of an acidic glycoprotein (SAGP) from *Streptococcus pyogenes* in mice. **Biotherapy**, 3, 331, 1991.

8- APÊNDICE



Tabela 3- Avaliação de sobrevida de animais inoculados com TAE (6×10^6 cels/ml) e tratados com 7 doses de 30, 120 ou 500mg/kg de ETA. O tratamento com o ETA iniciou-se 24h após a inoculação das células tumorais (n=20 por grupo); $p < 0,01$; Teste Cox-Mantel.

SOBREVIDA

DIAS	*CRTL	30mg/kg	120mg/kg	500mg/kg
15	2	2		2
16	3	2	2	1
17	3	2	1	2
18	5			2
19	2	2	2	
20	1	4	1	4
21	4	3	2	3
22		2		2
23		1		4
24		2	1	
25			2	
26			3	
27			3	
28			3	
29				
30			3	

* CRTL: animais portadores do TAE (6×10^6 cels/ml) que não receberam tratamento.

Tabela 4- Avaliação de sobrevivência de animais inoculados com TAE (6×10^6 cels/ml) e tratados com 3 administrações i.p. de β -lapachona (1, 2 e 5mg/kg). O tratamento iniciou-se 24h após a inoculação das células tumorais (n=20 por grupo) $p < 0,01$; Teste Cox-Mantel.

SOBREVIDA

DIAS	*CTRL	1mg/kg+TAE	2mg/kg+TAE	5mg/kg + TAE
3				2
4				5
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15	2			
16	3			4
17	3		2	
18	5	1	2	
19	2	1	4	4
20	1	2	4	2
21	4	2		
22		4		3
23			3	
24		2		
25				
26				
27		3		
28				
29		2		
30		1		

* CTRL: animais portadores do TAE (6×10^6 cels/ml) que não receberam tratamento.

Tabela 5- Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/ml) e tratados com extrato de *Tabebuia avellaneda* nas doses de 30, 120, 500 mg/kg/dia, por 7 dias após a inoculação do tumor. Os animais foram sacrificados 24h após o tratamento. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. $p < 0,05$ comparado ao controle, $p < 0,05$ comparado ao TAE.

Parâmetros $\times 10^3$

n	CTRL	30mg/kg	120mg/kg	500mg/kg	TAE	TAE + 30mg/kg	TAE + 120mg/kg	TAE + 500mg/kg
1	14.8	14.2	13.2	15.8	6.7	9.2	15.8	7.7
2	17.8	15.4	14.9	16.6	4.8	9.4	16.6	6.2
3	14.1	14.3	16.8	18.8	6.2	8.5	18.8	6.9
4	16.2	14	17.1	15.4	4.1	6.1	15.4	6.8
5	18.3	16.75	18.4	14.8	6.9	11.3	14.8	7.7
6	20.4	16.1	15.8	18.3	8	12.2	18.3	5.8
MD	17.6	15.79	16.53	16.62	6.17	9.45	16.62	6.85
DP	2.814	1.69	1.91	1.61	1.43	2.15	1.61	0.77

Tabela 6- Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/ml) e tratados com extrato de *Tabebuia avellaneda* nas doses de 30, 120, 500 mg/kg/dia, por 7 dias após a inoculação do tumor. Os animais foram sacrificados 24h após o tratamento. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $p < 0,01$ comparado ao controle, # $p < 0,01$ comparado ao TAE.

Parâmetros $\times 10^2$

n	CTRL	30mg/kg	120mg/kg	500mg/kg	TAE	TAE + 30mg/kg	TAE + 120mg/kg	TAE + 500mg/kg
1	11.80	7.2	5.9	10.5	105	77.8	12.8	68.4
2	17.70	11.8	15.4	7.5	91.2	68.2	16.2	70.2
3	20.60	13.8	12	14.4	93.6	84.6	24.4	66
4	8.85	12.9	12	15	97.5	67.8	27.5	64.2
5	14.75	12	9	12	76	88.2	18.2	59.8
6	8.85	10.4	8.8	13.2	68.2	66.8	24.5	52.2
MD	15,17	12.47	10.52	12.7	88.58	75.57	20.6	63.47
DP	3.60	2.50	3.31	2.63	13.82	9.35	5.71	6.58

Tabela 7 - Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com 3 administrações i.p. de β -lap (1, 2 e 5mg/kg/dia). Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $p < 0,001$ comparado ao controle.

Parâmetros $\times 10^2$

n	CTRL	1mg/kg	2mg/kg	5mg/kg	TAE	TAE + 1mg/kg	TAE + 2mg/kg	TAE + 5mg/kg
1	14.8	16.4	14	6.2	6.7	15.4	10.4	8.2
2	17.8	15	10.5	6.4	4.8	14.8	8.2	6.2
3	14.1	13.6	11.2	8.6	6.2	16.8	7.4	5.2
4	16.2	15.6	12.2	6.6	4.1	14.6	7.1	6.4
5	18.3	14.8	14		6.9	11.4	6.2	5.4
6	20.4	12.8	11.8		8	15.2	5.8	
MD	17.6	15.03	12.28	6.9	6.17	14.7	7.52	6.48
DP	2.814	1.87	1.45	1.73	1.43	1.79	1.65	1.17

Tabela 8- Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com 3 administrações i.p. de β -lap (1, 2 e 5mg/kg/dia). Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $p < 0,01$ comparado ao controle.

Parâmetros $\times 10^2$

n	CTRL	1mg/kg	2mg/kg	5mg/kg	TAE	TAE + 1mg/kg	TAE + 2mg/kg	TAE + 5mg/kg
1	11.80	17,1	32	54,9	105	43.2	57.8	102.4
2	17.70	14,4	34.6	39.6	91.2	43.6	61.9	73.6
3	20.60	16,2	33.6	74.3	93.6	34	85.8	87.5
4	8.85	12,8	41	64.1	97.5	39.7	56.8	88.7
5	14.75	14.6	40		76	36.6	59.8	78.0
6	8.85	19,2	28.8		68.2	39.7	44.7	
MD	15,17	16.10	35	58,4	88.58	39.47	64.42	86,4
DP	3.60	3.9	4.70	12,2	13.82	3.72	9.81	10.75

Tabela 9- Atividade das células “Natural killer” em diferentes razões de célula efetora/ célula alvo (YAC-1), em animais portadores do TAE, somente tratados com ETA (30, 120 e 500mg/kg) por 7 dias e portadores/tratados. Os animais foram sacrificados 24h após o tratamento. ANOVA, Teste de Tukey * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

% citotoxicidade

n	CTRL	TAE	30mg/kg	TAE + 30mg/kg	120mg/kg	TAE + 120mg/kg	500mg/kg	TAE + 500mg/kg
1:50	22	2.7	25	5.2	21	24.5	15	10.5
1:25	12.5	4.2	14.5	5.1	14.5	15	11.5	5.2
1:12,5	10	3.9	9	2.1	8.5	10.5	8	4.5
1:6,25	3.5	2.3	4.5	0.7	6	4.5	4.5	4.9
1:50	23	7.1	26.5	12.7	24.5	20.5	18	8.5
1:25	16	6.1	19	11.0	12	19	11	8.0
1:12,5	11	4.5	10	5.1	8	10	9	7
1:6,25	5	1.7	6	2.8	5.5	3.5	5.5	4.4
1:50	22	7.2	18	5.9	26	15	20	6
1:25	19	3.5	14	4.3	16.5	9	16	4.1
1:12,5	9	3.2	9.5	3.1	8	5.5	7	2.5
1:6,25	5	2.1	6.5	1.8	3.5	3	4.5	2.2
1:50	24	12.2	31	5.7	20.5	23	14	6.5
1:25	18	4.3	16	3.8	15	18	12.5	4.7
1:12,5	6	2.0	12	3.1	8	12.5	9	3
1:6,25	4.5	1.8	5	2.2	4.5	5.5	5.5	2.8
1:50	22	6.6	28	12.4	16	19	18	6.5
1:25	15	5.1	14	6.9	11	15	12.5	5.2
1:12,5	8	3.7	9	4.3	8.5	11.5	7	3
1:6,25	5.5	0.9	4.5	3.6	5.5	4.5	2.5	2.4
1:50	23	4.0	35	6.3	20	25	16	9
1:25	10.5	4.9	13	4.2	15.5	22.5	14.5	8.0
1:12,5	6	3.1	9.5	2.4	8	8.5	8.5	4.5
1:6,25	4.5	1.8	5.5	0.9	5.5	4	4.5	3.8
X	22,7±0,82	6.5±3.5	27,2±5,8	8.2±3.8	21,34±3,54	21,17±1,8	16,83±4,23	7,83±2,75
	15,1±3,20	4.6±1.2	15,2±3,82	5.42±2.1	13,34±1,89	16,42±4,58	14,0±1,41	5.8±1.6
	8,3±2,0	3.6±0.8	8,58±2,46	3.22±0.9	8,17±0,26	9,75±2,49	8,08±0,92	4,08±1,66
	4,80±1,68	1.8±0.6	5,17±0,82	2.00±0.8	5,09±0,92	4,17±0,88	4,5±1,1	3.42±0.8

Tabela 10- Atividade das células “Natural killer” em diferentes razões de célula efetora/ célula alvo (YAC-1), em animais portadores do TAE, somente tratados com 3 administrações de β -lap (1mg/kg/dia) e portadores/tratados. Os animais foram sacrificados no oitavo dia. ANOVA, Teste de Tukey * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

% citotoxicidade

n	CTRL	TAE	1mg/kg	TAE + 1mg/kg
1:50	22	2.7	22	11
1:25	12.5	4.2	14	9
1:12,5	10	3.9	8.5	3.5
1:6,25	3.5	2.3	4	3
1:50	23	7.1	26	13.5
1:25	16	6.1	14.5	11
1:12,5	11	4.5	9.5	3.5
1:6,25	5	1.7	4	3
1:50	22	7.2	19.5	17.5
1:25	19	3.5	11	11
1:12,5	9	3.2	8.5	8.5
1:6,25	5	2.1	3.5	5.5
1:50	24	12.2	20.5	10.5
1:25	18	4.3	15	6.5
1:12,5	6	2.0	6.5	4.5
1:6,25	4.5	1.8	4	3
1:50	22	6.6	17.5	14.5
1:25	15	5.1	9.5	9
1:12,5	8	3.7	7	6.5
1:6,25	5.5	0.9	4.5	4
1:50	23	4.0	22.5	14
1:25	10.5	4.9	16	8
1:12,5	6	3.1	8	5.5
1:6,25	4.5	1.8	3.5	4
X 1:50	22,7±0,82	6.5±3.5	21,34±2,91	13,17±2,79
X 1:25	15,1±3,20	4.6±1.2	13,34±2,52	9,08±1,75
X 1:12,5	8,3±2,0	3.6±0.8	8,0±1,09	5,34±1,94
X 1:6,25	4,80±1,68	1.8±0.6	3,92±0,38	3,75±0,99

Tabela 11- Concentração de IFN- γ (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados com 30, 120 ou 500mg/kg de ETA por 7 dias. Os animais foram sacrificados 24h após o termino do tratamento. Os resultados representam a media \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon, *p<0,05 comparado ao controle, # p<0,05 comparado ao TAE.

n	CTRL	TAE	30mg/kg	TAE + 30mg/kg	120mg/kg	TAE + 120mg/kg	500mg/kg	TAE + 500mg/kg
1	1658.5	1112.4	1546.8	670.2	1995.4	1182.4	1995.4	956.8
2	1760.2	782.5	1875.4	854.2	1384.2	1246.8	1342.5	870.2
3	1254.5	628.4	1583.5	734.1	1256.5	1442.5	1195.2	794
4	1674.5	838	1654.2	752.4	1678.2	1584.5	1632.5	858.2
5	1584.5	854.5	1456.2	956	1574.2	1670.5	1266.4	770.4
6	1624.2	546.3	1932.4	870.8	1583	1342.5	847.4	664.2
MD	1592.73	793.68	1674.75	806.28	1578.58	1411.53	1379.9	818.97
DP	175.79	197.93	189.49	105.36	255.04	190.97	393.60	100.1

Tabela 12- Concentração de IFN- γ (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados com 30, 120 ou 500mg/kg de ETA por 7 dias. Os animais foram sacrificados 24h após o termino do tratamento. Os resultados representam a media \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon, *p<0,05 comparado ao controle, # p<0,05 comparado ao TAE.

n	CTRL	TAE	1mg/kg	TAE + 1mg/kg
1	1658.5	1112.4	1346.2	1245.4
2	1760.2	782.5	1465.4	1042.4
3	1254.5	628.4	1224.5	1054
4	1674.5	838	960.4	1150
5	1584.5	854.5	1394	976
6	1624.2	546.3	1182	1150.2
MD	1592.73	793.68	1262.08	1103
DP	175.79	197.93	181.47	96.87

Tabela 13- Concentração de TNF- α (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados com 30, 120 ou 500mg/kg de ETA por 7 dias. Os animais foram sacrificados 24h após o termino do tratamento. Os resultados representam a media \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon, *p<0,05 comparado ao controle, # p<0,05 comparado ao TAE.

n	CTRL	TAE	30mg/kg	TAE + 30mg/kg	120mg/kg	TAE + 120mg/kg	500mg/kg	TAE + 500mg/kg
1	294	110.4	260.2	70.5	262.4	256.5	301.4	72.4
2	258.5	148.2	330.2	110.4	278.5	232.6	298.5	108.2
3	223	98	287.6	121.4	248	228.4	292.5	87.2
4	256.5	136.6	221	154.2	243.5	260.2	303.6	90.5
5	338	105	301.4	73.2	254.5	279.4	332	126
6	271	86.5	250.2	108.2	288.5	251.4	307	156
MD	273.5	114.12	275.1	106.32	262.57	251.42	305.83	106.72
DP	39.12	23.61	39.12	31.37	17.70	18.81	13.73	30.41

Tabela 14- Concentração de TNF- α (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados com 1mg/kg de β -lap, em 3 doses. Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a media \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon, *p<0,01 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao TAE

n	CTRL	TAE	1mg/kg	TAE + 1mg/kg
1	294	110.4	373	176.8
2	258.5	148.2	254	165.2
3	223	98	204.5	131.5
4	256.5	136.6	212	214.8
5	338	105	268.5	148.2
6	271	86.5	242	122.6
MD	273.5	114.12	259	159.85
DP	39.12	23.61	60.96	33.65

Tabela 15- Concentração de IL-10 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados com 30, 120 ou 500mg/kg de ETA por 7 dias. Os animais foram sacrificados 24h após o termino do tratamento. Os resultados representam a media \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon, *p<0,05 comparado ao controle, # p<0,05 comparado ao TAE.

n	CTRL	TAE	30mg/kg	TAE + 30mg/kg	120mg/kg	TAE + 120mg/kg	500mg/kg	TAE + 500mg/kg
1	315	472	276	450	294	397	322	494
2	285	459	310	475	306	383	285	384
3	321	524	224	504	330	334	386	514
4	284	584	342	524	313	426	354	427
5	338	486	304	494	288	384	312	502
6	366	584	280	590	274	417	321	588
MD	318.17	518.17	289.33	506.17	300.83	386.83	330	484.83
DP	31.52	55.44	39.87	48.22	19.78	29.48	35.23	71.25

Tabela 16- Concentração de IL-10 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com TAE e tratados com 1mg/kg de β -lap, em 3 doses. Os animais foram sacrificados no oitavo dia. Os resultados representam a media \pm D.P.M. de 6 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon, *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao TAE

n	CTRL	TAE	1mg/kg	TAE + 1mg/kg
1	315	472	286	454
2	285	459	322	422
3	321	524	336	394
4	284	584	279	440
5	338	486	305	460
6	366	584	312	356
MD	318.17	518.17	306.67	421
DP	31.52	55.44	21.54	39.81