

ANA PAULA DE ALMEIDA SALLES PERROUD

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E
COMPONENTES DE APOPTOSE NO TUMOR DE
WALKER 256, COMPARAÇÃO ENTRE A
LINHAGEM A E VARIANTE Ar**

CAMPINAS

2005

ANA PAULA DE ALMEIDA SALLES PERROUD

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E
COMPONENTES DE APOPTOSE NO TUMOR DE
WALKER 256, COMPARAÇÃO ENTRE A
LINHAGEM A E VARIANTE Ar**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em
Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica*

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

CAMPINAS

2005

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

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

P429e	Perroud, Ana Paula de Almeida Salles Estudo da expressão de citocinas e componentes de apoptose no tumor de Walker 256, comparação entre a linhagem A E variante Ar / Ana Paula de Almeida Salles Perroud. Campinas, SP: [s.n.], 2005. Orientador: Ricardo de Lima Zollner Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Tumor Walker 256. 2. Fator de Necrose Tumoral. 3. Citocinas. 4. Apoptose. 5. Interleucina-12. 6. Interferon alfa. 7. Fator Transformante de Crescimento-Beta. I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em inglês: Study of cytokine gene expression and components of apoptosis in walker 256. A comparison of variants A (Aggressive) and AR (Regressive).

Keywords: •Tumor Walker 256
•Tumor Necrosis Factor -alpha
•Cytokines
•Apoptosis
•Interleukin-12
•Interferon alpha
•Transforming Growth Factor-alpha

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Banca examinadora: Prof Dr Ricardo de Lima Zollner
Prof Dr Luís Henrique Barbosa Boechat
Profa. Dra. Carmen Silvia Lima Passos

Data da defesa: 18-10-2005

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Membros:

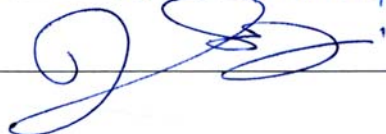
1. Prof(a). Dr(a). Luiz Henrique Barbosa Boechat



2. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Passos Lima



3. Prof(a). Dr(a). Ricardo de Lima Zollner



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/10/2005

DEDICATÓRIA

AL SHADAI

Ao Maurício,

*Meu esposo,
pelos melhores momentos de minha vida.*

*Você é assim
Um sonho pra mim
Eu penso em você
Desde o amanhecer
Até quando eu me deito
Eu gosto de você
E gosto de ficar com você
Meu riso é tão feliz contigo
O meu melhor amigo é o meu amor
Seus olhos meu clarão
Me guiam dentro da escuridão
Seus pés me abrem o caminho
Eu te sigo e nunca me sinto só
Eu penso em você
Desde o amanhecer
Até quando eu me deito*

Marisa Monte

Aos meus filhos Vinícius e Marina,

*Presentes de Deus para mim.
Ensinaram que a felicidade não está em viver
e sim saber viver*

Aos meus pais Izabel e Paulo

*Através do amor,
deram-me a confiança necessária para realizar meus sonhos.
Obrigado por não abrir portas,
e sim por permitir que eu aprendesse a abri-las.*

Aos meus irmãos Fernando e Cláudia

Por existirem.

À Vó Cida

Pelo amor, carinho e palavras de incentivo.

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a muitos e tantos familiares e amigos – tanto aos “velhos” e queridos quanto aos que se revelaram ao longo deste tempo.

Dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

Aos docentes da faculdade de Medicina de Sorocaba; em especial aos professores Diana Tannos, Celeste Oshiro, Clóvis Duarte Costa, Antônio Nelson Cincoto.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zöllner, na qualidade de amigo e orientador, que foi de extrema importância para o meu amadurecimento pessoal e médico. Sou grata por essa orientação que ultrapassa essa tese. Agradeço a confiança depositada no meu trabalho.

À banca examinadora Prof. Dr. Luís Henrique Barbosa Boechat e Prof. Dra. Carmen Silvia Lima Passos pelo enriquecimento das discussões.

À Profa. Dra. Teresa Cristina Samico Cavalcanti, pelo apoio e orientação durante o desenvolvimento do projeto. Sempre disposta a ajudar, suas discussões foram enriquecedoras.

À Profa. Maira Eduarda Zanin pela amizade e, sobretudo pelo ensino da bancada e realização da PCR.

À Profa. Dra. Gláucia Monteiro de Castro agradeço profundamente com importante colaboração na discussão do trabalho, dosando críticas com comentários de incentivo.

Ao Prof. Dr. Fernando Guimarães, pela colaboração da coleta das amostras.

À Prof. Dra. Conceição Aparecida Vilella pelo incentivo, afeto e colaboração.

À Meg, obrigado pelo apoio e amizade.

A todos os pós-graduandos do LICA, em especial à Danielle, Rika, Priscila, Carina, Bruna, Karla, Rhubia, Leonardo e Tiago, pela disponibilidade em ajudar.

A todos os amigos do SESI, que compartilharam as angústias e comemoraram os resultados.

*Os que confiam no Senhor
serão como monte Sião,
que não se abala,
mas permanece para sempre.*

(Salmo 125:1)

*Eu te exaltarei,
ó Deus,
Rei meu, e
bendito o teu Nome pelos séculos dos séculos.
Cada dia te bendirei e
louvarei o teu nome
pelos séculos dos séculos*

(Salmo 145:1-2)

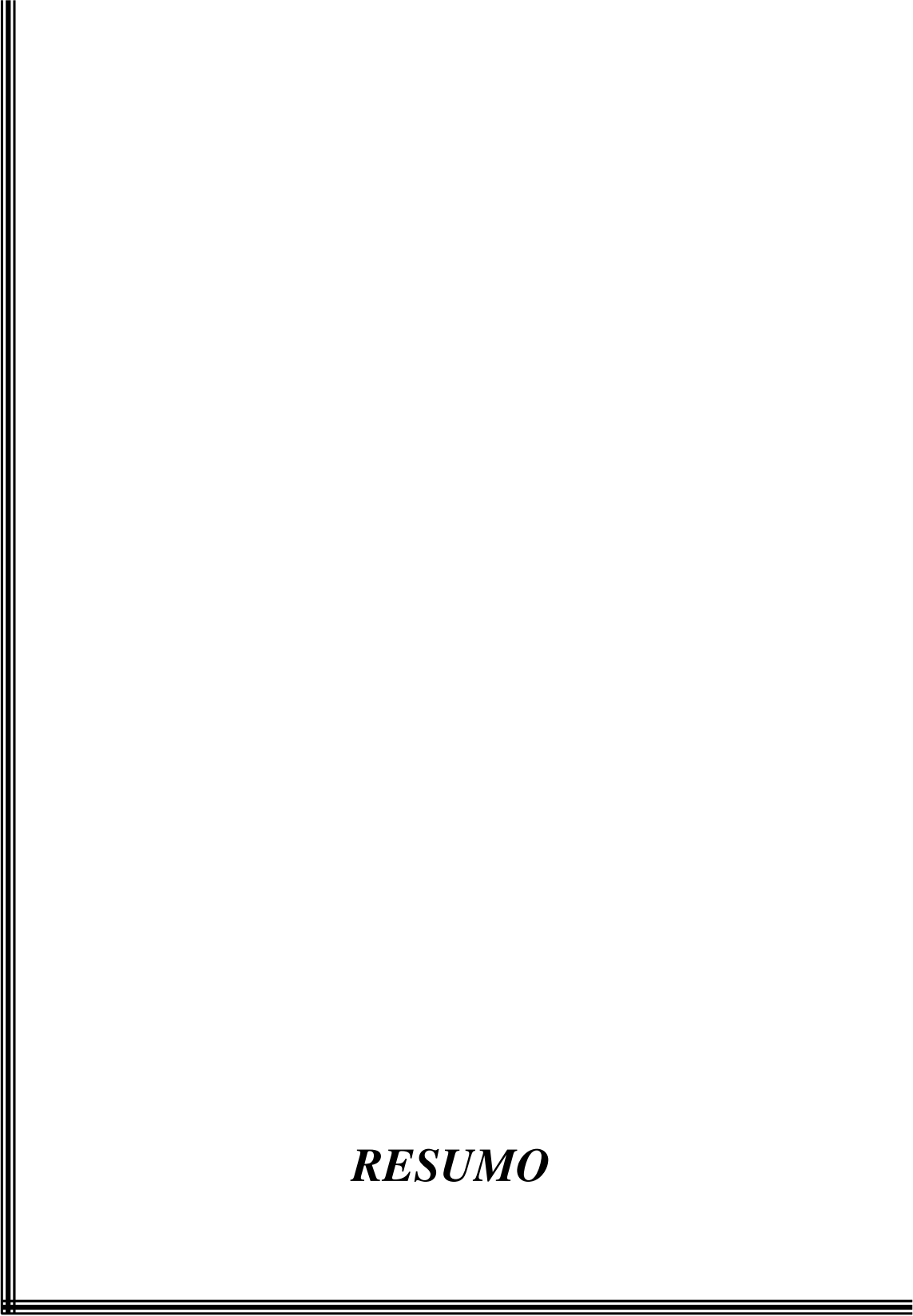
	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xxv</i>
ABSTRACT.....	<i>xxix</i>
1- INTRODUÇÃO.....	33
1.1- Ação das citocinas sobre a imunidade antitumoral.....	35
1.2- Citocinas e tumor de Walker 256.....	39
1.3- Apoptose.....	40
2- OBJETIVOS.....	47
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1- Animais de experimentação.....	53
3.2- Protocolo de indução tumoral e definição dos grupos experimentais....	53
3.3- Obtenção de células tumorais.....	53
3.4- Inoculação.....	54
3.5- Avaliação clínica.....	54
3.6- Parâmetros avaliados durante o crescimento dos tumores.....	54
3.7- Determinação da fragilidade osmótica.....	54
3.8- Sacrifício dos animais.....	55
3.9- Obtenção de células mononucleares de baço.....	55
3.10- Preparo de tecido tumoral para extração de RNA.....	56
3.11- Reação de Feulgen para detecção de apoptose.....	56
3.12- Técnica de TUNEL para detecção de apoptose.....	57
3.13- Extração de RNA total (TRNA).....	58
3.14- Análise do RNA total extraído.....	59
3.15- Síntese reversa do RNA total extraído (cDNA).....	59
3.16- Amplificação de DNA por reação de polimerase em cadeia (RT-PCR).....	59

3.17- Análise dos produtos da reação em cadeia de polimerase (PCR) por em gel agarose.....	60
3.18- Análise semi quantitativa da expressão gênica de citocinas.....	60
3.19- Análise estatística.....	61
4- RESULTADOS.....	63
4.1- Aspectos fisiopatológicos.....	65
4.1.1- Crescimento tumoral no hospedeiro.....	65
4.1.1.1- Grupo A.....	65
4.1.1.2- Grupo AR.....	65
4.1.2- Peso dos animais.....	66
4.1.3- Peso dos baços.....	67
4.1.4- Valores de hemoglobina (g/dL).....	69
4.1.5- Fragilidade osmótica.....	70
4.2- Avaliação histológica.....	73
4.2.1- Grupo A.....	73
4.2.2- Grupo AR.....	73
4.3- RT PCR semiquantitativo.....	73
4.3.1- Expressão gênica de citocinas em células tumorais e esplênicas.....	73
4.3.2- Expressão de RNA m de componentes apoptóticos em células tumorais e células esplênicas.....	79
5- DISCUSSÃO.....	85
6- CONCLUSÃO.....	95
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
8- ANEXO.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

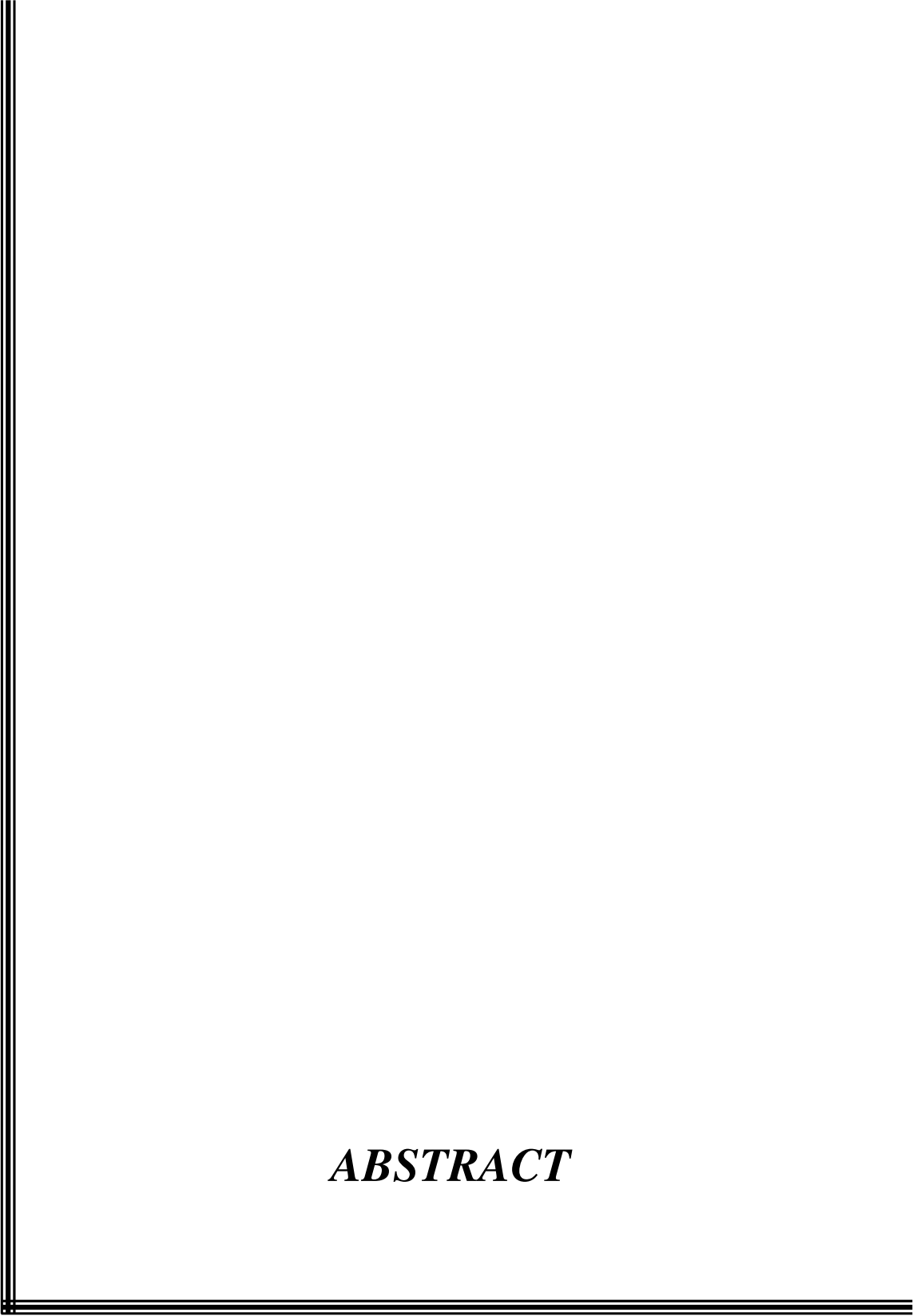
A	Walker 256 linhagem agressiva
APC	Célula apresentadora de antígeno
Ar	Walker 256 linhagem regressiva
CD	Células Dendríticas
cDNA	DNA complementar
CTL	Linfócito T citotóxico
dpi	Dias pós-inoculação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAS-L	Fas-ligante
GM-CSF	Fator estimulador de colônia macrófago-granulócito
HE	Hematoxilina e eosina
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
Linfócitos T $\gamma\delta$	Linfócitos T gama delta
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

RNA_m	RNA mensageiro
NK	Células “natural killer”
PBS	Tampão fosfato salina
PC	Período clínico
PsC	Período sub-clínico
RL	Grupo inoculado com Ringer lactato
RNA	Ácido ribonucleico
RNAT	RNA total
RT-PCR	Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa
SC	Subcutânea
TAA	Antígeno associado a tumor
TCR	Receptor de linfócitos T
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta
Th1	Linfócito auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito auxiliar tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAIL	Ligante indutor de apoptose associado ao TNF/TNF-related apoptosis-inducing ligand)
TUNEL	“Terminal Desoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick-End Labelling”
W256	Tumor de Walker 256



RESUMO

Duas variantes do Walker 256 foram descritas como Walker 256 *A* e *AR*. A variante *A* é mais agressiva e pode induzir os efeitos sistêmicos como anorexia, retenção de sódio, líquido de perda de peso e morte. Os mecanismos envolvidos na regressão e progressão tumoral são desconhecidos. No presente trabalho, células esplênicas e tumorais de animais inoculados com variantes *A* e *Ar* foram isoladas para avaliar a expressão gênica de TGF- β , IL-12, TNF- α e IFN- γ e componentes de apoptose relacionando com anemia, perda de peso, peso do baço, peso do tumor e fragilidade osmótica comparando controles inoculados com Ringer Lactato. Os resultados mostraram que o grupo inoculado com a variante *A* comparado com a variante *Ar*, apresenta altos níveis de expressão de TGF- β em ambas as células esplênicas e tumorais, ausência de expressão de IFN- γ e aumento progressivo dos níveis de IL-12 sem infiltrado inflamatório. Esses resultados sugerem que a agressividade da variante *A* está relacionada à modulação de citocinas, facilitando o crescimento e escape tumoral. A IL-12 pode ser constitutiva nas linhagens *A* e *Ar*. A expressão gênica de Bcl-2 foi progressiva e não houve expressão de Fas nas células tumorais do grupo *A*. Estes resultados demonstram que na linhagem *A* a inumogenicidade ocorre por outros mecanismos. A expressão de citocinas e componentes de apoptose pode explicar as diferenças das linhagens *A* e *Ar*.



ABSTRACT

Two variants of this Walker 256 tumor have been previously reported as Walker 256 A and variant *Ar*. The variant A is more aggressive and can induce systemic effects as anorexia, sodium and water retention, followed by weight loss and death. The mechanisms involved in enhancing tumor regression and progression in this model is still incompletely understood. In the present study, spleen cells and tumor cells from animals inoculated with variants A and AR, were isolated to investigate the TGF- β , IL-12, IFN- γ , TNF- α gene expression, components of apoptosis and relationship with anemia, weight of animals, weight of spleen, height of tumor and osmotic fragility compared with controls inoculated with Ringer Lactate. Results demonstrate that the group inoculated with variant A compared with variant *Ar*, shows high levels of TGF- β gene expression in both tumor tissue and spleen cells, no expression of IFN- γ and a progressive and higher levels of IL-12 in tumor tissue without inflammatory infiltrate. These results suggest that the aggressiveness of variant A is related to cytokine modulation, facilitating the growth and escape of tumor cells. Furthermore, IL-12 seems to be constitutively expressed in both tumor lineage A and AR. The mRNA expression of Bcl-2 was progressive and there is no expression of Fas on tumoral cells of group A. These results demonstrate that on the lineage A the immunogenicity occurs by other mechanisms. The expression of cytokines and components of apoptosis can explain the differences of lineages A and AR.

1- INTRODUÇÃO

Em 1928, o pesquisador George Walker da Universidade John Hopkins observou o aparecimento de tumor na região da glândula mamária de rata albina prenhe. Designado de Tumor de Walker 256 (W256). Tratava-se de neoplasia de crescimento espontâneo que regrediu totalmente durante o período de lactação. Contudo, após o desmame da prole o tumor voltou a crescer rapidamente. Naquela ocasião, este tumor foi considerado adenocarcinoma e os testes de transplantes evidenciou a facilidade do crescimento em ratos receptores (EARLE, 1935).

Além do implante de fragmentos de tecido tumoral, transplantes foram realizados através da inoculação de células tumorais obtidas do próprio tumor sólido, da forma ascítica crescendo na cavidade peritoneal de ratos, ou mesmo de células tumorais mantidas em cultura (AGOSTINO & CLIFTON, 1968 e IWANA-MATTOS, 1973).

As características de transplante deste tumor, bem como as técnicas de cultura de tecidos, permitiram sua manutenção até a atualidade, sendo conhecidas variantes morfológicas como sarcoma, carcinoma e carcinossarcoma designadas genericamente de Tumor de Walker 256 (W256) (IWAMA-MATTOS, 1973).

Em 1995, Guimarães et al, descreveram duas linhagens tumorais do W256: *A (agressiva)* e *Ar (regressiva)*. A linhagem variante regressiva (*Ar*) do W256 foi obtida a partir da linhagem agressiva (*A*) deste tumor. (Durante os sucessivos repiques de células tumorais na cavidade intraperitoneal do rato, visando a manutenção da linhagem tumoral *A* surgiu a linhagem *Ar*. . A linhagem *Ar* mostrou-se menos agressiva, quanto à capacidade de induzir os efeitos sistêmicos tumorais (perda de peso), apresentando elevado índice de regressões espontâneas, quando utilizada uma única inoculação subcutânea de 5×10^6 células por rato (GUIMARÃES et al., 1995).

1.1- Ação das citocinas sobre a imunidade antitumoral

Avanços na imunologia celular e molecular têm contribuído para o entendimento das interações tumor-hospedeiro, possibilitando o desenvolvimento de intervenções terapêuticas visando a manipulação do sistema imune para erradicação do tumor, ganhando cada vez mais importância como forma de tratamento.

O processo de instalação neoplásico ocorre como resultado de três processos: eliminação, equilíbrio e escape. Durante o processo de eliminação, as células tumorais sobrevivem a resposta imune. Posteriormente, durante o período de equilíbrio entre os dois tipos celulares (normais e tumorais), ocorre a seleção das variantes tumorais. Finalmente, ocorre a instalação definitiva do tumor em virtude do escape destas células à resposta imunológica (DUNN et al., 2002).

Durante a fase de eliminação, quando os tumores sólidos apresentam determinado tamanho, tem início a invasão ao tecido do hospedeiro, e requer o aumento no suprimento sanguíneo propiciado pela produção de proteínas (DUNN et al., 2002).

O crescimento invasivo causa lesões mínimas no tecido vizinho, induzindo sinais inflamatórios que recrutam células do sistema imune inato (NK, células T $\gamma\delta$, macrófagos e células dendríticas) ao local. (MATZINGER et al, 1994; GIRARD, 2001; SMITH et al, 2001).

As células transformadas são reconhecidas por linfócitos infiltrados como NK, $\gamma\delta$, que passam a produzir IFN- γ , o qual numa segunda fase pode induzir a morte tumoral por mecanismos apoptóticos e antiproliferativos (BROMBERG et al, 1996; KUMAR et al, 1997; YOKOYAMA, 2000; CERVENKA, 2000; DIENFEBACK, 2001).

Os debris de células tumorais formados como consequência direta ou indireta da produção de IFN- γ no tumor são posteriormente fagocitados pelas células dendríticas e drenadas para os linfonodos. As quimiocinas produzidas durante o processo inflamatório recrutam mais NK e macrófagos para o local (DIENFEBACK, 2001).

Na terceira fase, as NK e macrófagos infiltram o tumor, ativando-se mutuamente pela produção recíproca de IFN- γ e IL-12. A eliminação tumoral acontece por mecanismos que envolvem fatores vinculados a apoptose como fator de necrose tumoral (TNF), a perforina e intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio (TRINCHIERI et al, 1992; SMYTH et al, 2000, , IKEDA et al, 2002).

No linfonodo de drenagem, as células NK induzem linfócitos Th CD4⁺ a expressar IFN- γ , propiciando o desenvolvimento de linfócitos T CD8⁺ (PARDOLL, 2002, GEROSA, 2002, FERLAZZO et al, 2002).

Na quarta fase, as células T CD4⁺ e CD8⁺ migram ao sítio do tumor, onde destroem o restante das células tumorais cuja imunogenicidade foi aumentada pela exposição local ao IFN- γ (SHANKARAN, 2001).

No processo de equilíbrio, o sistema imune do hospedeiro e qualquer variante da célula tumoral que sobreviveu ao processo de eliminação, entram em equilíbrio dinâmico. Desta forma, os linfócitos e a liberação de IFN- γ suplementada por outras células, promovem mecanismos de seleção negativa nas células tumorais, suficiente para conter seu crescimento momentâneo. Contudo, ainda insuficiente para eliminar totalmente as células mutagênicas e geneticamente instáveis do ambiente tumoral contendo. Além disso, no processo de escape, as variantes do tumor que sobreviveram ao processo de destruição, tornam-se insensíveis à detecção imunológica e/ou eliminação através de mudanças genéticas e epigenéticas, e iniciam a expansão de maneira incontrolada (DUNN et al., 2002; DUNN ET AL., 2004).

A grande maioria dos tumores “escapa” do reconhecimento imune através de vários mecanismos, entre os quais podemos citar a perda de moléculas de Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP) na superfície da célula, mutação ou perda de antígenos tumorais, alterações de receptores que sinalizam a morte celular e produção de citocinas e outras substâncias imunossupressoras (SANTINI & BELARDELLI, 2003; AHMAD, 2004; WHITESIDE & ODOUX, 2004).

As citocinas são os principais mediadores da defesa do hospedeiro regulando a comunicação entre células apresentadoras de antígenos (APCs), linfócitos e outras células de defesa no curso da resposta imune. O repertório de citocinas apresentado no local do tumor determina o tipo de resposta de defesa contra o tumor (CHOUAIB, et al, 1997). Desta forma, certas citocinas secretadas podem impedir a resposta antitumoral do hospedeiro, enquanto outras promovem o desenvolvimento da imunidade mediada por células, proporcionando, indução ou amplificação da resposta (CHOUAIB et al, 1997).

Fator de necrose tumoral alfa

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) atua na diferenciação e maturação de células dendríticas (CDs) (JONULEIT et al, 1996). Portanto, a produção local pode aumentar a ativação e migração de CDs e promover a geração de resposta imune adaptativa antitumoral (BELARDELLI et al, 2002).

Observou-se que os efeitos antitumorais do TNF- α e IL-1 são semelhantes aos observados nos modelos experimentais em ratos e, por essa razão foram considerados agentes promissores para terapia anticancer. Estudos subseqüentes revelaram que os efeitos tóxicos estão associados às altas doses dessas citocinas, o que inviabilizou o uso clínico (JONULEIT et al, 1996).

Interferon gama

O Interferon gama (IFN- γ) tem efeito sobre as células da imunidade inata, como os macrófagos, regulando o estado de ativação destas células (BELARDELLI et al, 1995). Estudos mostram a produção de IFN- γ por macrófagos (GESSANI et al, 1998) e células dendríticas (DCs) (FRUNCH et al, 2001), sugerindo que esta citocina constitui-se num ponto de ligação entre a resposta inata e adaptativa (HATA ET AL., 1998; DUNKER E KRUGESTEEN, 2000; MUMMERY, 2001).

Fator Transformador de Crescimento Beta

O Fator transformador de Crescimento beta (TGF- β) atua como determinante de sobrevivência no ambiente da célula tumoral. Os efeitos parácrinos e autócrinos nas células tumorais e microambiente, influenciam vias de sinalização celular importantes na promoção e supressão da progressão e invasão tumoral (MASSAGE, 1998; DERYNCK, 2001). Ratos transgênicos com expressão aumentada do TGF- β ativo são resistentes ao câncer mamário induzidos por oncogenes ou carcinógenos (PIERCE et al, 1993; JHAPPAN et al, 1993; PIERCE et al 1995).

Esta citocina age de diferentes maneiras, a maioria imprecisa, previne a fosforilação que inativa proteína de retinoblastoma (pRb). A pRb no estado hipofosforilado, bloqueia a proliferação pelo seqüestro e alteração das funções dos fatores de transcrição E2F que controlam a expressão de bancos de genes essenciais para progressão da fase G1 para fase S do ciclo celular (WEINBERG, 1995). A ruptura da via pRb libera E2Fs e permite a proliferação celular tornando as células insensíveis a fatores inibitórios de crescimento que manejam a via através do bloqueio na fase G1 do ciclo celular (HANAHAHAN et al; 2000).

Alguns tumores perdem a responsividade ao TGF- β pela diminuição seus receptores, enquanto outros expressam mutantes, ou receptores não funcionantes (FYNAN e REISS; 1993; MARCOWITZ et al, 1995). Em estudo com carcinogênese química em pele de rato, a expressão de TGF- β 1 em queranócitos suprimiu a formação de tumores de pele benignos. Entretanto, após o desenvolvimento do tumor, ocorreu a progressão em um fenótipo extremamente invasivo em decorrência da expressão desta (CUI et al, 1996). A existência de receptores de TGF- β tipo II (T β RII) nessas células retarda a formação do tumor primário e de metástases, prevenindo a transição epitelial para mesenquimal. Tal situação, sugere que muitos tumores epiteliais sobrevivem a inibição do crescimento pelo TGF- β e, sua secreção pelo câncer e/ou células do estroma, podem contribuir para a progressão tumoral final (OFT et al, 1998).

1.2- Citocinas e Tumor Walker 256

Há poucos trabalhos referentes à expressão de citocinas no modelo de câncer induzido pelo tumor Walker 256. O TNF- α quando administrado em ratos inoculados com o W256 estimula a degradação protéica, sem que haja alteração na síntese protéica do tumor, provocando desequilíbrio e, desta forma, explicando a diminuição do crescimento e da ploidia da célula tumoral (YE et al, 1994).

O crescimento do tumor está associado à anorexia, febre, perda de peso e aumento da secreção de IL-1 e TNF- α por leucócitos. (McCARTY et al, 1993).

Ratos com hipercalciúria inoculados com tumor W256 sintetizam proteínas relacionadas com hormônio paratireóide e, pelo menos uma delas tem atividade de TGF- β . A administração de TGF- β nestes ratos aumentou a sua própria expressão de RNAm. A avaliação desta citocina em diferentes estágios de crescimento tumoral em ratos com tumor W256 não demonstrou a presença de sua forma bioativa. Portanto, as células tumorais parecem secretar TGF- β de forma inativa (BENITEZ-VERGUIZAS et al, 1999).

1.3- Apoptose

Apoptose, ou morte celular programada, é um mecanismo pelo qual as células controlam a proliferação celular em resposta ao dano do DNA (LOWE et al, 2000). Foi inicialmente descrita pelas suas características morfológicas incluindo alteração celular, ruptura de membrana, condensação de cromatina e fragmentação nuclear (KERR et al, 1972; WYLLIE et al, 1980; KERR et al, 1994). É um programa determinado geneticamente com implicações na homeostasia tissular e desenvolvimento biológico celular. Isto implica que o número celular pode ser regulado por fatores vinculados a sobrevivência e proliferação. Portanto, as alterações genéticas podem levar a alterações na morte celular programada, contribuindo para o estabelecimento de doenças neurodegenerativas e neoplasias (KAUFMANN et al, 2001).

A noção que a apoptose pode influenciar fenótipo maligno tumoral vem desde a década de 70. Os estudos da cinética de crescimento tumoral mostram que a perda celular pode ser maciça ou ter crescimento menor que 5% do predito (KERR et al, 1972; WYLLIE et al, 1980). Em princípio as mudanças neste “fator de perda celular”, podem ter impacto no crescimento ou regressão tumoral. A maioria das células morre por necrose (KERR et al, 1994) e o restante por apoptose (KERR et al, 1972). Estudos revelam a alta frequência de apoptose em tumores com regressão espontânea e com agentes citotóxicos (KERR et al, 1994). Essas observações sugerem que apoptose contribui para a perda celular em tumores malignos e pode promover a regressão tumoral (KERR et al, 1972; WYLLIE et al, 1980).

Alguns tipos de câncer, como leucemia linfocítica crônica de célula B, linfoma folicular (TSUJIMOTO et al, 1985), leucemia/linfoma células B infectados vírus 1 (HEGARTNER, 2000), são caracterizados por defeitos na indução da apoptose levando a imortalidade dos clones destas células. Outras neoplasias têm defeitos nas vias regulatórias como p53, fator nuclear kappa B (NFκB), ou quinase 3 fosfatidil inositol (PI3K)/Akt levando a defeitos na apoptose (KAUFMANN et al, 2001).

Apoptose e Câncer

A caracterização de oncogene Bcl-2 estabeleceu a importância da apoptose no desenvolvimento tumoral. O Bcl-2 foi primeiramente identificado como uma quebra cromossômica do t(14; 18) na linhagem da leucemia humana e posteriormente mostrou um evento comum no linfoma folicular (TSUJIMOTO et al, 1984; TSUJIMOTO et al, 1985).

Os oncogenes foram classificados como “transformadores” ou “imortalizadores” (LOWE et al; 2000). Entretanto, o Bcl-2 não age como um oncogene típico: causa a ruptura do controle normal da proliferação, atua promovendo a sobrevivência celular pelo bloqueio da morte celular programada (VAUX et al, 1998; MACDONNEL et al, 1989, HOCKENBERRY et al, 1989). Nos ratos transgênicos, a expressão aumentada promove linfoproliferação e indução de c-myc (MACDONNEL et al, 1989, HOCKENBERRY et al, 1989; STRASSER et al, 1990).

Nesta ocasião, ao menos 15 membros da família Bcl-2 foram identificadas em células mamárias, incluindo proteínas que promovem apoptose e aquelas que previnem apoptose (GROSS et al, 1999).

A habilidade de escapar a apoptose é a principal característica das células tumorais, correlacionando-se com agressividade e resistência às terapias anticâncer (SCHIMITT et al, 2003; DENICOURT et al, 2004).

Assim, a falta de expressão de Fas-L (Fas ligante) e TRAIL (ligante indutor de apoptose associado ao TNF) que são expressos na superfície de várias células tumorais, tornam as células resistentes a apoptose. Além disso, algumas células ao entrarem em

contato com outras células que expressam Fas, liberam sinais de morte celular. Esta situação pode permitir que as células tumorais eliminem linfócitos, suprimindo desta forma, a resposta imune antitumoral, um fenômeno denominado “contra-ataque” (KRAMMER et al., 2000; KREPELA, 2001).

Vias da apoptose

Existem dois mecanismos principais de morte celular: necrose-apoptose. O entendimento das vias de sinalização detalhadas da apoptose é incompleto, este processo é controlado por um complexo de proteínas, que são ativadas por vários fatores e são arranjados em moléculas sequenciais de sinalização (GHOBRIAL et al, 2005).

O maquinário da apoptose pode ser dividida em duas classes de componentes: - sensores e efetores. Os sensores são responsáveis pela monitorização do meio intra e extracelular para condições de normalidade e anormalidade que influenciam se a célula irá morrer ou viver. Esses sinais regulam a segunda classe de componentes, cuja função são efetores da morte apoptótica. Os sentinelas incluem receptores de superfície celular que ligam-se a fatores de sobrevivência ou morte. Os exemplos de pares receptor/ligante incluem sinais de sobrevivência pelo IGF-1/IGF-2 através do seu receptor, IL-3R (LOTEM et al, 1996; BUTT et al, 1999; HANAHAN et al, 2000).

Os sensores intracelulares monitorizam o “bem estar” celular e ativam as vias de morte em resposta a normalidades, incluindo dano DNA, alteração na sinalização provocado pela ativação de oncogene, insuficiência no fator de sobrevivência, ou hipóxia (EVAN et al, 1998).

Entretanto, a vida da maioria das células é mantida em parte pelos sinais de sobrevivência baseados na aderência célula-matrix; célula-célula cuja quebra leva a apoptose (ISHIZAKI et al, 1995; GIACOTTI et al, 1999). Os sinais regulatórios refletem as necessidades tissulares de manter as células na arquitetura apropriada (HANAHAN et al, 2000).

A apoptose ocorre através de duas vias principais. A primeira, referida como via extrínseca ou citoplasmática, é através do receptor morte Fas, membro da superfamília receptor TNF (ZAPATA JM et al, 2001). A segunda via é a via mitocôndrial que a estimulação leva a liberação de citocromo c da mitocôndria e ativação do sinal de morte (HOCKENBERRY et al, 1990).

Ambas vias convergem à via final comum envolvendo a ativação da cascata de proteases chamadas caspases que clivam as moléculas reguladoras e estruturais, culminando na morte celular. As vias são ligadas; portanto a distinção entre elas é simplista (SCAFFIDI et al, 1998).

A expressão aumentada de Bcl-2 na via intrínseca pode levar a inibição da via extrínseca mediando apoptose. Ao contrário, TNF- α pode aumentar a expressão de NF- κ B e estimula membros antiapoptóticos das família de proteínas Bcl-2 (GHOBRIAL et al, 2005).

A via extrínseca

Esta via compreende várias proteínas incluindo receptores de morte, Fas ligante associado à membrana, complexos de Fas, o domínio de morte ligado ao Fas, e caspases 8 e 10, que ativam o restante das caspases levando à apoptose.

A ativação da via extrínseca inicia-se com a ligação de receptores de superfície celular chamados receptores de morte (DRs). O Fas é membro da superfamília receptor do TNF e também receptor ligante indutor de apoptose 1 (TRAIL R1), DR5 (TRAIL R2), e DR6 (ZAPATA et al, 2001).

A sinalização do Fas é importante na sobrevivência imunológica de células transformadas ou infectadas com vírus e na remoção de linfócitos auto reativos. Portanto, defeitos nesta via pode implicar em manifestações de doenças autoimunes e neoplasias (GHOBRIAL et al, 2005).

O sistema Fas-Fas ligante (Fas L) é conhecido pelas funções relacionadas à morte, mas também está envolvido em vias de sinalização inflamatória e proliferativa que não são bem definidas (KRAMMER, 2000).

Quando há estímulo de morte, o Fas-L ligado à membrana interage com complexo Fas inativo e forma um complexo de sinalização induzindo a morte. Este complexo tem a proteína adaptadora e as caspases 8 e 10 e leva a ativação de caspase 8, que ativa o restante da cascata de caspases. Em algumas células, ativação de caspase 8 pode ser a única via necessária para executar a morte, enquanto que em outros tipos celulares, a caspase 8 interage com a via intrínseca apoptótica pela clivagem do Bid (um membro pró apoptótico da família de Bcl-2), levando a liberação do citocromo c (WAJANT H.; 2002).

Muitas proteínas e vias regulam a ativação da via extrínseca. A desregulação desses moduladores pode levar a transformação maligna, por exemplo: mutações ou deleções do gene Fas foram encontradas em algumas neoplasias hematológicas (LANDOWSKI, 2001). Os reguladores desta via incluem fatores de transcrição como NF- κ B e proteína 1 de ativação que regulam o gene de Fas L (WAJANT H; 2002).. Outros inibidores da via incluem FAP-1, proteína domínio de morte associado a Fas semelhante a enzima conversora IL-1 β semelhante a proteína inibitória, e receptores de decodificação solúveis como DcR3, TRAIL R-3/DcR1, e TRAIL R-4/DcR2. Estes receptores de decodificação antagonizam a estimulação de Fas pelo Fas-L através da competição com o ligante (PAN et al, 1997; IRIE et al; 2001; KRUEGER et al, 2001).

A via intrínseca

Um dos principais reguladores desta via é as proteínas da família Bcl-2. O gene bcl-2 foi originalmente identificado no ponto de translocação cromossômica 18 para 14 no linfoma não Hodgkin folicular ((TSUJIMOTO et al, 1984; TSUJIMOTO et al, 1985). A família Bcl-2 são os principais reguladores da apoptose e a expressão está aumentada em muitas neoplasias sem a translocação cromossômica t(14;18). O aumento da expressão

causa resistência a drogas quimioterápicas radioterapia., enquanto que a diminuição da expressão pode promover respostas de apoptose a drogas anticancerígenas. Além disto, o aumento da expressão pode resultar em acúmulo de células na fase G₀ no ciclo celular e contribui para quimio-resistência (REED, 1997).

A família Bcl-2 inclui membros proapoptóticos como Bax, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, e Hrk, e membros anti apoptóticos como Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1, e Mcl-1 (REED, 1994). Os membros anti apoptóticos agem como repressores da apoptose pelo bloqueio do citocromo c, enquanto que os pro apoptóticos agem como promotores. Estes efeitos são dependentes do balanço Bcl-2 e Bax que a quantidade de Bcl-2 sozinho (REED, 1994).

Após o sinal de morte, as proteínas pro apoptóticas sofrem modificações translacionais que incluem a desfosforilação e clivagem resultando na sua ativação e translocação na mitocôndria levando a apoptose (SCORRANO et al, 2003). Todas moléculas necessitam de multidomínios BH3 (Bax, Bak) para exercerem suas atividades proapoptóticas (SCORRANO et al, 2003; KORSMEYER, 1995). A resposta ao estímulo, a membrana mitocôndrial torna-se permeável, levando à liberação de citocromo c e o segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria (second mitochondria-derived activator of caspase) (também conhecido como IAP-ligante proteína com baixo pI). Após a liberação de citocromo-c no citossol, liga-se com Apaf-1; levando ativação da proenzima caspase 9. Ativa caspase 9 e depois caspase 3, que subsequêntemente ativa o resto da cascata e leva à apoptose. As caspases ativadas levam a clivagem da lâmina nuclear e quebra do núcleo através da caspase 3 (REED, 1997).

A via final caspases

A via final que leva a execução do sinal de morte é a ativação de uma série de proteases ditas caspases. Nem todas as caspases estão envolvidas em apoptose. As bem definidas são caspases -3, -6, -7, -8 e 9 (THORNBERRY et al, 1998; Mancini et al; 1998). As vias intrínseca e extrínseca convergem para caspase 3 que cliva o inibidor de

deoxyribonuclease ativado por caspase, e a deoxyribonuclease torna-se ativa levando a apoptose nuclear. As caspases do início da via convergem para caspases-3 são as caspases -9 e -8 nas vias intrínseca e extrínseca, respectivamente. As caspases induzem a clivagem de proteino quinases, proteínas do citoesqueleto, proteínas de reparação do DNA, inibidores de subunidades de endonucleases (família CIDE), e finalmente destruição do “quartel general” das funções celulares. (THORNBERRY et al, 1998; MANCINI et al; 1998).

2- OBJETIVOS

Objetivos específicos

- 1-** Correlacionar sinais sistêmicos clínicos induzidos pelo tumor (volume do tumor, anemia e tamanho de baço) com a expressão de citocinas e componentes apoptóticos.
- 2-** Verificar a cinética da expressão gênica de citocinas (IL-12; TGF- β ; TNF- α e IFN- γ), em células mononucleares do baço e células tumorais em ratos inoculados com as linhagens A e Ar do tumor de Walker 256 nos dias 4, 7 e 11 após inoculação.
- 3-** Verificar a cinética da expressão gênica de componentes da apoptose: Fas, Fas-L e Bcl-2 em células mononucleares do baço e células tumorais em ratos inoculados com as linhagens A e Ar do tumor de Walker 256 nos dias 4, 7 e 11 após inoculação.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais de experimentação

Para a realização do experimento e manutenção das variantes *A* e *Ar* do Tumor de Walker 256 eram utilizados ratos machos albinos (*Rattus navergeticus albinus*, Wistar) fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Pesquisas Bioquímicas CAISM/UNICAMP, com idade entre de 8 a 12 semanas. Os animais eram mantidos em grupos de quatro, em gaiolas plásticas, sob fotoperíodo de 12 horas, exaustão forçada de ar, temperatura 21°C +/- 2°C, recebendo ração comercial (Labina/Purina, Campinas, GP, Brasil) e água “ad libidum”. As gaiolas eram trocadas três vezes por semana com maravalha de pinus.

3.2- Protocolo de indução tumoral e definição dos grupos experimentais

Eram usados, 4 grupos de animais organizados segundo a tabela 1.

As inoculações sc eram realizadas na região dorsal tóraco-lombar, com distância aproximada de 1,0 cm, com 5×10^6 células de Walker das variantes A (A) ou AR (Ar).

Metade do número de ratos de cada experimento era usado expressão de RNAm para citocinas e componentes de apoptose. A fragilidade osmótica (FO) era determinada nos dias 0, 4, 7 e 11 após início do experimento.

3.3- Obtenção de células tumorais

As suspensões de células tumorais de Walker 256 A ou Ar eram obtidas, retirando-se líquido ascítico da cavidade peritoneal de ratos hospedeiros para a manutenção dessas células tumorais. O líquido ascítico era precipitado e diluído em aproximadamente três vezes o seu volume com solução Ringer-lactato, evitando a formação de coágulos e mantendo a suspensão mais homogênea. O número e a viabilidade das células tumorais eram determinadas através da contagem em hemocítmetro empregando-se a solução 0,01% de azul tripan e a concentração de trabalho definitiva, igual a 5×10^6 células/mL, era preparada diluindo-se a suspensão de células tumorais em Ringer lactato.

3.4- Inoculação

Os animais com 8 a 12 semanas de vida, eram anestesiados com pentobarbital sódico 3% (15 a 30 mg/kg peso corpóreo) e puncionados no plexo orbital para obtenção de sangue periférico, o qual era transferido para um tubo contendo heparina (5000 UI, 10 µl) e determinação da fragilidade osmótica. Após este procedimento, os ratos eram inoculados com líquido ascítico 0,25 mL contendo 5×10^6 células/sítio de Tumor Walker variante A e Ar, e um grupo contendo somente veículo (RL).

3.5- Avaliação clínica

Os animais eram avaliados diariamente quanto ao de peso corpóreo, consumo de alimento e detecção de efeitos sistêmicos. Após os sacrifícios realizados nos tempos 4, 7 e 11 após inoculação, realizava-se autópsia para avaliação de metástases, invasão tecidual e sangramento.

3.6- Parâmetros avaliados durante o crescimento dos tumores

Os ratos eram avaliados diariamente quanto ao peso corpóreo, dimensões e grau de aderência dos tumores à musculatura dorsal dos hospedeiros. O diâmetro percutâneo dos tumores, obtido diariamente pelo cálculo da média entre a maior dimensão do tumor e sua medida transversal, possibilitou a estimativa do peso tumoral dada por uma curva empírica que relaciona dimensão do tumor(mm) ao seu peso(g). Possíveis correções nas curvas de crescimento eram realizadas após autópsias, quando os tumores eram dissecados e pesados. Tais procedimentos permitiram diferenciar tumores instalados, em franco crescimento, daqueles que após alguns dias de crescimento, passaram a regredir.

3.7- Determinação da fragilidade osmótica

25,0µl de sangue total era adicionado a 2,5 ml de salina tamponada em diferentes concentrações (3,5 a 5,5 e 9,0g/L), os tubos de ensaio eram gentilmente homogenizados e mantidos em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos.

Em seguida eram centrifugados a 978rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante obtido era submetido a espectrofotometria no comprimento de onda 540 nm (espectrofotômetro Beckman DU-70) em cubetas de poliestireno(3,0 ml) de 1,0 cm de caminho óptico (DACIE et al., 1984). O cálculo da fragilidade osmótica era feito segundo a fórmula:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{leitura da amostra} - \text{leitura do tubo com } 9,0\text{gNaCl/l}}{\text{leitura do tubo em água (100 \% de hemólise)}} \times 100$$

Sempre que necessário usava-se a fragilidade corpuscular média (FCM), definida como sendo a concentração de NaCl na qual houve 50% de hemólise e calculada através da interpolação dos pontos imediatamente superiores a 50% de hemólise.

3.8- Sacrifício dos animais

Os animais, ao completarem os dias estipulados (4, 7 e 11 após inoculação), eram anestesiados com Pentobarbital sódico 3% (15 a 30 mg/kg peso corpóreo) e o sangue periférico coletado através da punção cardíaca. A seguir o sangue era transferido para tubo contendo heparina. Após este procedimento, realizava-se a remoção do tumor e baço, o qual era armazenado em 500 µl de solução de lise conservadora de guanidina sarcosyl 0,5%, para extração de RNA.

3.9- Obtenção de células mononucleares de baço

Após terem sido retirados dos animais, os baços eram delicadamente lavados com solução balanceada de Hank. Posteriormente, os baços eram macerados em peneira de aço inoxidável, estéril com aproximadamente 2,0 ml de solução de Hank. A suspensão de células esplênicas era, em seguida, centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Ao precipitado adicionava-se 2,0ml de tampão de lise (NH₄NaCl), com posterior homogenização. Após a homogenização os tubos eram mantidos em repouso

em temperatura ambiente por 10 minutos. O volume era completado até 6,0 ml com solução de Hank e novamente homogenizado nas mesmas condições descritas acima. Esta mesma operação era repetida mais duas vezes. Finalmente, as células esplênicas eram colocadas em 400,0 µl de guanidina-sarcosyl 0,5 % e mantidas a -80°C até a extração de RNA total.

3.10- Preparo de tecido tumoral para extração de RNA

O tecido tumoral com aproximadamente 3mm macerados em peneira e transferidos para tubos polipropileno 15ml e submetidos a digestão em solução de proteinase K (500µg/mL – Sigma – San Louis/USA) diluída em tampão tris-HCl/SDS 10%, mantidos à 45°C, por 60 minutos.

Centrifugava-se por 10 minutos a 374xg e desprezando-se o sobrenadante. Posteriormente o tecido era homogenizado em 500 µl de solução de Tris-HCl/SDS 10%. Os tubos eram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até a extração de RNAT.

3.11- Reação de Feulgen para detecção de Apoptose

A reação nuclear de Feulgen para detecção específica de DNA *in situ* desenvolvida por Feulgen e modificada por VIDAL E MELO, 1978. Baseia-se no tratamento químico, ou seja, hidrólise com HCl, a fim de produzir grupos aldeídos livres na estrutura principal do DNA, que ao reagir com reativo de Schiff restabelece o grupo cromofórico. A reação era realizada nos cortes de tumor congelados para detecção de alterações da cromatina.

A reação de Feulgen envolve duas etapas: hidrólise ácida seguida da exposição do material hidrolisado ao reativo de Schiff.

Após fixação das lâminas com solução de Carnoy (Àcido Acético/Etanol 1:3) durante 5 minutos, o material era submetido à hidrólise ácida com ácido clordico 4N à temperatura ambiente por 80 minutos, quando as purinas do DNA eram removidas,

formando-se uma molécula de “DNA apurínico”, expondo as funções aldeído no Carbono 1 da desoxirribose. Em seguida, as lâminas eram tratadas com rativo de Schiff à temperatura ambiente por 40 minutos, quando o grupamento aldeído do DNA apurínico reagia com o leucoderivado do reativo de Schiff com presença de ácido sulfídrico em excesso, fornecido durante as lavagens com água sulfurosa, restabelecendo-se, dessa forma, o grupamento cromofórico. Finalmente, as lâminas eram submetidas a desidratação em série crescente de álcoois, diafanizadas com xilol e montadas em entelecan (Merck, Alemanha) para posterior observação em microscópio de luz (Zeiss, Axioscop).

3.12- Técnica TUNEL para detecção de Apoptose

A técnica TUNEL (Terminal Desoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick-End Labeling) tem sido utilizada na detecção e quantificação de células apoptóticas. Este método baseia-se na ligação específica de desoxiuridina tri-fosfato biotinilada (dUTP) conjugada com fluoresceína ao terminal 3' -OH do DNA (sítios de quebra de DNA), catalisada pela enzima Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), com subsequente síntese de um heterodímero.

A reação de TUNEL era realizada segundo instruções do fabricante (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As lâminas eram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos, em seguida lavadas em solução salina fosfatada tamponada (PBS pH 7,4) por um tempo de 30 minutos, os cortes eram então, incubados durante 2 minutos em solução permeabilizante (0,1% triton-x em 0,1% de citrato de sódio) e mantidos sob gelo.

Após esta etapa, as lâminas eram lavadas novamente em solução salina fosfatada tamponada por 2 minutos e aproximadamente 50µl da reação TUNEL (solução de enzima – TdT; adicionada à solução label – mistura de nucleotídeos em tampão) eram adicionados à cada corte e incubados em câmara úmida a 37°C, por um tempo de 60 minutos, protegidos contra luminosidade.

Decorrido este tempo, as lâminas eram lavadas três vezes, em solução salina fosfatada tamponada e finalmente montadas em glicerol. Os cortes, assim preparados, eram observados e suas imagens captadas por microscópio confocal de varredura a laser (Bio-Rad-MCR 1024-CA-EUA).

3.13- Extração de RNA total (TRNA)

O RNA total era extraído das amostras de células tumorais, células esplênicas, através do método de guanidina tiocianato – fenol clorofórmio (Chomczynski, et al., 1987); com adaptações realizadas no nosso Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental FCM-UNICAMP (Ventura Oliveira, et al 2002; Boechart, Vilella e Zollner).

As células provenientes do tumor sólido e líquido ascítico já preparadas conforme descrito anteriormente e células esplênicas eram homogeneizadas respectivamente em solução de extração de RNA contendo 4M guanidina tiocianato (Gibco BRL, Life Technologies, EUA), 0,1M 2-mercaptoetanol, 25mM citrato de sódio pH7,0 e 0,5% sarcosyl (Sigma, EUA). Para a separação de proteínas dos ácidos nucleicos, adicionava-se volume igual de solução Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico(25:24:1) e, a seguir, a mistura era agitada vigorosamente formando emulsão. A preparação era centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente a 14.404xg, recuperando-se a fase aquosa (superior). Repetia-se a extração com Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico até que não houvesse proteínas na interfase.

O excesso de Fenol era extraído com clorofórmio-álcool Isoamílico(24:1). O RNA na fase aquosa era precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto e acetato de sódio pH 5.2, na concentração final de 0,3M. Esta preparação era mantida a -80°C overnight.

Posteriormente, o RNA era precipitado por centrifugação a 14.404g durante 20 minutos a 4°C. Adicionava-se então 40µl de água ultrapura (Sistema Infinity, Barsusteal, EUA) preparada com dietilpirocarbamato (DEPC, Sigma, EUA) ao precipitado que era armazenado a -80°C.

3.14- Análise do RNA total extraído

A qualidade do RNA total extraído era analisada através da relação entre suas leituras em espectrofotômetro (Spectramax 190, molecular Devices, EUA) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Eram consideradas adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8.

3.15- Síntese reversa do RNA total extraído (cDNA)

A síntese do cDNA era realizada a partir de 5µg de RNA total. Para a realização do PCR de transcrição reversa (RT-PCR), adiciona-se à amostra 0,5 µl de Oligo d(pt) e água ultrafiltrada (Sistem Manopure Infinity, Barsnsteal, EUA) em quantidade suficiente para 28 µl. Os tubos com as respectivas amostras eram acomodados em termocicladora (GeneAmp 9700, Perkin Ellmer, EUA) por 10 minutos a 65°C, resfriando-se para 4°C por 5 minutos.

Para permitir a ligação complementar dos primers ao RNA, adicionava-se 10µl do tampão da transcriptase reversa (fornecido juntamente com a enzima), 5µl of dNTP mix, 1.0 µl de inibidor de RNase 50U/µl, incubava-se as amostras durante 2 minutos a 42°C (gelo). Após adição de 1µl da enzima Super Transcriptase Reversa (500U) (Life Technologies, EUA), a reação processava-se em termocicladora programada nas condições abaixo. O ciclos para síntese do cDNA eram 42°C/50 minutos; 70°C/15 minutos e resfriamento da amostra até 4°C. Após a última etapa as amostras, com volume de 50 µl, eram armazenadas a -20°C como DNA complementar (cDNA).

3.16- Amplificação de cDNA por reação de polimerase em cadeia (RT-PCR)

O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação, 2 µl de amostra de cDNA, 100 ng de cada iniciador, 45 µl de solução de reação (5µl de tampão Taq polimerase, 2µl de dNTP mix 0,5nM, 1,5µl de MgCl₂ 50mM e

36,5 µl de água ultrapura) e 20µl de óleo mineral . Em seguida os tubos contendo as misturas de cDNA eram transferidas para termocicladora (GeneAmp 9700, Perkin Ellmer, EUA), programada para as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 2 minutos, 80°C por 5 minutos para aplicação de 1µl de enzima Taq polimerase, anelamento 58°C por 45 segundos, extensão dos iniciadores a 72°C por 90 segundos, desnaturação da cadeia molde de DNA a 95°C por 45 segundos, por 40 ciclos, extensão final 72°C por 10 minutos, temperatura de espera 4°C. Os produtos de PCR eram armazenados a -20°C. Na tabela 2 constam os iniciadores utilizados no estudo.

3.17- Análise dos produtos da reação em cadeia de polimerase (PCR) por eletroforese em gel agarose

As amplificações dos cDNA através de *iniciadores* específicos para citocinas e produtos relacionados à apoptose eram analisados de eletroforese em gel de agarose 1,5%, preparada em tampão TBE (ácido bórico, Tris EDTA) e contendo 2 µl de brometo de etídio para cada 50 ml,

As amostras a serem analisadas continham 8 µl se cDNA, 1,5 µl de Tampão de amostra (GBX) (PCR) e 5,5 µl de água ultrafiltrada. Utiliza-se para o desenvolvimento da eletroforese (70 volts, 150 mAmp, 45 minutos) o tampão TBE contendo brometo de etídio (2 µl/ 100 ml) .

Os géis eram revelados por excitação do brometo de etídio em luz ultravioleta e registrados de modo digital em sistema de documentação de imagens NucleoVision® (NucleoTech, EUA).

3.18- Análise semi quantitativa da expressão gênica de citocinas

A semi-quantificação do RNA mensageiro era obtida pela relação entre as áreas de pixel determinadas para as bandas correspondentes a citocinas avaliadas no presente trabalho e aquelas observadas para a ciclofilina (gene estrutural). Os valores eram normalizados e transformados em unidades arbitrárias pixel index) através da fórmula:

EXPRESÃO SEMI-QUANTITATIVA (UNIDADES ARBITRÁRIAS)=

área de pixel do RNA mensageiro a ser avaliada

ÁREA DE PIXEL DA CICLOFILINA X 100

3.19- Análise estatística

A comparação dos resultados era analisada usando o teste de Mann-Whitney quando realizada entre dois grupos (tumores dos grupos *A* e *Ar*), ou Teste Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrico) quando comparados os três grupos experimentais (Grupo *A*, Grupo *Ar* e Grupo RL). Valores de $p < 0,05$ eram considerados como indicativo de significância.

4- RESULTADOS

4.1- Aspectos fisiopatológicos

4.1.1- Crescimento Tumoral no Hospedeiro

A partir da inoculação subcutânea, as células tumorais de Walker 256 linhagens *A* e *Ar* cresceram continuamente, o que foi confirmado, após dois ou três dias, pela palpação de pequenos nódulos (menores que 8 mm) nos sítios de inoculação. Os ratos no 11º dpi de ambos os grupos apresentavam massa tumoral com grandes áreas de necrose e rarefação de pêlo.

4.1.1.1- Grupo *A*

O volume do tumor no grupo *A* era $3,28 \pm 0,83$; $6,69 \pm 1,45$ e $6,71 \pm 1,96$ cm³ nos dias 4, 7 e 11 após inoculação, respectivamente. A média de peso era $3,3 \pm 1,0$; $7,9 \pm 0,9$; $9,12 \pm 0,2$ g nos dias 4, 7 e 11 após inoculação, respectivamente (Figura 1).

4.1.1.2- Grupo *Ar*

O volume do tumor no grupo *AR* era $2,89 \pm 0,78$; $7,62 \pm 0,6$ e $9,32 \pm 0,31$ cm³ nos dias 4, 7 e 11 após inoculação, respectivamente. A média de peso era $3,6 \pm 1,0$; $7,6 \pm 0,9$; $7,0 \pm 3,6$ g nos dias 4, 7 e 11 após inoculação, respectivamente (Figura 1).

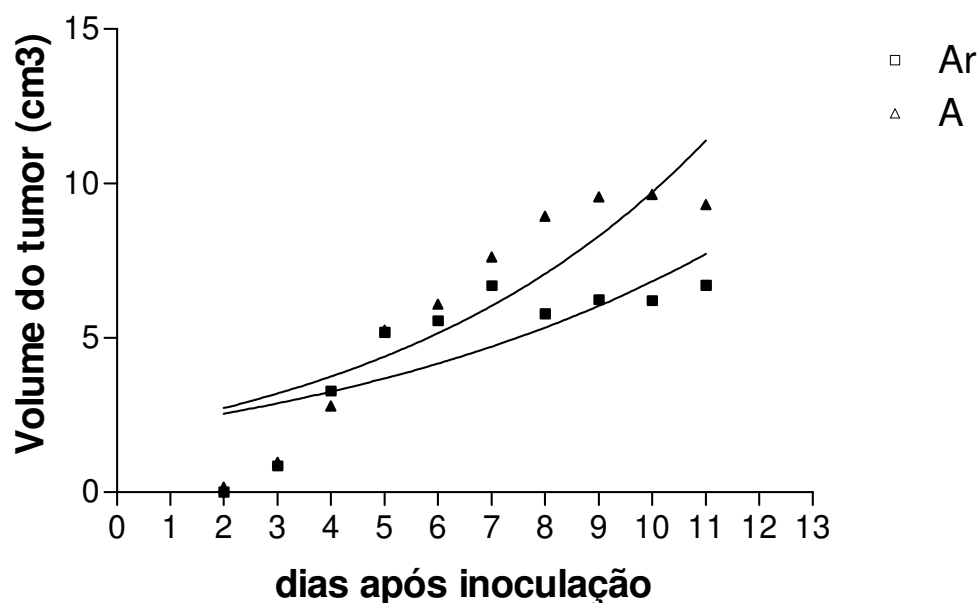


Figura 1- Volume do Tumor em função do tempo de inoculação. Verificou-se que a variante A apresenta taxa de crescimento (13,24% ao dia) mais elevada que a variante Ar (12,5% ao dia). A diferença não foi significativa.

4.1.2- Peso dos Animais

Embora os ratos inoculados com células tumorais A e AR apresentassem inibição do apetite, paradoxalmente os animais ganharam peso corpóreo. Sem diferenças estatisticamente significativas.

As médias de peso corpóreo dos ratos inoculados com W256-A foram $256,0 \pm 47,0$; $270,0 \pm 45,0$; $265,0 \pm 54,0$ e $282,0 \pm 70,0$ g nos dias 0, 4, 7 e 11 após inoculação, respectivamente. O peso médio dos ratos inoculados com W256-AR foi de $248,0 \pm 42,0$; $268,0 \pm 37,0$; $275,0 \pm 45,0$ e $291,5 \pm 56,0$ g nos dias 0, 4, 7 e 11 após inoculação, respectivamente (Figura 2).

4.1.3- Peso dos Baços

As médias dos pesos dos baços nos dias 4, 7 e 11 após a inoculação foram respectivamente: $0,5 \pm 0,02$; $0,7 \pm 0,08$ e $0,58 \pm 0,09$ g nos animais do Grupo A e $0,5 \pm 0,05$; $0,86 \pm 0,23$ e $1,41 \pm 0,34$ g nos animais do Grupo Ar. No Grupo RL, as médias encontradas foram de $0,3 \pm 0,04$; $0,45 \pm 0,01$ e $0,38 \pm 0,09$ g nos dias 4, 7 e 11 após a inoculação, respectivamente. Verificou-se aumento significativo no peso dos baços no 11º dpi dos animais do Grupo Ar ($p < 0,05$ – Tabela 3).

Para descartar a influência do peso do animal sobre o aumento do baço dos ratos inoculados, realizou-se a relação entre o peso do baço pelo peso do animal. Contudo, não encontramos valores significativamente entre os grupos estudados.

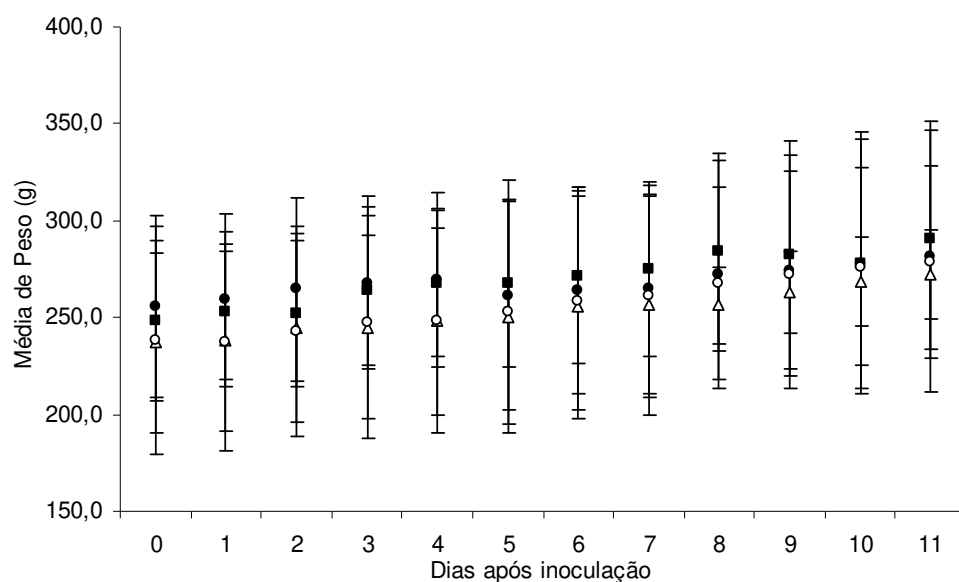


Figura 2- Peso médio de ratos inoculados com tumor de Walker 256, variante A, e Ar e grupo controle RL. Todos os animais apresentaram ganho de peso, independente do grupo experimental. Valores representam média $\pm$ desvio padrão, contudo sem diferenças significativas.

Tabela 1- Grupos experimentais utilizados para análises

	n	Nº e local de inoculações	Inóculo
Grupo A	12	4 inoculações sc	Variante agressiva A
Grupo Ar	12	4 inoculações sc	Variante regressiva Ar
Grupo RL	12	4 inoculações sc	Ringer-lactato
GRUPO SI	4	Sem inoculações	controle

Tabela 2- Os primers utilizados, obedecendo à estratégia sense e anti-sense

Primer	Sense	Anti-sense	BP
FAS	5' ACACGGACAGGAAACACTAT 3'	5' AACTTTTCAGGACTTGGGAT 3'	367
FAS-L	5' CCACCTCCATCACCCTACCA 3'	5' GGCCGCCTTTCTTATACTTCA 3'	385
BCL-2	5' GGCATCTTCTCCTTCCAG 3'	5' CATCCCAGCCTCCGTTAT 3'	
TNF- α	5' GTGCCTCAGCCTCTTCTCATTCC 3'	5' GCTCCTCCGCTTGGTGGTTT 5'	218
INF- γ	5' GTTTTGCAGCTCTGCCTCATGGCCCTCT 3'	5' CAGCACCGACTCCTTTTCCGCTTCCTTA 3'	446
IL-12	5'GATGTTTATGTTGTAGAGGTGGACTGGC 3'	5'TTCCTTCTGTGGAGCAGCAGATGTGAG 3'	240
TGF- β	5' CCGCAACAACGCAATCTATG 3'	5' GCCCTGTATTCCGTCTCCTT 3'	304
Ciclofilina	5' GACAGCAGAAAACCTTCGTGC 3'	5' GGTCTGACTCACCGACC T 3'	276

Tabela 3- Peso médio de baços(g) de animais dos grupos A, Ar e RL, do 4º ao 11º dias após a inoculação. Observou-se um aumento significativo nos peso dos baços de animais inoculados com a variante Ar no 11º dia após inoculação. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. * $p \leq 0.05$ comparando os grupos experimentais (A, Ar e RL) com o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico).

	Dias após a inoculação		
	4	7	11
<u>A</u>	1,4 $\pm$ 0.1	1,6 $\pm$ 0.3	1,4 $\pm$ 0.5
AR	1,3 $\pm$ 0.05	1,8 $\pm$ 0.1	3,1 $\pm$ 0.1
RL	0,76 $\pm$ 0.1	1,2 $\pm$ 0.09	1,0 $\pm$ 0.2

4.1.4-Valores de Hemoglobina (g/dL)

As médias dos valores de hemoglobina no Grupo A foram: $16,4 \pm 0,7$; $15,0 \pm 2,1$; $13,9 \pm 2,1$ e $7,8 \pm 0,2$ g/dL nos dias 0, 4, 7 e 11 respectivamente. As médias de hemoglobina dos animais do Grupo Ar foram: $16,9 \pm 0,9$; $14,4 \pm 2,1$; $12,7 \pm 1,3$ e $10,9 \pm 0,3$ g/dL nos dias 0, 4, 7 e 11 respectivamente. Observou-se que os valores de hemoglobina no Grupo A estavam significativamente menores no 11º dpi em comparação com os animais do Grupo Ar (figura 3).

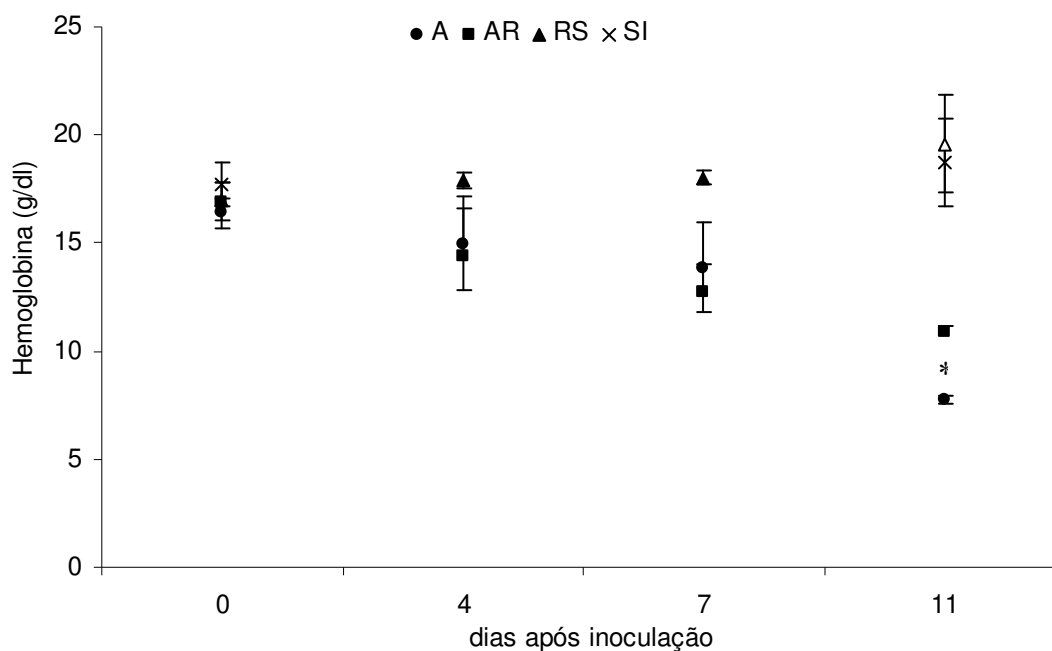


Figura 3- Avaliação dos níveis de hemoglobina. Observou-se queda nos níveis de hemoglobina nos grupos inoculados com tumor, apresentando-se significativamente reduzido no grupo A no 11º dpi. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparando os grupos experimentais (A, Ar e RL) com o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico).

4.1.5- Fragilidade osmótica

As análises de fragilidade osmótica realizada em eritrócitos evidenciaram um significativo desvio à esquerda em animais inoculados com a variante A. Este desvio representa a susceptibilidade dos eritrócitos ao rompimento em concentrações menores de cloreto de sódio. A fragilidade pode ser representada por valores de fragilidade corpuscular média (FCM), - concentração de NaCl em que ocorre 50% de hemólise que na variante A $-0,54 \pm 0,07$, $-0,38 \pm 0,19$ e $-0,6 \pm 0,03$ ($p < 0.05$ – Figura 4).

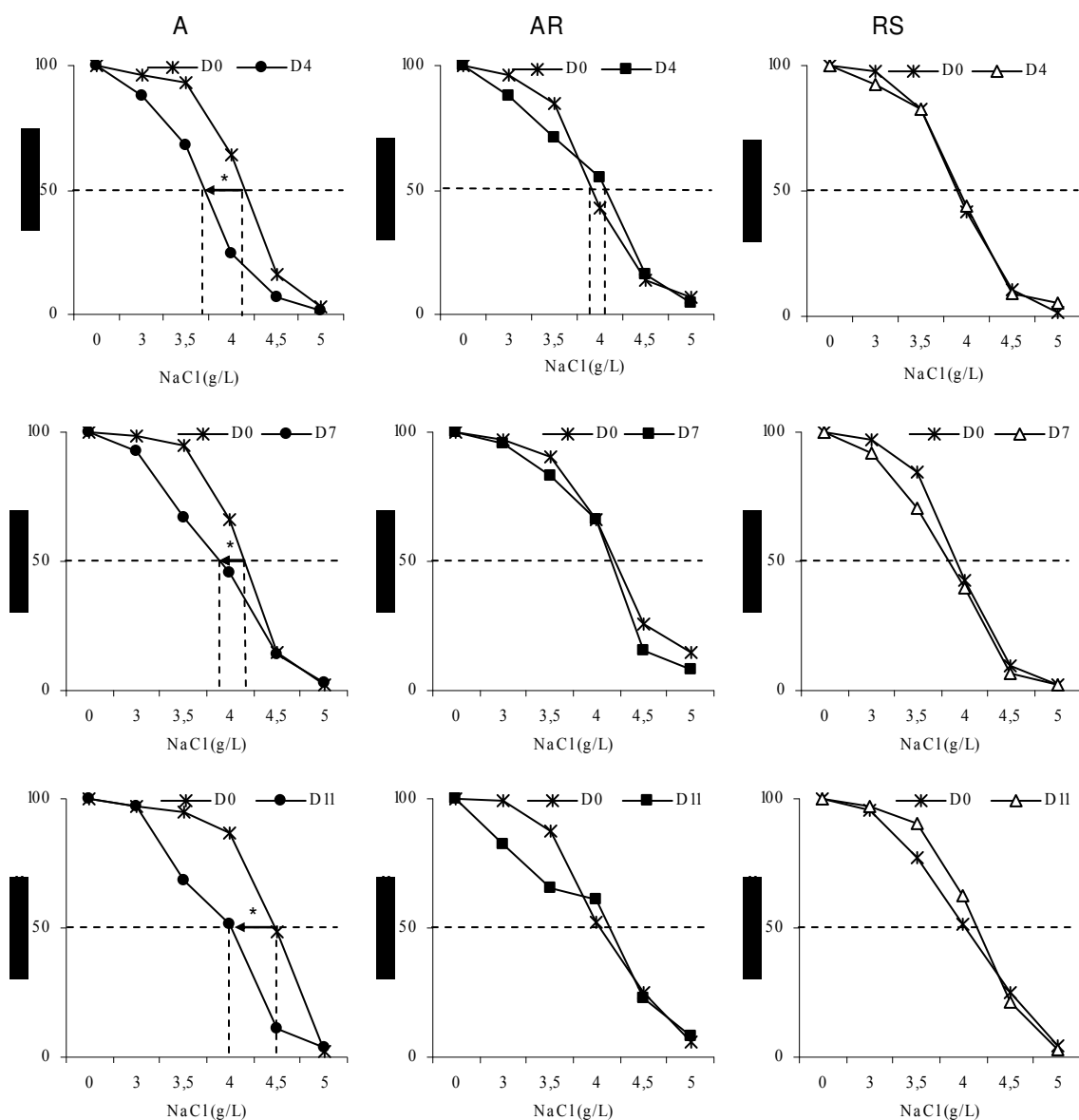


Figura 4- Avaliação da fragilidade osmótica em eritrócitos de ratos inoculados com Walker 256 variantes A e Ar e controle inoculado com RL no 4º, 7º e 11º dias após a inoculação. Animais inoculados com a variante A apresentam significativo desvio à esquerda, ou seja, aumento da susceptibilidade do eritrócito à lise em solução hipotônica. Houve diferença significativa comparando os dias 4 e 11 do grupo A com os demais grupos ($p < 0.05$).

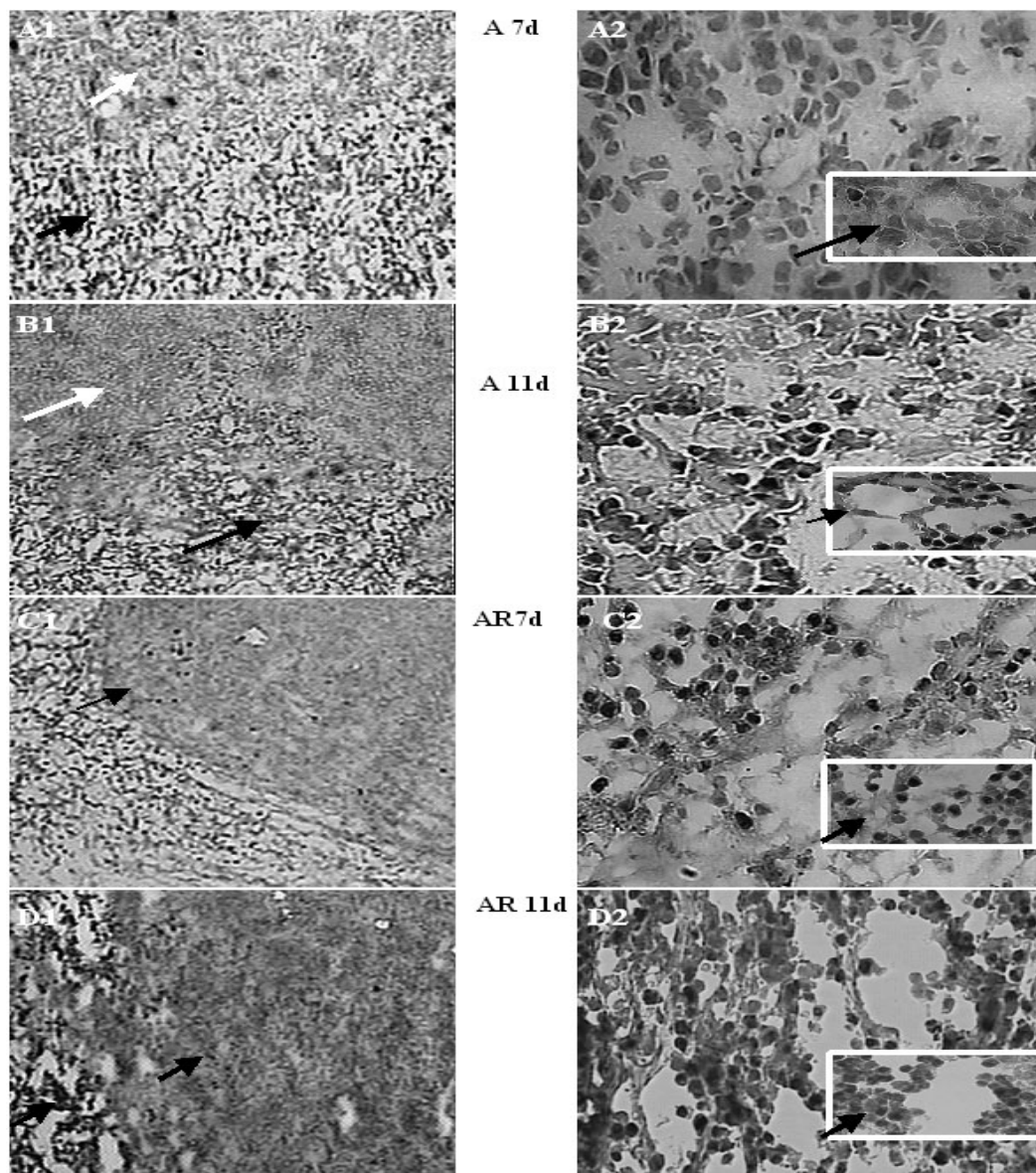


Figura 4A- Fotomicrografias de Tumor de Walker 256 provenientes de ratos Wistar inoculados com a linhagem A e AR e sacrificados no 70 e 110 dia. Os cortes histológicos dos animais tratados com a linhagem de Tumor de Walker 256 são representados pelas figuras A1 e A2 (70 dia), e B1 e B2 (110 dia). A linhagem AR representadas pelas figuras C1 e C2 (70 dia), e D1 e D2 (110 dia). As figuras (A1,B1,C1,D1) e as figuras (A2,B2,C2,D2) corresponde ao aumento de 200 e 640(?) vezes respectivamente corados através do método de hematoxilina e eosina (H.E). Na linhagem A (70 dia-seta) predomínio de células tumorais, fibras colágenas e raras células inflamatórias, no (110 dia-seta) predomínio de células tumorais com infiltrado inflamatório, A linhagem AR no (70 dia e 110 dia-seta) predomínio de células tumorais e infiltrado inflamatório periférico com o predomínio de macrófagos e neutrófilos).

4.2- Avaliação histológica

4.2.1- Grupo A

A análise morfológica do tumor dos animais inoculados com a linhagem W256-A mostrou massa tumoral densa, ausência de cápsula, com presença de células mononucleares distribuídas pelo tumor, sem caracterização de processo inflamatório.

Através da técnica de Feulgen não foram detectadas células com condensação cromatínica ou núcleos fragmentados, características de células apoptóticas. Ao contrário, observamos a presença de numerosas figuras de mitose.

A técnica de TUNEL para confirmação de células em apoptose *in situ* mostrou os mesmos resultados encontrados na técnica Feulgen, ou seja, ausência de células apoptóticas nos tumores analisados.

4.2.2- Grupo AR

O tumor dos ratos inoculados com W256-Ar exibiu esboço de cápsula fibrosa, e infiltrado inflamatório constituído por células mononucleares e neutrófilos concentrados na periferia do tumor. Assim como nos animais do Grupo A, não detectamos a presença de células apoptóticas por nenhuma técnica utilizada.

4.3- RT-PCR semiquantitativo

4.3.1- Expressão Gênica de Citocinas em Células Tumorais e Esplênicas

Em células tumorais da linhagem A os níveis de expressão do RNAm de TGF- β mantiveram-se constantes. Comparando-se os grupos experimentais foram observados níveis significativamente maiores desta citocina nos dias 4 e 11 no grupo A e 7 no grupo Ar ($p < 0.05$). A média da expressão de TGF- β foi $51,0 \pm 22,0$; $77,0 \pm 26,0$ e $42,0 \pm 32,5$ no grupo A; $0,0$; $123,0 \pm 52,4$ e $11,7 \pm 6,5$ no grupo Ar nos dias 4, 7 e 11 dias após inoculação (figura 5A).

Nas células esplênicas, os níveis apresentados de TGF- β foram significativamente menores no grupo Ringer lactato ($p<0,05$), no 4º dia após inoculação em comparação com as demais linhagens. Por outro lado, 11 dias após a inoculação, estes níveis estarem significativamente menores ($p<0,05$) nas células esplênicas de animais inoculados com a variante *Ar*. As médias das expressões do RNAm foram $104,5\pm38,4$; $134,0\pm33,6$; $84,0\pm4,0$; no grupo *A* $111,0\pm14$; $61,5\pm44,8$ e $61,7\pm1,7$ no grupo *Ar* e $73,7\pm3,4$; $111,0\pm28,1$ e $84,0\pm6,6$ no grupo RL nos dias 4, 7 e 11 respectivamente após inoculação (figura 5B).

Nos tempos estudados, a expressão de IL-12 nas células tumorais no grupo *A* foi progressivamente maior ($p<0,001$, ANOVA), enquanto que no grupo *Ar* a expressão desta citocina foi constante. A comparação entre os grupos *A* e *Ar* mostrou diferença significativa nos níveis de expressão de IL-12 nos dias 4 e 11 ($p<0,05$ - Figura 6A). Os valores médios de expressão de RNAm de IL-12 foram $85,0\pm11,0$; 207 ± 90 e $507\pm72,0$ no grupo *A* e $197,0\pm84,0$; $249,0\pm72,0$ e $227,0\pm90,0$ no grupo *Ar* nos dias 4, 7 e 11 após inoculação.

Nas células esplênicas, os níveis de RNAm de IL-12 foram significativamente maiores no dia 4 na variante *Ar* e na variante *A* no dia 11 e ($p<0,05$). Houve uma diminuição progressiva no grupo *A* ($p<0,05$). A média da expressão de RNAm IL-12 foi $147,5\pm18,5$; $129,0\pm1,8$ e $76,0\pm6,2$ no grupo *A*; $112,0\pm7,4$; $116,0\pm27,8$ e $104,0\pm3,1$ no grupo *Ar* e $95,0\pm18,3$; $139,0\pm24,0$ e $93,0\pm11,0$ no grupo RL nos dias 4, 7 e 11 após inoculação, respectivamente (Figura 6B).

As células tumorais do grupo *A* não apresentaram expressão gênica de IFN- γ enquanto que no grupo *Ar* os níveis de expressão de IFN- γ foram $47,5\pm30,2$; $72,5\pm10,0$ e $226,5\pm94,8$ nos dias 4, 7 e 11 após inoculação (Figura 7A). Entretanto, nas células esplênicas dos animais inoculados com a linhagem *A* apresentaram elevação significativa dos níveis de RNAm de IFN- γ nos dias 4 e 7 em comparação com as células esplênicas do grupo controle, mas no 11º dpi não foi verificada a expressão gênica desta citocina. As médias das expressões dos RNAm foram $7,3\pm2,6$; $81,00\pm23,0$, e 0 no grupo *A*; 0,0; $16,3\pm5,4$ e 0,0 no grupo *Ar* e $4,5\pm2,6$; 0,0 e $29,3\pm2,2$ no grupo RL nos dias 4, 7 e 11 após inoculação, respectivamente (Figura 7B).

As células tumorais da linhagem *A* exibiram níveis significativamente maiores de RNAm de TNF- α no dia 11 após inoculação ($p < 0.05$). A média de expressão do RNAm TNF- α foi de $24,0 \pm 2,4$; $0,0$ e $84,5 \pm 3,0$ no grupo *A*; $22,5 \pm 9,5$; $14,5 \pm 7,4$ e $46,0 \pm 12,0$ no grupo *Ar* nos dias 4, 7 e 11 após inoculação (Figura 8A). Não foi detectada expressão de TNF- α nas células esplênicas dos animais dos grupos *Ar* e *RL*. A média de expressão de RNAm TNF- α no grupo *A* foi $27,5 \pm 1,3$; $14,5 \pm 2,0$ e $0,0$ e ausente no grupo *Ar* nos dias 4, 7 e 11 respectivamente, após inoculação (Figura 8B).

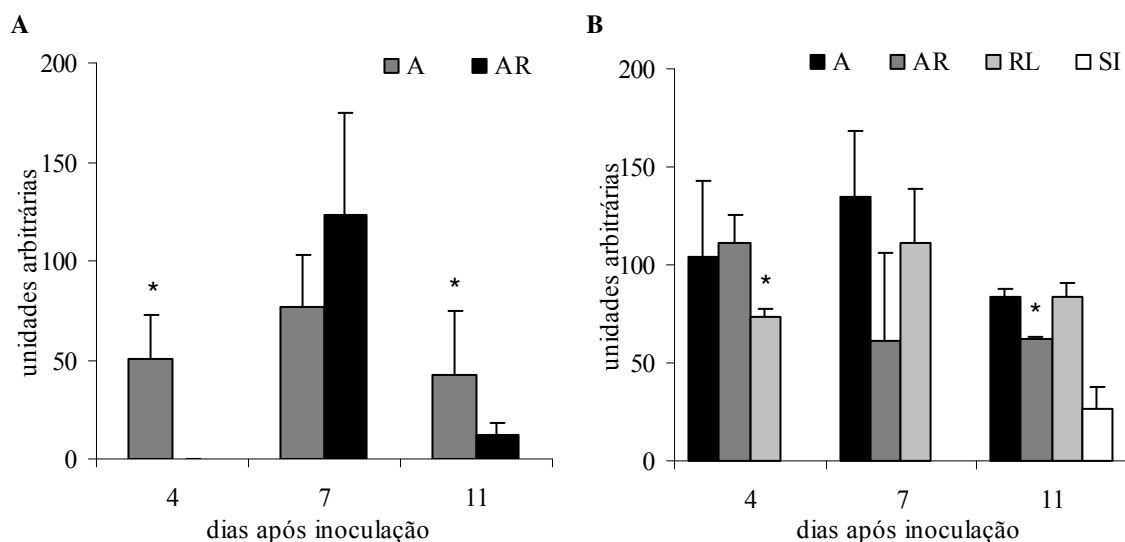


Figura 5- Expressão de TGF- β em células tumorais (A) e células esplênicas (B) de ratos inoculados com Walker 256 variante A e Ar, 4º, 7º e 11º dpi. (A) Células tumorais de animais inoculados com a variante A exibem níveis significativamente maiores no 4º e 11º dia após a inoculação ($p < 0.05$). (B) Em células esplênicas observou-se níveis significativamente menores ($p < 0,05$) de TGF- β em células do grupo RL no 4º dpi. Entretanto, no 11º dpi células provenientes do grupo Ar exibem níveis significativamente menores ($p < 0,05$). Os dados representam três experimentos separados usando três doadores diferentes. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$. Nas comparações entre as variantes tumorais utilizou-se o teste de Mann-Whitney e, entre os grupos experimentais, o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico).

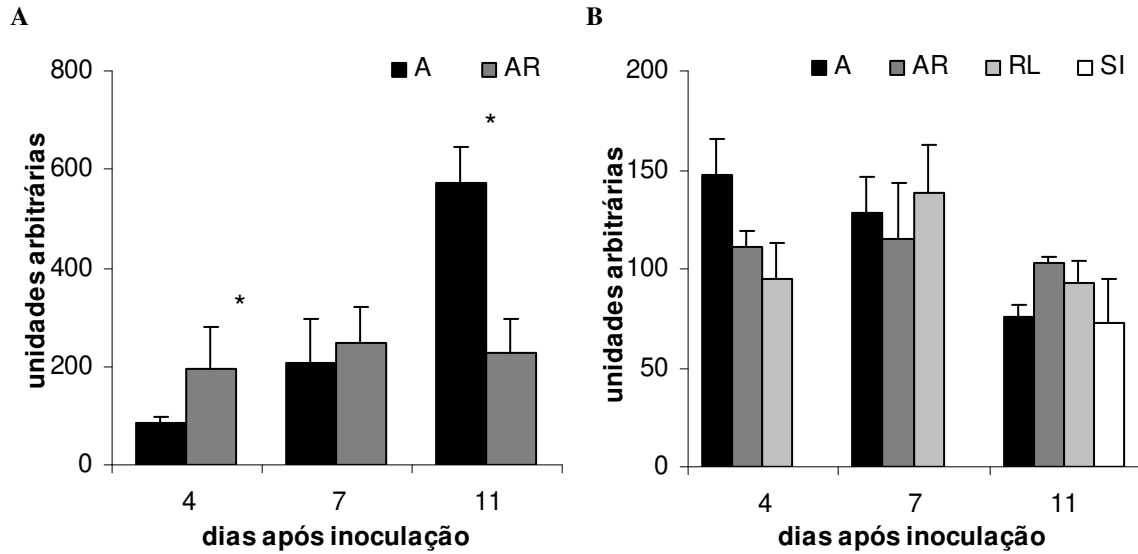


Figura 6- Expressão Gênica de IL-12 em células tumorais (A) e células esplênicas (B) de ratos inoculados com Walker 256 variantes *A* e *Ar* nos dias 4, 7 e 11 após inoculação. (A) Células tumorais de animais inoculados com a variante *A* exibem elevação progressiva da expressão de IL-12, alcançando níveis significativamente maiores ($P < 0,05$) no 11º dpi. Ao contrário, células tumorais da variante *Ar* exibem níveis constantes desta citocina. (B) Em células esplênicas de ratos inoculados com a linhagem *A* verificou-se níveis significativamente menores ($p < 0,05$) de RNAm de IL-12 após 11 dias de inoculação. Os dados representam três experimentos separados usando três doadores diferentes. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$. Nas comparações entre as variantes tumorais utilizou-se o teste de Mann-Whitney e, entre os grupos experimentais, o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico).

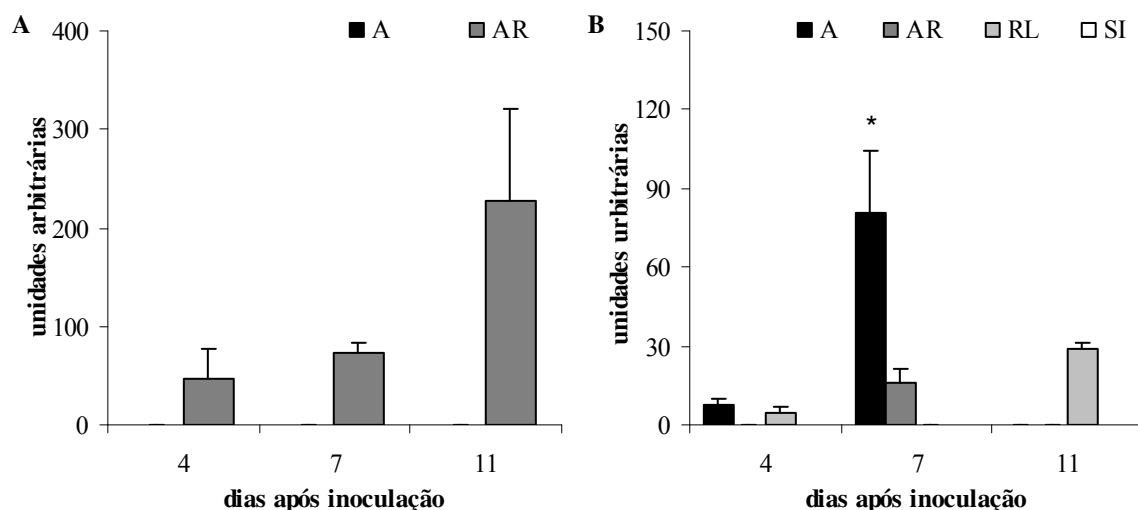


Figura 7- Expressão gênica de IFN- γ em células tumorais (A) e células esplênicas (B) de ratos inoculados com Walker 256 variante A e Ar nos dias 4, 7 e 11 após inoculação. (A) Nas células tumorais obtidas de animais do grupo A não foi detectado o RNAm de IFN- γ por todo período avaliado. (B) A análise da expressão gênica de IFN- γ em células esplênicas evidenciou níveis significativamente aumentados ($P < 0.05$) desta citocina no 7º dpi no grupo A. Os dados representam três experimentos separados usando três doadores diferentes. Os valores representam medias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$. Nas comparações entre as variantes tumorais utilizou-se o teste de Mann-Whitney e, entre os grupos experimentais o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico).

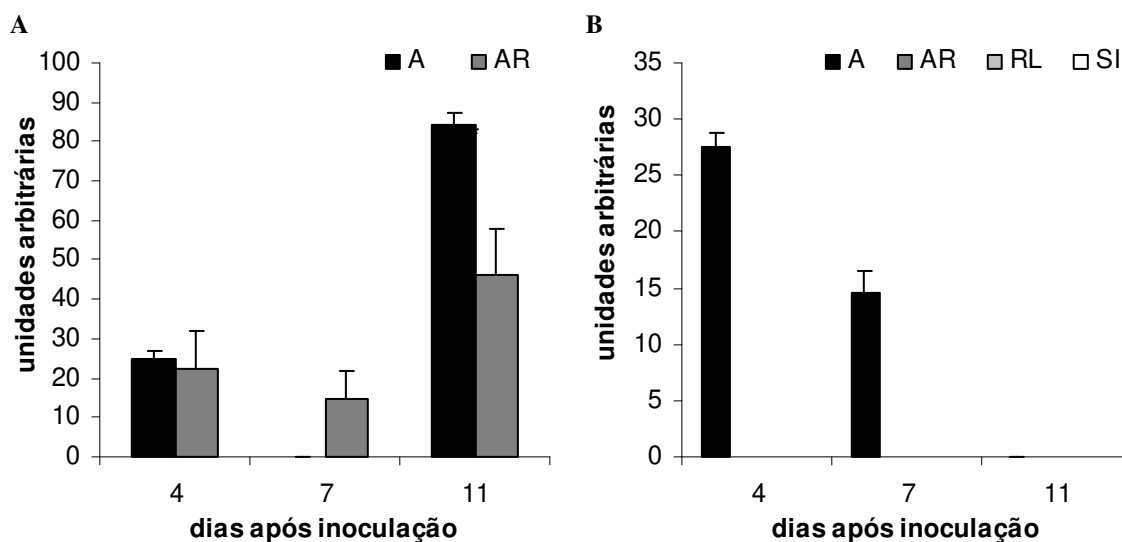


Figura 8- Expressão gênica de TNF- α em ratos inoculados com Walker 256 variantes A e Ar nos dias 4, 7 e 11 após inoculação. (A) Em células tumorais obtidas de animais inoculados com a variante A expressam níveis significativamente maiores ($p < 0.05$) desta citocina no 11º dpi. (B) Em células esplênicas a expressão do RNAm de TNF- α foi detectada apenas em animais inoculados com a variante A. Os dados representam três experimentos separados usando três doadores diferentes. Os valores representam medias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$. As comparações entre as variantes tumorais utilizou-se o teste de Mann-Whitney e, entre os grupos experimentais, o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico).

4.3.2- Expressão de RNAm de componentes apoptóticos em células tumorais e células esplênicas

Em todos os dias avaliados não houve expressão do RNAm de Fas no grupo A. Por outro lado o grupo Ar apresentou Fas cujas médias foram 0.0; 73.8 ± 41.7 ; 45.3 ± 29.0 nos dias 4, 7 e 11 após inoculação (Figura 9 A).

Nas células esplênicas, os níveis de expressão de RNAm de Fas foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no dia 4 na variante A comparando com os grupos Ar e RL. As médias das expressões de RNAm foram de $115,5 \pm 3,9$; $89,0 \pm 7,3$ e $49,0 \pm 24,0$ na

variante A; $52,0 \pm 27,0$ e $52,5 \pm 40,0$ e $59,2 \pm 20,0$ na variante *Ar*; e $66,5 \pm 25,3$; $85,5 \pm 40,0$ e $58,2 \pm 10,0$ no grupo RL nos dias 4, 7 e 11, respectivamente (Figura 9 B).

Nos animais do grupo *Ar* os níveis de RNAm FAS-L foram significativamente mais elevados nos dias 7 e 11. ($p < 0,05$). Os valores médios de expressão do RNAm de FAS-L foram $45,7 \pm 10$; $157,3 \pm 41,3$ e $99,7 \pm 74,2$ no grupo A e no grupo *Ar* foram $51,0 \pm 36,2$; $157,2 \pm 41,3$ e $99,5 \pm 74,2$ após 4, 7 e 11 dias após inoculação, respectivamente (Figura 10A).

Nas células esplênicas do grupo *Ar* a cinética da expressão de FAS-L foi semelhante àquela das células tumorais, com níveis significativamente maiores ($p < 0,05$) do RNAm de Fas-L no 7º dia após a inoculação. Por outro lado, no dia 11 a expressão de RNAm de FAS-L foi detectada no dia 11 apenas na variante A. Os níveis médios da expressão de RNAm foi de $58,0 \pm 28,0$; $27,5 \pm 4,2$ e $29,0 \pm 9,9$ na variante A; e $41,7 \pm 20,0$; $79,2 \pm 3,3$ e 0 na variante *Ar* e 0; 0 e 0 no grupo RL nos dias 4, 7 e 11 após inoculação, respectivamente (Figura 10 B).

Nas células tumorais, pode-se verificar que a expressão gênica de Bcl-2 estava significativamente aumentada ($p < 0,05$) no 7ºdpi no grupo *Ar*. Contudo, no 11º dpi a expressão do RNAm desta proteína no grupo *Ar* não foi detectada neste experimento. Os níveis de expressão de RNAm foram 0; $60,7 \pm 18,0$; $158,0 \pm 57,2$ no grupo A e 0.0; $167,0 \pm 42,2$; e 0,0 no grupo *Ar* (Figura 11A).

A avaliação da expressão de RNAm de Bcl-2 nas células esplênicas mostram níveis significativamente maiores ($p < 0,05$) no 4º e 7ºdpi no grupo *Ar*. No 11ºdpi não foi detectada a expressão de Bcl-2. No grupo A os níveis médios de RNAm foram de 0,0; $20,2 \pm 4,5$ e $9,5 \pm 3,3$; $18,5 \pm 7,3$; $32,0 \pm 11,3$ e 0.0 no grupo *Ar* nos dias 4, 7 e 11, respectivamente (Figura 11 B).

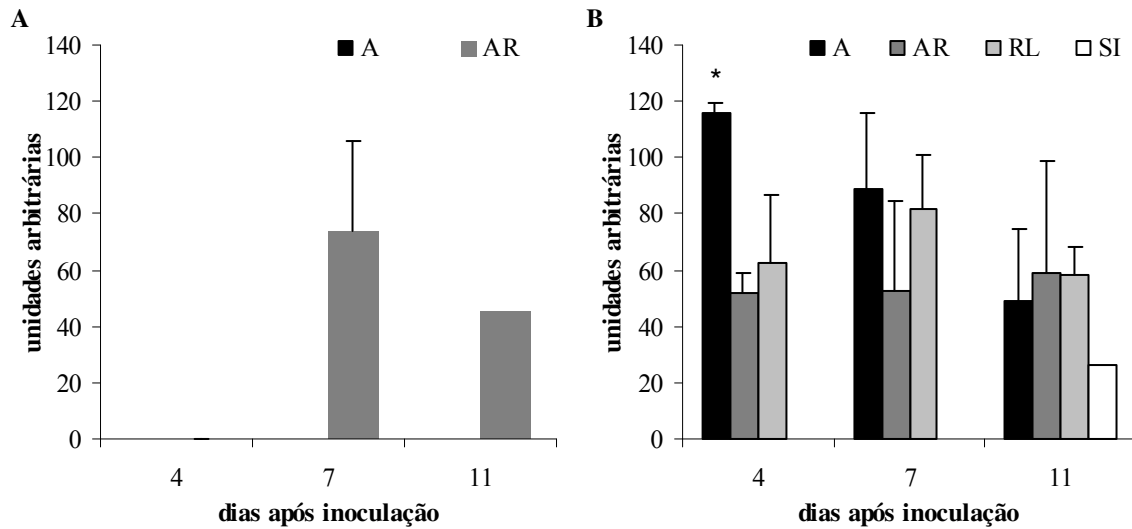


Figura 9- Expressão gênica de Fas em células tumorais (A) e células esplênicas (B) de animais inoculados com Walker 256 variantes A e Ar no dias 4, 7 e 11 após inoculação. (A) Não foram detectados níveis de Fas na variante A durante o período avaliado em células tumorais. (B) A análise da expressão de Fas nas células esplênicas evidenciou níveis significativamente maiores no grupo A no 4º dpi. Os dados representam três experimentos separados usando três doadores diferentes. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$. Nas comparações entre as variantes tumorais utilizou-se o teste de Mann-Whitney e, entre os grupos experimentais, o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico).

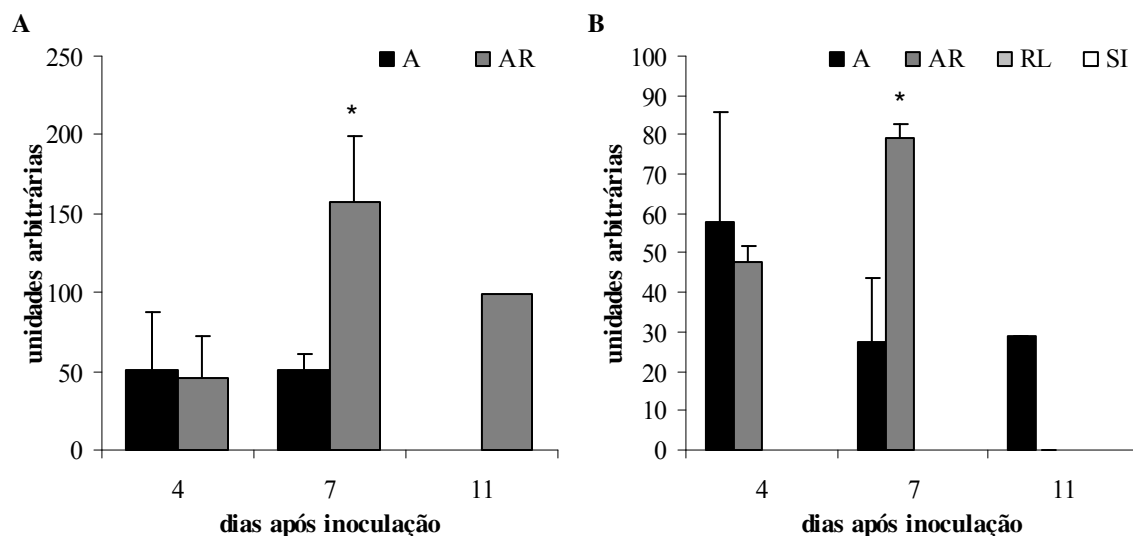


Figura 10- Expressão gênica de FAS-L em células tumorais (A) e células esplênicas (B) provenientes de animais inoculados com Walker 256, variantes *A* e *Ar* nos dias 4, 7 e 11 após inoculação. (A) Observou-se nível significativamente elevado ($p < 0,05$) de Fas-L em células tumorais do grupo *Ar* no 7º dpi. (B) De forma semelhante, em células esplênicas as células de animais provenientes do grupo *Ar* expressam níveis mais elevados desta molécula no 7º dpi. Os dados representam três experimentos separados usando três doadores diferentes. Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$. Nas comparações entre as variantes tumorais utilizou-se o teste de Mann-Whitney e, entre os grupos experimentais, o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico).

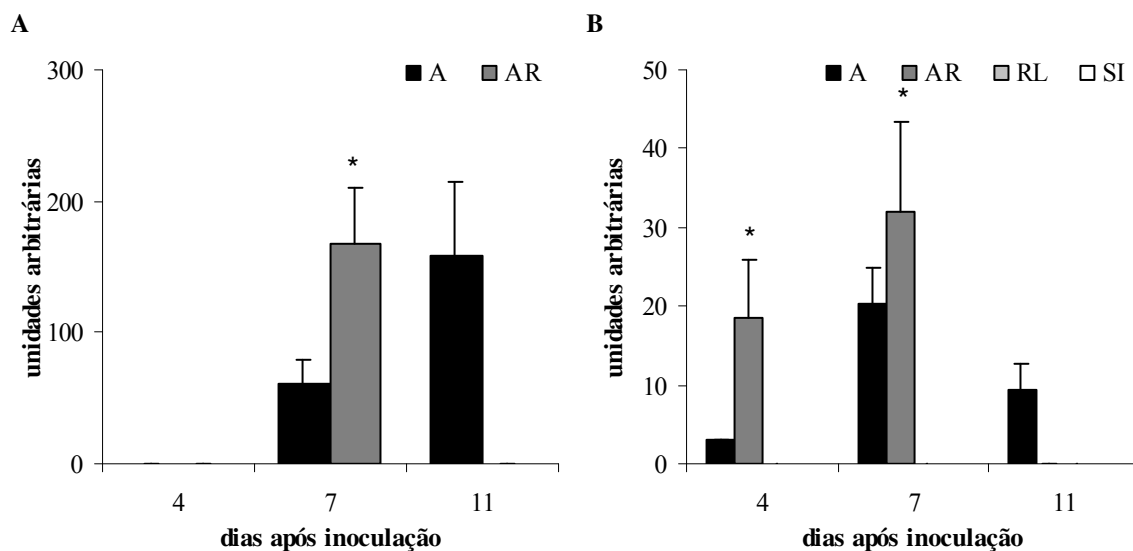


Figura 11- Expressão gênica de Bcl-2 em células tumorais (A) e células esplênicas (B) provenientes de animais inoculados com Walker 256, variantes A e Ar nos dias 4, 7 e 11 após inoculação. (A) Observou-se nível significativamente elevado ($p < 0,05$) de Bcl-2 em células tumorais do grupo Ar no 7º dpi. (B) Em células esplênicas de animais provenientes do grupo Ar expressam níveis mais elevados desta molécula no 4º e 7º dpi. Os dados representam três experimentos separados usando três doadores diferentes. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$. Nas comparações entre as variantes tumorais utilizou-se o teste de Mann-Whitney e, entre os grupos experimentais, o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico).

5- DISCUSSÃO

Grande parte do entendimento da fisiopatologia do câncer está fundamentado em estudos experimentais, submetendo animais ao tratamento com citocinas e observação dos efeitos imunoregulatórios. Estes modelos têm fornecido dados importantes para o desenvolvimento de terapias que poderão modular a resposta imune a favor do hospedeiro.

O tumor de Walker 256 tem sido utilizado na investigação dos processos fisiopatológicos envolvidos na indução de anorexia, caquexia e formação de metástases (IWANA-MATTOS et al., 1974; IWANA-MATTOS, 1979; MORRISON, 1971; e RETTORI, et al., 1994; e TOAL et al, 1961; MORRISON, 1971; GUAITANI et al, 1982; TAYEK & BRASEL, 1990).

No presente trabalho, submetemos os animais a inoculações múltiplas, para antecipar e sincronizar os efeitos sistêmicos, estabelecendo o acompanhamento até o 11º dia após a inoculação, período correspondente a máxima expressão dos efeitos sistêmicos do tumor.

Todos os animais submetidos à inoculação das células tumorais apresentaram ganho de peso, com o crescimento do tumor. A partir do nono dia os animais exibiram sinais de caquexia, conforme esperado para o desenvolvimento de câncer.

O ganho de peso observado inicialmente nos animais inoculados pode estar relacionado à retenção hídrica, visto que há vários estudos demonstrando através da inoculação multifocal, que a retenção de sódio induzida pelo tumor de Walker 256 seria consequência de um efeito tubular renal primário (RETTORI et al, 1996), prévio a hiperfunção adrenal ou seqüestro de sal secundário ao desenvolvimento do tumor (TOAL et al, 1961; MORRISON, 1968). Além disto, o hormônio antidiurético pode potencializar a retenção de sódio induzida pelo tumor, pela Síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético (GUIMARÃES et al, 1999).

Dentre as características que diferem a linhagem A da linhagem Ar, está a esplenomegalia observada nesta última, avaliada no presente trabalho pela determinação do peso do baço dos animais inoculados. Os baços de animais do grupo Ar estarem significativamente aumentados, quando comparado com os demais grupos no dia

11º dia após inoculação. A esplenomegalia pode ser devido a proliferação reativa de células linfóides, infiltração por células neoplásicas, hematopoiese extramedular, ou proliferação por células fagocitárias (CROSBY, 1980; EICHER, 1979).

Todos os animais experimentais inoculados desenvolveram anemia, efeito sistêmico característico do estágio final do câncer após inoculação multifocal, na ausência de complicações como sangramento, invasões ou visíveis metástases. A redução rápida e precoce dos níveis de hemoglobina nos animais inoculados com células tumorais indicam forma aguda de anemia que, na ausência de sangramento pode ser explicado pela destruição rápida dos eritrócitos, infiltração na medula óssea por células tumorais, ou alterações bioquímicas, que interferem na eritropoiese.

Associada às alterações na eritropoiese, a esplenomegalia é um fator relevante no seqüestro e destruição de eritrócitos, contribuindo para anemia verificada nas diferentes linhagens. Além disso, precursores eritróides imaturos são sensíveis a apoptose através da ativação da via intrínseca ou via extrínseca. Estes mecanismos apoptóticos estão exacerbados em algumas condições patológicas como as neoplasias (TESTA, 2004).

A fragilidade osmótica dos eritrócitos reflete a sua capacidade de captar água sem que ocorra a lise celular, a qual é determinada por meio do volume corpuscular médio. (DACIE et al, 1984). Desta forma, as células que são mais esféricas e com relação superfície/volume diminuída, apresentam capacidade limitada de se expandir em soluções hipotônicas, sofrendo lise em concentrações mais altas de NaCl (solução hipertônica) do que os eritrócitos bicôncavos normais. Estes eritrócitos apresentam fragilidade osmótica aumentada. Por outro lado, células que são hipocrômicas e mais planas apresentam maior capacidade de se expandir em soluções hipotônicas, apresentam lise em concentrações mais baixas do que as células normais e mostram então diminuição da fragilidade osmótica.

Nossos resultados mostraram que o desenvolvimento da anemia acompanhou-se pela diminuição da fragilidade osmótica dos eritrócitos (desvio de curva para esquerda), indicando redução no volume destas células circulantes no grupo A. Os defeitos de membrana adquiridos diminuem a média de volume de superfície das hemácias, aumentando a fragilidade osmótica (DACIE et al, 1984 e VIDA et al, 2000). Além disso,

a indução de mudanças no volume celular leva a importantes mudanças metabólicas celulares (LANG et al, 1995 e VIDO et al, 2000), associadas à produtos circulantes do tumor e citocinas (TESSITORE et al, 1993) que agem no metabolismo e/ou membrana plasmática. A atividade enzimática deficiente no eritrócito pode resultar na destruição prematura e anemia hemolítica e a interferência do estresse oxidativo no metabolismo do eritrócito pode resultar em hemólise (ELGEHETANY MT and Davey FR in Henri, 19 ed).

Os resultados descritos sugerem associação entre anemia e outros efeitos sistêmicos como anorexia induzida pelo câncer. Estudos recentes propõem desequilíbrio entre, hormônios anabólicos e catabólicos, e citocinas, desencadeado pelo tumor no hospedeiro como origem da base molecular da caquexia no câncer (TESSITORE et al, 1993, COHEN et al, 1997 e SPIVAC et al, 1994).

Os aspectos morfológicos do processo inflamatório foram avaliados na massa tumoral dos animais no período descrito. Os resultados demonstraram presença de linfócitos na periferia do tumor na linhagem *Ar*, sem que houvesse infiltração na massa tumoral, sugerindo uma tentativa de resposta antitumoral apresentada por esta linhagem, associado com expressão de citocinas .

Os mecanismos imunológicos mobilizados durante a instalação e o crescimento do tumor de W256 são pouco conhecidos. Apesar disto, alguns trabalhos mostram o desenvolvimento de certa resistência ao tumor por ratos que foram submetidos ao contato imunogênico prévio (BUINAUSKAS et al, 1966; PEREIRA & GUSTALE, 1992 e GUIMARÃES et al, 1995). Todavia, tentativas de se demonstrar a presença de anticorpos circulantes contra o tumor W256 não foram conclusivas, conferindo papel secundário à imunidade humoral (DINH & BRASSARD, 1967; MEYERS, 1975; MOTA & RESKALLAH-IWASSO, 1981 e GUIMARÃES et al, 1995).

A associação de diferentes técnicas como estudo da expressão gênica para componentes de apoptose, análise histopatológica, detecção de células apoptóticas *in situ*, são de grande contribuição para avaliação do estudo da imunoregulação tumoral correlacionando a dinâmica do aparecimento da anemia, crescimento tumoral, fragilidade osmótica.

Para avaliação dos componentes da resposta imune quanto à expressão de citocinas, realizou-se a RT-PCR para análise da expressão gênica das principais citocinas envolvidas nesta resposta, bem como de moléculas relacionadas com apoptose.

Nossos resultados mostraram aumento significativo da expressão de TGF- β no grupo de animais inoculado com a variante A. A produção do TGF- β está associada ao crescimento tumoral em uma grande variedade de neoplasias, as quais têm a capacidade de secreção desta citocina. O TGF- β é um potente imunossupressor sistêmico, inibindo a proliferação e diferenciação de linfócitos T em linfócitos T citotóxicos (CTLs) e em linfócitos T auxiliares (Th), além inibir as funções estimulatórias das APCs (GORELIK e FLAVELL, 2001)

A transfecção do cDNA de TGF- β em linhagem de célula tumoral eleva a tumorigenicidade permitindo a evasão da citotoxicidade tumoral mediada por linfócitos T do hospedeiro, além disso pode modular a resposta imune reduzindo a expressão das moléculas de MHC classe II nas células tumorais (GEISER et al., 1993). A produção de citocinas Th1 é importante para erradicação tumoral, a supressão dessas funções pelo TGF- β pode ser importante mecanismo pelo qual as células tumorais inibem a resposta imune (GORELIK, 2001; VAN ROOZENDAAL, 1995; TAMADA, 1997; Seo, 1999; CHAKRAVARTY, 1999).

Por outro lado, verificamos que as células tumorais da linhagem A expressam níveis significativamente mais elevados de IL-12, ao contrário da linhagem Ar, que a expressa em níveis constantes. Em células esplênicas, a expressão desta citocina é significativamente menor no 11ºdpi na variante A

A análise das células tumorais W256 sensível (WS) e resistente (WR) a *cis*-diaminedicloroplatinum por microscopia eletrônica mostrou a existência de duas populações celulares. Utilizando-se procedimentos de imunoistoquímica e citometria de fluxo para sua fenotipificação pode-se constatar ausência de marcadores celulares epiteliais. A utilização de anticorpos monoclonais para detecção de células monocíticas, mielóide e linfóide mostrou que as células W256 têm provável origem monocítica (SIMPKINS, 1991). A histoquímica enzimática mostrou intensa atividade local de fosfatase

ácida sugestiva de origem hematopoiética. Assim, este estudo mostrou que os tipos celulares WR e WS são de origem hematopoiética com ausência de marcadores epiteliais.

Os dados histológicos não evidenciaram a presença de infiltrado inflamatório na linhagem A, justificando a expressão da IL-12, sugerindo que detecção de seu RNAm no tumor de Walker 256 possa ser constitutiva já que, acredita-se que a sua origem seja monocítica (SIMPKINS et al., 1991). Estudos demonstraram que células leucêmicas transformadas podem expressar IL-12 e, esta produção não está associada ao estado de diferenciação celular (KUBIN et al., 1994).

A IL-12 é o principal mediador da fase inicial da resposta imune a microrganismos intracelulares e da indução de imunidade mediada por célula. A principal ação do é estimular fagócitos mononucleares e células dendríticas. Além disso, estimula a produção de IFN- γ pelas células NK e linfócitos T, estimula a diferenciação de linfócitos T helper CD4⁺ em células produtoras de IFN, aumentam as funções citotóxicas de NK ativadas e linfócitos T CD8⁺, IFN- γ produzido pelas células NK ou células T estimulam a produção de IL-12.

Evidenciando a resposta imune das células tumorais, verificamos que apenas a variante regressiva do tumor Walker 256, a *Ar* expressa IFN- γ . Portanto, nossos resultados sugerem que a falta de expressão desta citocina nas células tumorais da linhagem A pode estar associada à ausência de infiltrado inflamatório. Uma vez que o IFN- γ é produzido por linfócitos T e NK ativados, a falta desta citocina pode estar correlacionada com a baixa expressão MHC classe I (SCHANOSKI et al., 2004).

A participação do IFN γ na resposta imune antitumoral neste modelo parece ser fundamental, visto que o mesmo estimula a expressão de moléculas de MHC classe I e II e coestimuladoras nas células apresentadoras de antígenos. Esta citocina também estimula a produção de muitas proteínas envolvidas no processamento antigênico incluindo TAP (transportador associado ao processamento antigênico)

O IFN- γ também é um ativador do endotélio vascular e de muitas das ações do TNF nas células endoteliais, promovendo a adesão linfocitária e extravasamento nos locais de infecção.

Em modelos experimentais, o aumento de MHC classe I nas células tumorais pela inoculação de citocinas como IFN- γ ou pela transfecção gênica leva ao aumento da lise tumoral por linfócitos T citotóxicos *in vitro* e diminui a tumoricidade *in vivo*.

Estes mecanismos são adaptações do tumor em resposta a pressões seletivas da imunidade do hospedeiro, e que podem permitir que o tumor evada as respostas imunes. A ausência de IFN- γ nas células tumorais da linhagem A é acompanhado pelo crescimento do tumor. Na variante *Ar* a expressão aumentada de IFN- γ está relacionada à expressão do TNF- α e pode ser explicado pelo infiltrado. Além disso, Kubin e colaboradores (1994) demonstraram que, diferentemente de células normais, em células transformadas a expressão de citocinas Th1 é modulada de forma independente, ou seja, a expressão elevada de IL-12 na variante A não é um sinal suficiente para estimular a produção de IFN- γ .

Corroborando a importância da imunomodulação da resposta imunológica do hospedeiro frente à instalação do tumor, nossos resultados demonstraram a expressão de Fas nas células tumorais da linhagem *Ar*. A análise morfológica do grupo *Ar* revelou presença de infiltrado linfocitário externo, o sinal detectado parece ser oriundo destas células.

Em adição, a ausência de expressão de Fas-L nas células tumorais do grupo A sugere, que neste modelo a imunogenicidade se dá outros mecanismos, portanto, sem a necessidade de indução da apoptose em células do sistema imune, já que a expressão do Fas-L poderia permitir o “contra-ataque” das células tumorais.

Schanoscki e colaboradores (2004) demonstraram que a variante *Ar* do tumor de Waker 256 expressa número maior de células MHC classe I positivo, levando a ativação de linfócitos T citotóxicos, os quais expressam Fas, o que em associação a expressão de IFN- γ e TNF- α , poderiam estar relacionados a estruturação de uma resposta imunológica competente contra esta variante, mecanismo este responsável por sua característica regressão.

Corroborando esta hipótese, a expressão de Bcl-2 no grupo inoculado com a variante agressiva A evidencia um aumento progressivo, desta proteína anti-apoptótica a partir do 7 dias após inoculação em células tumorais e expressão elevada em células esplênicas. Ao contrário, tanto as células tumorais como as esplênicas do grupo inoculado com a variante Ar não expressaram Bcl-2 no 11º dpi, sugerindo a necessidade de repressão deste gene para a efetividade da resposta imunológica do hospedeiro contra o tumor.

6- CONCLUSÃO

- 1- A expressão de RNAm de IFN- γ neste modelo tumoral está relacionada ao prognóstico, visto que na variante *Ar*, ou regressiva, há expressão desta citocina e, na variante *A*, ou agressiva, a qual não apresenta regressão não há expressão da mesma.
- 2- A IL-12 pode ser produzido constitutivamente pelo tumor de Walker 256, já que não foi observada a presença células inflamatórias que justificassem sua presença.
- 3- O principal mecanismos de imunogenicidade da variante *Ar* é a expressão de Fas-L, que pode ocasionar a apoptose de linfócitos ativados.
- 4- A expressão de TGF- β aumentada na variante *A*, sugere a participação desta citocina na imunossupressão.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad M; Rees RC; Ali SA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/ progression. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 844-854.

Baillie P, Millar FK, Pratt AW. Food intake and Walker tumor growth in rats with hypothalamic lesions. *American Journal of Physiology* 1965; 200:293-300.

Belardelli F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS* 1995; 103: 161-79.

Benitez-Verguizas J, Loarte D, de Miguel F, Esbrit P. Effects of transforming growth factor beta1 on cell growth and parathyroid hormone-related protein in Walker 256 tumor cells. *Life Sci* 1999; 65(17): 1807-16.

Beverley P. Imunologia do Câncer. In: Franks LM & Teich N. *Introdução a biologia molecular do câncer*. 1ª de., São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1990. c.15, p.311-333.

Blackburn GL, Maini BS, Bistrian BR, McDermott WV Jr. The effect of cancer on nitrogen, electrolyte, and mineral metabolism. *Cancer Res* 1977; 37(7 Pt 2):2348-53.

Buinauskas P, Brown ER, Cole WH. Antigenic behavior of Walker 256 tumor in Sprague-Dawley rats. *Surgery* 1966; 60(4): 902-907.

Butt AJ; Firth SM; Baxter RC. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol.* 1999;77:256-262.

Castello G, Esposito G, Stellato G, Dalla Mora L, Abate G, Germano A. Immunological abnormalities in patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1986; 25(1):61-4.

Chakravarty, D., Green, A.R., Green, V.L., Kerin, M.J., & Speiers, V. Expression and secretion of TGF- β isoforms and expression of TGF- β receptors I,II and III in normal and neoplastic human breast. (1999) *Int J. Oncol.* 15, 187-194.

Chen, S. et al. Absence of CD83⁺ mature and activated dendritic cells at cancer nodules from patients with hepatocellular carcinoma: relevance to hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 2000 148: 49-57.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-9.

Cohen PR, Kurzrock R. Mucocutaneous paraneoplastic syndromes. *Semin Oncol* 1997; 24(3): 334-59.

Connell J. Fas ligand and the fate of antitumor cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 2002; 105:263:266.

Crosby WH. The spleen. In Wintrobe MM(ed): *Blood, Pure and Eloquent*. New York, McGraw-Hill Book Company 1980; 96.

Cui, W., et al. (1996). TGF-beta 1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progresión to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell*. 86:531-542.

Cui, W., et al. (1996). TGF-beta 1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progresión to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell*. 86:531-542.

Daice JV, Lewis SM, Gordon-Smith EC (1984). Investigation of hereditary haemolytic anaemias. In: Daice JV, Lewis SM (Editors), *Pratical Hematology*. 6th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Datto MB; Kowalik TF; Yingling J; Wang XF. The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor β mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol* 1997; 17:2030-2037.

Derynck, R., Akhurst J.R & Balmain, A. TGF- β in tumor progression and cancer progression. *Nature genetics* 29:117-129.

Derynck, R., Akhurst, R.J.,m & Balmain, A.(2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*. 29:117-129.

Dinh BL & Brassard A. Renal lesions associated with the Walker 256 adenocarcinoma in the rat. *British Journal of Experimental Pathology* 1968; 49: 145-151.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunol* 3:991-998, 2002.

Eastern Cooperative Oncology Group. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. *Am J Med* 1980; 69:491-496.

Eichner ER. Splenic function: Normal, too much and too little. *Am J Med* 1979; 66:311.

Farrar JD, Katz KH, Windsor J, Thrush G, Scheuermann RH, Uhr JW, Street NE. Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state. *J Immunol* 1999; 162(5): 2842-9.

Ferguson TA, Griffith TS. Cell death and the immune response: a lesson from the privileged. *J Clin Immunol*. 1997; 17:1-10.

Fynan TM; Reiss M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming factor β and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 1993; 4: 493-540.

Frucht DM et al. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol*. 2001; 22: 556-60.

Garattini S, Bizzi A, Donelli MG, Guaitani A, Samanin R, Spreafico F. Anorexia and cancer in animals and man. *Cancer Treat Rev* 1980; 7(3): 115-39.

Garzetti GG, Cignitti M, Marchegiani F, Ciavattini A, Tranquilli AL, Fabris N, Romanini C. Studies on tumor antigens of the Walker 256 carcinosarcoma. *Immunochemistry* 1975; 12(6-7): 589-95.

Geiser AG, Letterio JJ, Kulkarni AB, Karlson S, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) controls expression of major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF-beta 1 null mouse phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9944-9948, 1993.

Gessani S. Belardelli F. IFN- γ expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998; 9: 117-123.

Ghobrial IM; Witzig TE; . Adjei AA. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:178-184.

Giacontti FG; Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999; 285:1028-1032.

Gorelik L & Flavell RA.(2001)Immune-mediated eradication of tumors through the blockage of transforming growth factor- β signaling in T cells. *Nature Medicine* 7(10): 1118-22.

Graf W, Glimelius B, Pahlman L, Bergstrom R. Determinants of prognosis in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27(9): 1119-23.

Granucci F et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene-expression análisis. *Nat Immunol* 2001; 2: 882-88.

Gross A; McDonnell JM; Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999; 13:1899-1911.

Guaitani A, Recchia M, Carli M, Rocchetti M, Bartosek I, Garattini S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. *Oncology* 1982; 39(3): 173-8.

Guimarães F, Costa PM, Cavalcanti TC, Zollner RL. Resposta imune humoral em ratas portadoras do tumor de Walker 256 X. Reunião anual da federação de sociedades de biologia experimental 1995, Serra Negra. Livro de Resumos. Serra Negra, FESEB, 1995. p414.

Guimarães F, Rettori O, Vieira-Matos AN, Fernandes GA. The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(3): 309-17.

Hannon GJ & Beach D. P15^{INK48} is a potencial effector of TGF-beta induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-261.

Heberman RB. Tumor immunology. *JAMA* 1992; 268(20): 2935-2939.

Hegartner MO. The biochemistry of apoptosis [comment]. *Nature* 2000; 407: 770-776.

Heike M, Schlaak J, Schulze-Bergkamen H, Heyl S, Herr W, Schmitt U, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH. Specificities and functions of CD4+ HLA class II-restricted T cell clones against a human sarcoma: evidence for several recognized antigens. *J Immunol* 1996; 156(6): 2205-13.

Hockenbery D, Nunez G, Millman C. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 348: 334-336.

Hockenbery D, Nunez G; Millman C; Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-336.

Irie S, Li Y, Kanki H. Identification of two Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) promoters in human cancer cells. *DNA Seq* 2001; 11:519-526.

Ishizaki Y; Cheng L; Mudge AW; Raff MC. Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol Biol Cell*.1995; 1443-1458.

Jhappan, C., et al. (1993). Targeting expression of a transforming growth factor beta 1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *EMBO J*. 12: 1835-1845.

Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the millennium. *Trends Cell Biol* 2001; 11:526-534.

Kerr JF; Wyllie AH; Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 2000;26:239-257.

Kerr JFR, Winterford CM; Harmon BV. Apoptosis-its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2026.[Published erratum appears in *Cancer* (1994)73, 3108.

Klein J. Defense against tumors. In: *Immunology*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1991. c.20, p.419-428.

- Kormeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995; 11: 101-105.
- Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407: 789-795.
- Krueger A, Baumann S, Krammer PH. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; 21:8247-8254.
- Kubin M, Chow JM, Trinchieri G. Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor α and il-1 β production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 83:1847-1855, 1994.
- Lang F, Busch GL, Völkl H, Häussinger D. Cell volume: a second message in regulation of cellular function. *News in Physiological Sciences* 1995; 10:18-22.
- Le Bon A, et al. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells *in vivo*. *Immunity* 2001; 14: 461-70.
- Li J-H, Rosen D, Sondel P, Berke G. Immune privilege and Fas-L: two ways to inactivate effector CTLs by FasL: -expressing cells. *Immunology* 2002; 103:267-77.
- Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21:485-495.
- Lotem J; Sacks L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemias by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia* 1996; 10:925-931.
- Luo L. The anti-tumor efficacy of natural killer (NK) cells and interleukin 2 against experimental pulmonary metastasis in rats. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 1991; 13(4): 283-7.
- Lynch D H. Ramsdell F, Alderson MR. Fas and Fas L in the homeostatic regulation in immune responses. *Immunology Today*; 16:569-74.
- McDonnell TJ; Deane N; Platt FM; Nunez G; Jaeger U; Mckearn JP; Korsmeyer SJ. Bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; 57:79-88.

Manara HRC, Andrade JM, Silva JS. Natural killer cells and interleukin-12 in patients with advanced cervical cancer under neoadjuvant chemotherapy. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 473-477.

Markowitz S; Wang J; Meyroff L; Parsons R; Sun L; Lutterbaugh; Fan R; Zborowska E; Kinzler K; Vogelstein B et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-1338.

Massague, J.(1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-791.

McCarthy DO, Daun JM. The effects of cyclooxygenase inhibitors on tumor-induced anorexia in rats. *Cancer* 1993; 71(2): 486-92.

Melief CJ. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res* 1992; 58: 143-75.

Meyers RL. Studies on tumor antigens of the Walker 256 carcinosarcoma. *Immunochemistry* 1975; 12(6-7): 589-95.

Morrison SD. Water intake and exchange and hydration of rats during growth of Walker 256 carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1971; 46(4): 825-30.

Mota NGS & Reskallah-Iwasso MT. Contribuição ao estudo da imunidade humoral e celular em ratos com carcino-sarcoma 256 de Walker. *Revista de Ciências Biomédicas* 1981; 2: 55-60.

Moses HL; Yang EY; Pietenpol JA. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 1990; 63: 245-247.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997; 88:355-365

Oft, M., Heider, K.H., and Beug, H. 1998. TGF beta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr. Biol.* 8:1243-1252.

Pan G, O' Rourke K, Chinnaiyan AM. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997; 276:111-113.

Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(5): 588-94.

Parlato, S. et al. Expresión of CCR-7, MIP-3 β and TH1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* 2001; 98: 3022-29.

Pasqualetti P, Casale R, Collacciani A, Colantonio D. Prognostic factors in multiple myeloma: a new staging system based on clinical and morphological features. *Eur J Cancer* 1991; 27(9): 1123-6.

Pereira OCM & Gustale HA. A sobrevivência de ratos com tumor de Walker 256 submetidos previamente à imunogenicidade das células tumorais. *Revista de Ciências Biomédicas* 1992; 2: 55-60.

Pierce, D.F., et al. 1993. Inhibition of mammary duct development but not alveolar outgrowth during pregnancy in transgenic mice expressing active TGF- β 1. *Genes Dev.* 7:2308-2317.

Pierce, D.F., Jr., et al. (1995). Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4254-4258.

Reed RC. Bcl-2 and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.

Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997; 34: 9-19.

Rettori O, Vieira-Matos AN, Tahin QS. Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by Walker 256 tumor progression in rats. *Tumori* 1995; 81(5): 370-7.

Rustgi VK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1987; 16(4): 545-51.

Santini SM; Lapenta C; Logozzi S; Parlato S; Spada m; Di Pucchio T; Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 2000; 191:1777-88.

Santini SM & Belardelli F. Advances in the use of dendritic cells and new adjuvants for the development of therapeutic vaccines. *Stem cells* 2003; 21: 495-505.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A. Two CD95 antigen mutations in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 835-846.

Schanoschi AS; Cavalcanti TC; campos CB; Vieira Matos AN; Rettori O; Guimarães F. Walker 256 tumor MHC class I expression during the shift from A to the immunogenic AR variant. *Cancer Lett.* 2004 Jul 28; 211(1):119-27.

Schutte M; Hruban R; Hedrick L; Cho K; Nadasdy G; Weinstein C; Bova G; Isaacs W; Cairns P; Nawroz H; et al DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 1996; 56:2527-2530.

Scorrano L, Korsmeyer S. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304:437-444.

Scott OC. Tumor transplantation and tumor immunity: a personal view. *Cancer Res* 1991; 51(3): 757-63.

Shrikant P, Mescher MF. Control of syngeneic tumor growth by activation of CD8+ T cells: efficacy is limited by migration away from the site and induction of nonresponsiveness. *J Immunol* 1999; 162(5): 2858-66.

Shuster N & Kriegstein K. (2002) Mechanisms of TGF- β mediated apoptosis. *Cell tissue Res* 307:1-14.

Simpkins H, Lehman JM, Mazurkiewicz JE, Davis B. A morphological and Phenotypic analysis of Walker 256 cells. *Can Res* 1991; 51(15): 1334-38.

Smyth M J et al. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2: 293-299.

Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, Bachmann MF, McKall-Faienza K, Odermatt B, Hanahan D, Zinkernagel RM, Ohashi PS. Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 1997; 186(5): 645-53.

Spivak JL. Cancer-related anemia: its causes and characteristics. *Semin Oncol* 1994; 21(2 Suppl 3): 3-8.

Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(3): 1178-83.

Stewart H L, Snell KC, Dunham LJ, Schlyen SM. Atlas of Tumor Pathology Sect. XII, Fasc. 40, 216-71. Washington, DC: Air Force Institute of Pathology, 1959.

Strasser A; Harrys AW; Bath ML; Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and Bcl-2. *Nature* 1990; 338:331-333.

Tacaks FJ. Fluid and electrolyte problems in patients with advanced carcinoma. *Medical Clinics of North America* 1974; 59:449-457.

Tayek JA, Brasel JA. Effects of tumor necrosis factor alpha on skeletal muscle and Walker 256 carcinosarcoma protein metabolism studied in vivo. *Cancer Res* 1990; 50(9): 2765-8.

Tessitore L, Costelli P, Baccino FM. Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats. *Br J Cancer* 1993; 67(1): 15-23.

Testa U. Apoptotic mechanism in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 18:1176-1199, 2004.

Thornberry NA, Lazebnick Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.

Toal JN, Millar FK, Brooks RH, White J. Sodium retention by rats bearing the Walker carcinosarcoma 256. *American Journal Physiology* 1961; 200:175-181.

Topalian SL. MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(5): 741-5.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of bcl-2 gene in follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440-1443.

Tsujimoto Y; Finger LR; Yunis J, Nowell PC; Croce CM. Cloning the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with t(14,18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097-1099.

Tzzy-Choou WU. Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer. *Current Opinion in Immunology* 1994; 6: 746-754.

van Roozendaal, C.E. et al.(1995)Transforming growth factor β secretion from primary breast cancer fibroblasts. *Mol Cell. Endocrinol.* 111, 1-6.

Vaux DL; Cory S; Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre B cells. *Nature* 1988; 335:440-442.

Vidal, B.C., MELLO, M.L.S. 1978. A reação de Feulgen. *Ciência e Cultura.* 30 (6): 665-676.

Vido AA, Cavalcanti TC, Guimarães F, Vieira-Matos AN, Rettori O. The hemolytic component of cancer anemia: effects of osmotic and metabolic stress on the erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33(7): 815-22.

Vierboom MP, Nijman HW, Offringa R, van der Voort EI, van Hall T, van den Broek L, Fleuren GJ, Kenemans P, Kast WM, Melief CJ. Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 186(5): 695-704.

Waki Y, Nomura M, Kasugai S, Ohya K, Miyamoto K. Walker 256/S carcinosarcoma causes osteoporosis-like changes through ectopical secretion of luteinizing hormone-releasing hormone. *Cancer Res* 1999; 59(6): 1219-24.

Wan JM, Bistrian BR, Figoni MA, Istfan NW. Influence of interleukin-2 infusion on cell cycle kinetics in the Walker-256 carcinosarcoma. *J Leukoc Biol* 1994; 55(2): 241-7.

Ye SL, Tang ZY, Bistrian BR. Influences of tumor necrosis factor-alpha on protein metabolism and cell-cycle kinetics in malignant tumor *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1994; 16(5): 349-52.

Zacks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, Restifo NP. Fas mediated suicide of tumor reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 1999; 162:3273-9.

Zapata JM, Pawlowski K, Hass E. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem*. 2001; 276:24242-24252.

Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296: 1635-1636.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 91: 323-330.

Whiteside T & Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2004; 53:240-248.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251-306.

8- ANEXO

Cytokine gene expression in Walker 256: A comparison of variants *A* (aggressive) and *AR* (regressive)

Ana Paula De Almeida Salles Perroud ^a, Rika Ashimine ^a, Glaucia Monteiro De Castro ^a,
Fernando Guimarães ^b, Karla Priscila Vieira ^a, Conceição Aparecida Vilella ^a,
Tereza Cristina Samico Cavalcanti ^b, Ricardo De Lima Zollner ^{a,*}

^a Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, PO Box 6111, Campinas/SP 13083-887, Brazil

^b Laboratório Clínico Especializado, CAISM, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Received 6 September 2005; received in revised form 27 October 2006; accepted 2 November 2006

Abstract

Two variants of this Walker 256 tumor have been previously reported as Walker 256 *A* and variant *AR*. The variant *A* has more aggressive property than variant *AR* and can induce systemic effects such as anorexia, sodium and water retention, followed by weight loss and death. The mechanisms involved in enhancing tumor regression and progression in this model are still incompletely understood. In the present study, serum and spleen mononuclear cells and tumor cells from animals inoculated with variants *A* and *AR*, were isolated to investigate the TGF- β , IL-12, IFN- γ and TNF- α and relationship with anemia, weight of animals, weight of spleen, volume of tumor and osmotic fragility compared with controls inoculated with Ringer Lactate. Results demonstrate that the group inoculated with variant *A*, compared to variant *AR*, shows high levels of TGF- β gene expression in both tumor tissue and spleen cells, no expression of IFN- γ and a progressive and higher levels of IL-12 in tumor tissue without inflammatory infiltrate visualized by optical microscopy. These results suggest that the aggressiveness of variant *A* is related to cytokine modulation, facilitating the growth and escape of tumor cells. Furthermore, IL-12 seems to be constitutively expressed in both tumor lineage *A* and *AR*.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Walker 256; Cytokines; Immunomodulation

1. Introduction

The Walker 256 tumor is widely utilized in experimental cancer research, due to its ease of transplantation, lack of regression or strain specificity, rarity of spontaneous metastases, and its successful transposition to tissue culture [1].

There are two variants of W256, as described by Rettori: *A* and *AR* [2]. The regressive lineage *AR* was obtained after serial passages of W256 *A* tumor cells in the intraperitoneal cavity of rats. The W256 *AR* induces marked splenomegaly

and a significant increase in red blood cell fragility in the host; regression occurs in 60–80% in subjects after single inoculation 5×10^6 cells [2], followed by the development of immunity against both *A* and *AR* variants when the latter is injected subcutaneously [3,4]. The molecular basis for the increase in immunogenicity remains unknown.

Host resistance against tumors comprises two major systems: the innate and adaptive responses. The interactions between these two branches of host defence are regulated by cells of the immune system and soluble factors, including cytokines [5]. Cytokines are the major mediators of host defence, since they regulate communication between antigen-presenting cells (APCs), lymphocytes and other host cells in the course of an immune response. The cytokine repertoire present at the tumor site determines the

* Corresponding author. Fax: +55 19 35218021.

E-mail address: zollner@unicamp.br (R. De Lima Zollner).

type of host response directed against the tumor [6]. Thus, immunosuppressive cytokines secreted by tumor cells can impair the host tumor response, whereas cytokines promoting the development of T cell mediated immunity can induce or enhance antitumor immunity [7].

The main goal of the present study was to investigate the gene expressions of interleukin-12 (IL-12), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor- β (TGF- β) in spleen cells, tumor cells and in serum from animals inoculated with variants *A* and *AR* of Walker 256 and observe whether there were any differences in cytokine expression between the lineages. In addition, these expressions were correlated with the weights of the animals and spleen, volume of tumor, anemia and red blood osmotic fragility.

2. Materials and methods

2.1. Animals, inoculation and assessment of clinical signs

Forty-five of 8–12 weeks old male Wistar rats obtained from CEMIB were maintained in the Laboratório Clínico Especializado, CAISM, UNICAMP. Rats were fed standard chow and had access to water *ad libitum* and randomly divided for experiments (tumor *A* and *AR*) and controls (inoculated with 0.5 ml Ringer Lactate-*RL*) with 15 animals/group. The animals were examined daily for weight. At the site of inoculation, the tumor implants were analyzed for length, weight, and depth, which were measured with calipers for determination of tumor volume.

The tumoral growth was esteemed by measurements of width (*W*, cm), length (*L*, cm), and depth (*D*, cm) given the tumor volume (cm^3) according to the equation for a prolate spheroid, as previously described. [8].

$$\text{Tumor volume} = (\pi/6)WLD$$

Under sodium pentobarbital (50 mg/kg) anesthesia, before tumor inoculation, A blood sample (0.7 ml) was collected from the suborbital plexus into 0.05 ml heparin (5000 IU/ml). The rats were sacrificed on days 4, 7 and 11 after inoculation (5 rats/day/experiment). At sacrifice, the thorax was opened and a 5 ml blood sample was collected into 0.3 ml of heparin, via direct heart puncture with an 18 G needle. All blood samples were used for hemoglobins level and for osmolarity fragility (OF) determinations.

2.2. Inoculation of tumor cells

The tumor injection was performed following the protocol previously described by Rettori [2]. The A lineage of W256 was kindly gifted by Dr Fernando Guimarães, Laboratório Clínico Especializado, CAISM, UNICAMP. The tumor cells were inoculated by intraperitoneal (ip) passages in rats. After at least three consecutive ip passages, tumor cells with 98% viability (assessed by Trypan blue method) were obtained from the ascitic fluid. Viable cells were inoculated by subcutaneous via (sc) at four sites in the dorso-

lumbar region. Tumor bearing rats received four dorsal inoculations of 5×10^6 tumor cells diluted in 0.25 mL of Ringer-lactate spaced at least 1 cm apart. Fifteen rats receiving four identical inoculations of Ringer Lactate (*RL*) formed the control group. Five rats from each group were sacrificed on days 4, 7 and 11 after inoculation. To avoid of necrosis area the centre of tumor mass, as a result of the four inoculations, were collected, weighed, and frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis.

After death, autopsies were performed and the presence of possible metastases or other macroscopic abnormalities capable of interfering with the results was recorded. Procedures involving animals and their care were conducted in conformation with international laws and policies.

2.3. Osmotic fragility (OF)

Blood samples were collected from rats just before tumor injection (day 0) and again on days 4, 7 and 11.

OF was measured following the collection of 400 μl blood sample diluted in 40 μl heparin, harvested by needle aspiration from rats. Red blood cells (RBC) obtained from rats (10 μl) were diluted in 1000 μl distilled water with NaCl concentrations of 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 and 5.0 (g/L), respectively; cells were centrifuged, rested for 15 min, centrifuged; and packed for 5 min. The red blood cells obtained were centrifuged at 978g for 2 min. Osmotic fragility was determined by a spectrophotometer. To facilitate data analysis, the median corpuscular fragility (MCF) was often used. MCF was defined as the NaCl concentration (g/L) causing 50% of RBC lysis [9,10].

2.4. Spleen cell isolation

Spleen cells from groups were sieved through a stainless-steel mesh screen (Sigma, San Diego, CA, USA) and washed three times in Hank's balanced salt solution (Sigma). The samples of spleen cells were snap-frozen in guanidium-sarcosyl and stored at -80°C until analysis [11–13].

2.5. Tissue specimens

The animals were sacrificed on the seventh and 11th days after tumor cells inoculation. The tumor was removed for morphological analysis. The cryostat sections, with 5 μm thickness, were obtained by consecutive series with three sections on different slides, after disposal of 10 sections among series. The histological sections were stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy (Zeiss, Axioscop, Jena, Germany).

2.6. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for cytokine expression

Total cellular RNA was isolated by a modified protocol of acid guanidium thiocyanate/phenol/chloroform extraction [14,15]. RNA was first reverse transcribed into cDNA

(Superscript™II, Gibco). PCR amplification was performed in a total volume of 50 µl containing 2 µl cDNA, 200 ng of each primer (Table 1), 500 µM dNTP (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) and 1 U Taq polymerase (Life Technologies) in a buffer supplied by the polymerase manufacturer. Optimum PCR conditions were determined for each set of primers as follows: IL-2, 40 cycles (60 °C for 50 s, 72 °C for 90 s, 95 °C for 45 s); IFN-γ, IL-10 and TGF-β, 40 cycles (58 °C for 45 s, 72 °C for 90 s, 95 °C for 45 s); TNF-α, 40 cycles (57 °C 50 s, 72 °C for 90 s, 95 °C for 45 s). Sample contamination by genomic DNA was verified by submitting the RNA sample to PCR amplification omitting the RT step. The PCR products were submitted to 1.5% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide and digitally recorded using Nucleovision® system (Nucleo Tech, San Mateo, CA, USA). The product size and band pixel area of PCR products were calculated using the gel Expert® Software (Nucleo Tech). The Semiquantitative Expression (SE) of cytokines was calculated for each sample using the following formula and expressed as arbitrary units (AU): SE = pixel area of product to be analyzed/pixel area cyclophilin × 100 (Table 2).

2.7. IFN-γ and TGF-β profile

Sera from rats (*A*, *AR* and *RL*) were collected at 4, 7 and 11th day from cell tumor inoculation for the measurement of IFN-γ and TGF-β. Cytokine contents were evaluated by capture ELISA as recommended by the manufacture (CytoSet™, Biosource, USA). The sensitive ranges for the ELISA were 21.8–1400.00 pg/ml for IFN-γ; 15.6–4000 pg/ml for TGF-β.

2.8. Statistical analysis

Results are represented by a Mean ± SEM. Statistical differences among *A*; *AR* variants and *RL* were determined by nonparametric ANOVA complemented with Dunn's post-test. Values of $p < 0.05$ were considered as indicative of significance.

3. Results

3.1. Autopsies

The rats inoculated with tumor cells on 10th day after inoculation had reduction of adipose tissue. Under macroscopic view, there was not evidence of tumor growth outside from local inoculation or tissue bleeding that justified the anemia.

3.2. Animals and spleen weight

All groups showed increased weights, no statistical significance was observed between them. The mean body weights were 256.0 ± 47.0 ; 270.0 ± 45.0 ; 265.0 ± 54.0 and 282.0 ± 70.0 g in rats of group *A*; 248.0 ± 42.0 ;

Table 1
Weight of rats with Walker 256 tumor lineage *A* (*A*) and *AR* (*AR*) inoculations and Ringer Lactate (*RL*) on days 0–11 after inoculation

	Days after inoculation											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>A</i>	255.9 ± 46.9	259.1 ± 44.6	264.5 ± 47.0	267.7 ± 44.6	269.3 ± 45.2	261.5 ± 59.0	264.0 ± 53.1	264.6 ± 53.7	272.0 ± 58.9	273.8 ± 60.5	278.0 ± 64.2	281.5 ± 69.9
<i>AR</i>	248.2 ± 41.6	252.9 ± 34.6	252.4 ± 37.7	264.0 ± 38.2	267.5 ± 37.6	268.0 ± 43.2	271.8 ± 45.6	274.9 ± 45.3	283.8 ± 53.1	282.8 ± 58.9	278.0 ± 67.3	290.5 ± 56.4
<i>RL</i>	237.2 ± 46.4	237.8 ± 46.7	244.9 ± 48.6	244.9 ± 47.5	247.9 ± 47.9	250.3 ± 59.4	255.3 ± 57.3	256.5 ± 56.5	256.5 ± 19.8	263.0 ± 21.0	268.8 ± 22.9	272.5 ± 23.0

All groups demonstrated increased mean weight, no difference was observed between groups. The weights were expressed by means ± SEM.

Table 2

Spleen weights of rats inoculated with Walker 256 tumor lineages *A* (*A*) and *AR* (*AR*) inoculations or Ringer Lactate (*RL*) on days 4, 7 and 11 after inoculation

	Days after inoculation		
	4	7	11
<i>A</i>	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.5
<i>AR</i>	1.3 ± 0.05	1.8 ± 0.1	3.1 ± 0.1
<i>RL</i>	0.76 ± 0.1	1.2 ± 0.09	1.0 ± 0.2

A significant increase in mean spleen weight was observed on day 11 in animals inoculated with lineage *AR*. The spleen weight /animal weight (*B*) values are means ± SEM. **p* < 0.05 were considered as indicative of significance.

268.0 ± 37.0; 275.0 ± 45.0 and 291.5 ± 56.0 g in rats of group *AR*; 237.2 ± 46.4; 247.9 ± 47.9; 256.5 ± 56.5 and 272.5 ± 23.0 g in rats of group *RL* on days 0, 4, 7 and 11 after inoculation, respectively (Table 1).

A significant increase in spleen weight was observed on day 11 in animals inoculated with lineage *AR* compared with the other groups (*p* < 0.05) (Table 3). The spleen weights were 0.5 ± 0.02, 0.7 ± 0.08 and 0.58 ± 0.09 g in rats of group *A*; 0.5 ± 0.05; 0.86 ± 0.23 and 1.41 ± 0.34 g in rats of group *AR* and 0.3 ± 0.04; 0.45 ± 0.01 and 0.38 ± 0.09 g in group *RL* on days 4, 7 and 11 after inoculation, respectively. In lineage *A*, the weight ratio between spleen and animal were 0.5, 0.7 and 0.58; 0.5, 0.86 and 1.41 in variant *AR* and 0.3, 0.45 and 0.38 in group *RL*.

Table 3

Primers used for RT-PCR

Primer	Sense	Anti-sense	BP
TNF- α	5' GTGCCTCAGCCTCTTCTCATTC 3'	5' GCTCCTCCGCTTGGTGGTTT 5'	218
INF- γ	5' GTTTTGACAGCTCTGCCTCATGGCCCTCT 3'	5' CAGCACCGACTCCTTTTCCGCTTCCTTA 3'	446
IL-12	5' GATGTTTATGTTGTAGAGGTGGACTGGC 3'	5' TTCCTTCTGTGGAGCAGCAGATGTGAG 3'	240
TGF- β	5' CCGCAACAACGCAATCTATG 3'	5' GCCCTGTATTCGGTCTCCTT 3'	304
Cyclophilin	5' GACAGCAGAAAACCTTCGTGC 3'	5' GGTTCTGACTCACCAGACC T 3'	276

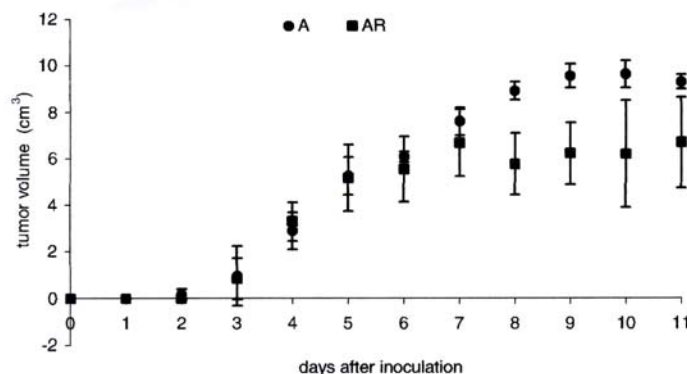


Fig. 1. Tumor volume as function of time. Points (±) are experimental measurements. An increase in tumor volume of lineage *A* was seen up to day 10 and in rats inoculated with the lineage *AR*, a decreased volume was seen on day 8. There is no significant difference between lineages. Data represent two separate experiments. **p* < 0.05 were considered as indicative of significance.

3.3. Tumor development

All tumor cell inoculations grew continuously to a palpable mass within 2–3 days. The tumor volumes were 3.28 ± 0.83; 6.69 ± 1.45; 6.71.0 ± 1.96 cm³. The weights were 3.3 ± 1.0; 7.9 ± 0.9; 9.12 ± 0.2 g, respectively, on days 4, 7 and 11 after inoculation of group *A*.

The volumes were 2.89 ± 0.78; 7.62 ± 0.6; 9.32 ± 0.31 cm³ and the weight were 3.6 ± 1.0; 7.6 ± 0.9; 7.0 ± 3.6 g, respectively, on days 4, 7 and 11 after inoculation of group *AR*. The growth rate was 13.24% per day for variant *A* and 12.5% for *AR*. A summary of tumor volumes, derived from daily measurements of external dimensions, is shown in Fig. 1.

At day 10 after inoculation the four sites of tumor inoculation became to a single tumor mass that was adherent to the deep plans, with rarefied hair and friable mass.

3.4. Development of anemia

Fig. 2 shows the time course of the changes in haemoglobin (Hb) during the experiment. The Hb levels decreased rapidly in rats inoculated with tumor. A decrease in the Hb levels was observed independently of whether the group was inoculated with lineage *A* or *AR*; statistical significance was observed only in cells obtained from animals of group *A* on day 11 compared with the other groups (*p* < 0.05). The haemoglobin levels were 16.4 ± 0.7;

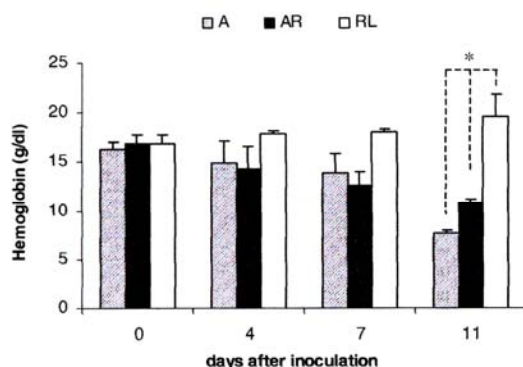


Fig. 2. Changes in hemoglobin levels of rats with Walker 256 tumor lineages *A* and *AR* inoculations and Ringer Lactate (*RL*) on days 0, 4, 7 and 11 after inoculation. A decrease in hemoglobin levels was observed independently of whether the group was inoculated with lineage *A* or *AR*; statistical significance was observed only for group *A* on day 11. Data represent three separate experiments. * $p < 0.05$ were considered as indicative of significance.

15.0 ± 2.1; 13.9 ± 2.1 and 7.8 ± 0.2 g/L in group *A* on days 0, 4, 7 and 11, respectively, in group *A* and in group *AR* levels were 16.9 ± 0.9; 14.4 ± 2.1; 12.7 ± 1.3 and 10.9 ± 0.3 g/L on days 0, 4, 7 and 11, respectively. The level of haemoglobin was lower on day 11 in group *A* ($p < 0.05$).

3.5. Osmotic fragility changes in fresh RBC

In rats inoculated with lineage *A*, the osmotic fragility curves for fresh RBC show a significant left shift ($p < 0.05$) (Fig. 3). The data are expressed as mean ± SEM of Na⁺ concentration (g/L) that causes 50% of erythrocytes lyses, for lineage *A* 4.4 ± 0.3, 3.7 ± 0.1, 3.8 ± 0.3 and 4.0 ± 0; lineage *AR* 4.1 ± 0.1, 3.9 ± 0.4, 4.2 ± 0 and 4.5 ± 0.4; *RL* 4.1 ± 0.3, 4.0 ± 0.3, 3.9 ± 0.1 and 3.9 ± 0.1 UA on day 0 and days 4, 7, 11 after inoculation, respectively. The changes are expressed as median corpuscular fragility (MCF), -0.54 ± 0.07, -0.38 ± 0.19 and -0.6 ± 0.03, on days 4, 7 and 11 after inoculation, respectively ($p < 0.05$ for all time points).

3.6. Histological analysis

The histological analysis of tumor tissue shows in rats inoculated with lineage *A* rare mononuclear inflammatory cells. In opposite, in lineage *AR* was found a inflammatory cells, represented by macrophage and neutrophils, surrounding the tumor stroma (Fig. 4).

3.7. Cytokine expression

In the tumor cells, the expression of IL-12 mRNA were 85.0 ± 11.0, 207.0 ± 90.0 and 573.0 ± 72.0 UA for group *A*; 197.0 ± 84.0, 294.0 ± 72.0 and 227.0 ± 70.0 UA for

group *AR* on days 4, 7 and 11, respectively, after inoculation. In contrast to the group inoculated with *AR* lineage, which had no variations, lineage *A* exhibited progressively increase of IL-12 mRNA levels. The comparison among groups shows a significant ($p < 0.05$) increase of IL-12 mRNA levels in the *AR* group on day 11 (Fig. 5A).

In the spleen cells, the expression of IL-12 mRNA was 147.5 ± 18.5, 129.0 ± 1.8 and 76.0 ± 6.2 UA for group *A*; 112.0 ± 7.4, 116.0 ± 27.8 and 104.0 ± 3.1 UA for group *AR*, and 95.0 ± 18.3, 139.0 ± 24.0 and 93.0 ± 11.0 UA for *AR* group *RL* on days 4, 7 and 11, respectively, after inoculation. The lineage *A* shows a progressive decrease of IL-12 levels of gene expression ($p < 0.05$). In contrast, the lineage *AR* exhibited an unchanged level of IL-12 mRNA (Fig. 5B).

In tumor cells, the IFN- γ mRNA was undetected in group *A*. However, in lineage *AR* the mRNA levels IFN- γ mRNA expression were progressively increased, 47.5 ± 30.2, 72.5 ± 10.0 and 226.5 ± 94.8 UA on days 4, 7 and 11, respectively, after inoculation, (Fig. 6A).

In spleen cells, the expression of IFN- γ mRNA was 7.3 ± 2.6, 81.0 ± 23.0, and 0 (undetectable) UA in group *A*; 0 (undetectable), 16.3 ± 5.4 and 0 (undetectable) UA in group *AR*, and 4.5 ± 2.6, 0 (undetectable) and 29.3 ± 2.2 UA in group *RL*, on days 4, 7 and 11, respectively, after inoculation. In opposite to tumor cells, the *A* group showed a significant increase of IFN- γ mRNA levels ($p < 0.05$) compared with spleen cells from the other groups (Fig. 6B).

In the tumor cells, the expression of TNF- α mRNA were 24.0 ± 2.4, 0, and 84.5 ± 3.0 UA for lineage *A*; 22.5 ± 9.5, 14.5 ± 7.4 and 46.0 ± 12.0 UA for lineage *AR* on days 4, 7 and 11, respectively, after inoculation. The lineage *A* tumor cells exhibited higher levels of TNF- α mRNA on day 11 after inoculation ($p < 0.05$) in comparison to lineage *AR* group (Fig. 7A).

In spleen cells, the expression of TNF- α mRNA was 27.5 ± 1.3, 14.5 ± 2.0, and 0 (undetectable) UA for group *A* on days 4, 7 and 11, respectively, after inoculation. However, the TNF- α mRNA was undetectable in spleen cells from *AR* and *RL* groups. Furthermore, the TNF- α gene expression in lineage *A* did not show statistical significance difference between the days 4 and 7 (Fig. 7B). The tumor TGF- β mRNA expression was 51.0 ± 22.0, 77.0 ± 26.0 and 42.5 ± 32.5 UA for group *A*; and 0, 123 ± 52.4 and 11.7 ± 6.5 UA for group *AR* on days 4, 7 and 11 after inoculation, respectively. The comparison among groups show that the levels of TGF- β mRNA of tumor cells in group *A* were higher on days 4 and 11 compared to *AR* ($p < 0.05$) (Fig. 8A).

The spleen cells TGF- β mRNA expression was 104.5 ± 38.4, 134.0 ± 33.6 and 84.0 ± 4.0 UA in group *A*; 111.0 ± 14, 61.5 ± 44.8 and 61.7 ± 1.7 UA in group *AR* and 73.7 ± 3.4, 111.0 ± 28.1 and 84 ± 6 UA, in group *RL* on days 4, 7 and 11 after inoculation, respectively. The comparison of TGF- β mRNA levels in spleen cells among the groups showed a significant lower level of gene

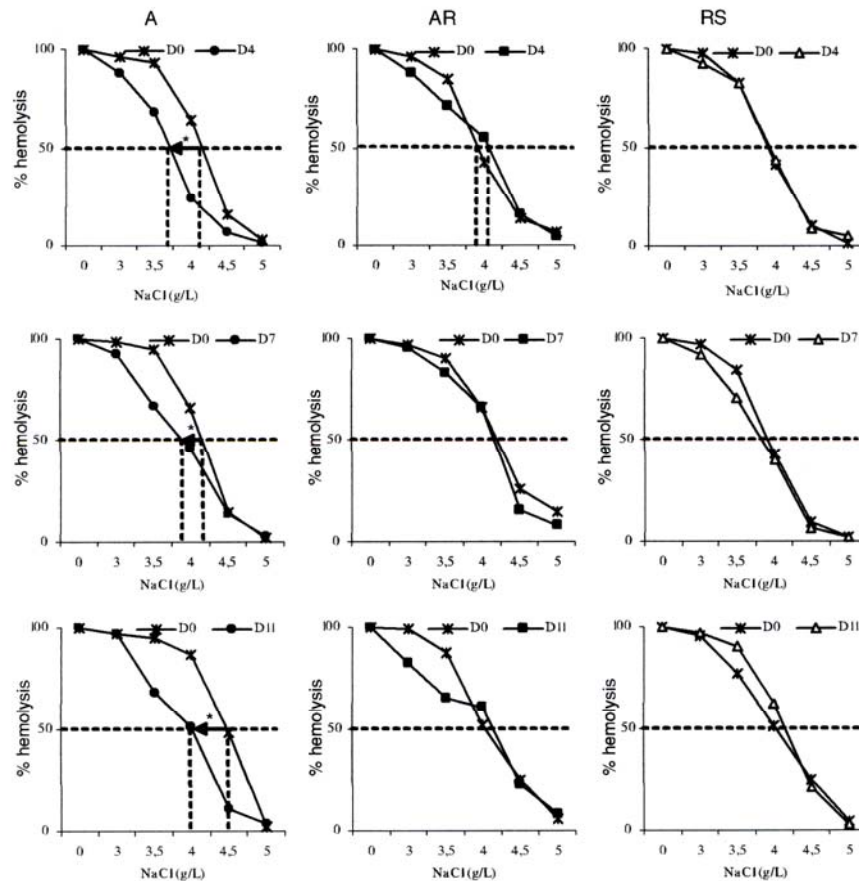


Fig. 3. Red blood cell osmotic fragility curves (A) demonstrating a significant shift to the left in rats inoculated with lineage *A*. Osmotic fragility was expressed by MCF (B). * $p < 0.05$ were considered as indicative of significance comparing day 0 with the animals sacrifice day.

expression at fourth day in *RL* group and at 11th in *AR* group (Fig. 8B).

3.8. $IFN-\gamma$ and $TGF-\beta$ profile

The $IFN-\gamma$ serum concentrations were 28.3 ± 9.46 , 10.3 ± 2.89 and 8.6 ± 1.91 pg/ml for group *A*; 27.4 ± 10.17 , 10.2 ± 2.96 and 10.83 ± 2.63 pg/ml for group *AR*; and 10.9 ± 5.72 , 13.4 ± 7.06 and 13.4 ± 1.16 pg/ml for group *RL* on days 4, 7 and 11, respectively, after inoculation. The comparison among the groups showed high $IFN-\gamma$ serum levels on day 4 for group *A* and *AR*. However, we did not observe any changes on subsequent days or for *RL* group. ($p < 0.05$) (Fig. 9A).

The $TGF-\beta$ serum concentration were 2024.73 ± 1313.9 , 1589.97 ± 1008.90 , and 53.08 ± 24.16 pg/ml for group *A*; 2539.15 ± 953.18 , 1571.59 ± 487.07 and 881.36 ± 162.66 pg/ml for group *AR*; 2901.58 ± 1084.39 , 2672.26 ± 845.62 and 1890.09 ± 951.92 pg/ml on days 4, 7 and 11,

respectively, after inoculation. The comparison of $TGF-\beta$ among lineages *A*, *AR* and *RL*, shows lower levels of $TGF-\beta$ on day 11 for group *A* ($p < 0.05$) (Fig. 9B).

4. Discussion

In the present investigation, we studied the cytokine expression pattern of the spleen cells and tumor cells of Walker 256 lineages *A* and *AR*, during three phases of tumor development said cancer immunoediting, represented as days 4, 7 and 11 after implantation. Cancer immunoediting encompasses three process: (a) elimination corresponds to immunesurveillance; (b) equilibrium represents the process by which the immune system iteratively selects and promotes the generation of tumor cells variants with increasing capacities to survive immune attack and (c) escape is characterized by the process wherein the immunologically sculpted expands in an uncontrolled manner in the immunocompetent host [14]. The evolution of clinical

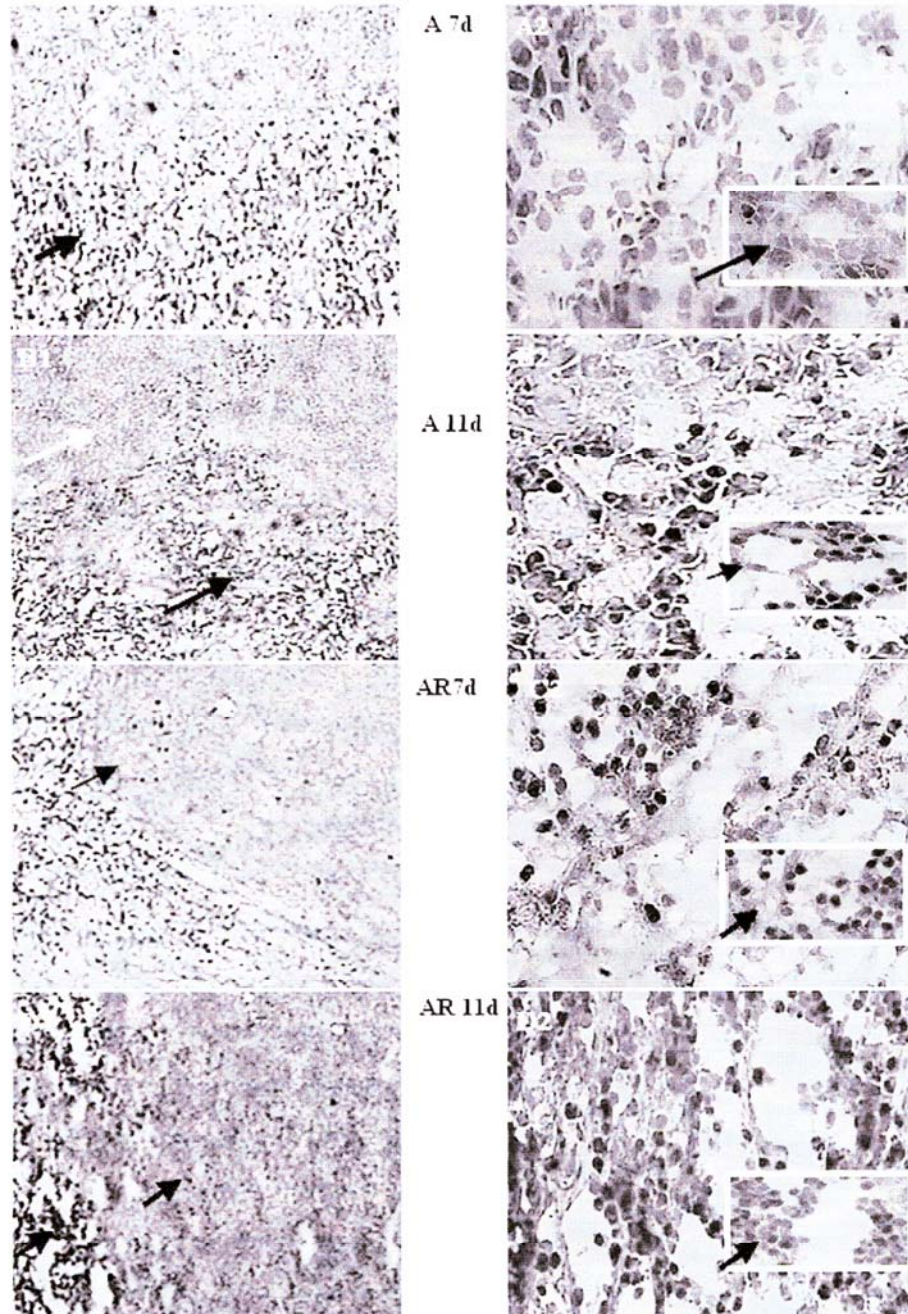


Fig. 4. Morphological aspects of Walker 256 tumor from Wistar rat inoculated with Lineage *A* and *AR* sacrificed on the 7th and 11th days. The histological sections from animals treated with lineage *A* are represented by figures A1 and A2 (day 7), B1 and B2 (day 11). Lineage *AR* represented by figures C1 and C2 (day 7), D1 and D2 (day 11). The figures (A1, B1, C1, D1) and the figures (A2, B2, C2, D2) correspond to the 200 $\times$ and 640 $\times$ magnification, respectively, from Hematoxylin/Eosin stained sections. Lineage *A* on day 7, the arrows point to the predominant tumor cells, collagen fibers and rare infiltrative inflammatory cells; on day 11, predominance of tumor cells without infiltrative inflammatory cells. Lineage *AR* on days 7 and 11, the arrows point to the predominance of tumor cells and peripheral infiltrative inflammatory cells (macrophages and neutrophils).

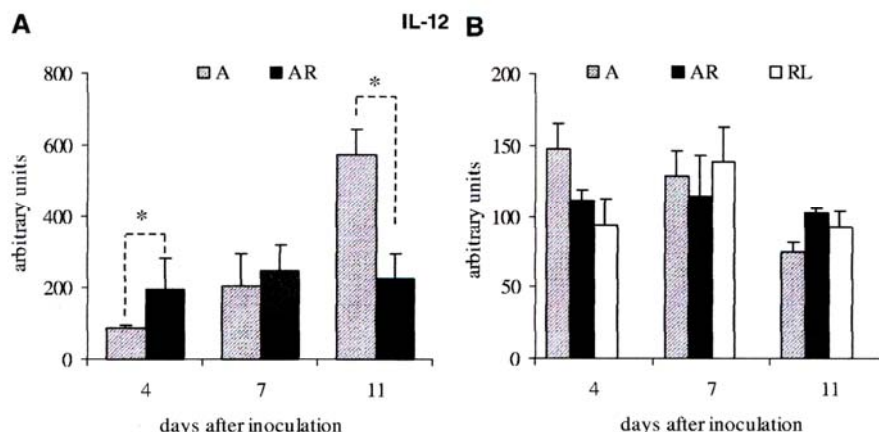


Fig. 5. Gene expression of IL-12. (A) Tumor cells from rats inoculated with Walker 256 lineage *A* and *AR* at 4, 7 and 11 days. Cells obtained from animals inoculated with lineage *A* exhibited a progressive elevation in IL-12 mRNA expression with time. At 4 days after inoculation, tumor cells from lineage *AR* exhibited significantly higher levels. In contrast, in tumor cells from animals sacrificed on the 11th day after inoculation, the lineage *AR* exhibited significantly lower levels of mRNA IL-12. (B) In spleen cells from rats inoculated with lineage *A*, IL-12 were significantly lower at 11 days after inoculation. Data represent three separate experiments using five different donors/day. * $p < 0.05$ were considered as indicative of significance.

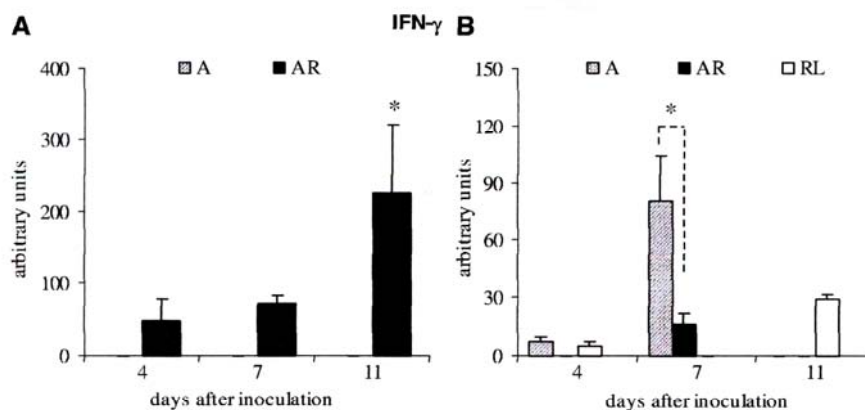


Fig. 6. IFN- γ mRNA expression. (A) In tumor cells of rats inoculated with lineage *A* and *AR* Walker 256 at 4, 7 and 11 days. Cells obtained from animals with lineage *A* demonstrated no expression of IFN- γ mRNA. (B) In spleen cells from lineage *AR* group, IFN- γ expression was undetected on the fourth day after inoculation. In contrast, on the seventh day after inoculation, we observed a significant increase in IFN- γ levels in spleen cells in the lineage *A* group. At 11 days after inoculation, IFN- γ expression was observed only in the *RL* group. Data represent three separate experiments using five different donors/day. * $p \leq 0.05$ was considered as indicative of significance.

signs, confirmed the aggressive properties of variant *A*, which include lower hemoglobin levels and a higher growth rate.

A multifocal model of tumor growth was used here to simulate the terminal metastatic dissemination stage (several simultaneous inoculations of Walker 256 cells). This multifocal model in Walker 256 causes a significant decrease in the osmotic fragility of circulating erythrocytes, anemia and other systemic effects such as anorexia [15]. Thus, in the present work, in opposite to a single focal model, the amount of lineage *AR* tumoral cells inoculated could explain the absence of regression of tumor mass in lineage *AR*.

Dacie et al. [10] shows that the multifocal inoculation of Walker 256 tumor rapidly induces anorexia, which is paradoxically, accompanied by an increase in body weight, as a result of renal Na^+ and fluid retention [15] a possible explanation to the lack of weight variation.

The IFN- γ and IL-12 are closely related to the genesis and installation of an effective immune response against tumors [16–19]. In this study, the absence of IFN- γ , in tumors cells of lineage *A*, may explain the differences between variants. The IFN- γ plays an important role in the macrophage activating, critical functions in innate and adaptative cell immunity and stimulating the expres-

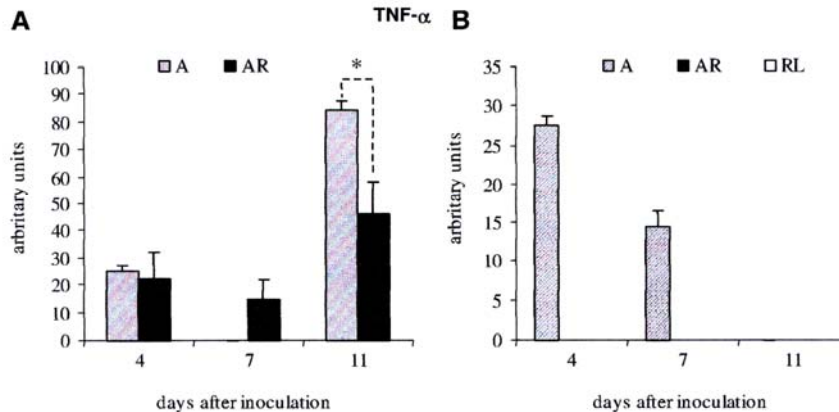


Fig. 7. TNF- α gene expression in rats inoculated with Walker 256 lineage A and AR at 4, 7 and 11 days. (A) Tumor cells obtained from animals inoculated with lineage A demonstrated no TNF- α expression on the seventh day after inoculation. In contrast, on the 11th which significantly higher levels of this cytokine were observed. (B) In spleen cells, we observed TNF- α mRNA expression only in lineage A group on the fourth and seventh day after inoculation. Data represent three separate experiments using five different donors/day. * $p < 0.05$ were considered as indicative of significance.

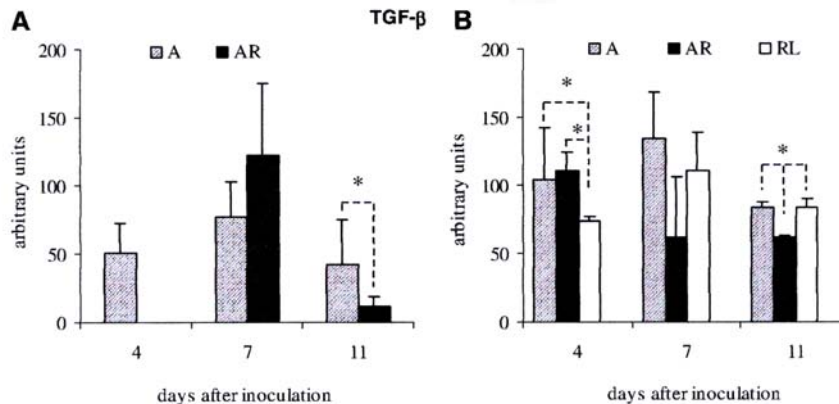


Fig. 8. TGF- β gene expression in tumor cells (A) and spleen cells (B) of rats inoculated with Walker 256 lineage A and AR on days 4, 7 and 11 days. (A) Tumor cells obtained from animals inoculated with lineage A exhibited significantly higher levels on the fourth and 11th days after inoculation ($p < 0.05$). (B) In spleen cells, the comparison among experimental groups showed that TGF- β in spleen cells from the group inoculated with tumor cells were significantly higher on the fourth day after inoculation compared to RL group. However, after 11 days of inoculation, cells from the AR group exhibited significantly lower levels. Data represent three separate experiments using five different donors/day. * $p < 0.05$ were considered as indicative of significance.

sion of class I and II MHC and co-stimulators in APCs [20]. The lack of IFN- γ expression in tumor cells of variant AR is accompanied by a lack of TNF- α expression and may be explained by the absence of inflammatory cells in lineage A. These data are agreement with those previously obtained by Schanosky et al. [22], who showed that there is a possible relationship between MHC class I expression and the increase in AR immunogenicity, since tumor cells lacking this molecule may be more susceptible to NK cell mediated cytotoxicity.

A progressive increase in IL-12 mRNA levels verified in tumor tissue from lineage A, in the absence of inflammatory cells, could be explained in terms of constitutive tumor cell expression. Some authors demonstrate that some myeloid

lineage tumors may produce IL-12 constitutively. However constitutively produced IL-12 does not demonstrate the same functions as the IL-12 produced by normal cells [22]. Immunophenotypical studies of the lineage Walker 256 sensitive (WS) and Walker 256 resistant (WR) to cis-diamminedichloroplatinum(II) suggest a primitive germ line of hematopoietic cell source, which on further investigation appeared to reflect a monocytoid cell origin [23,24].

The expression of IFN- γ and TNF- α mRNA in tumor cells and serum IFN- γ in lineage AR could be a risk factor to the anemia development. In addition, the absence of expression and changes in osmotic fragility could be due to other factor such as suppression of erythropoiesis by invading tumor cells. Cytokines directly

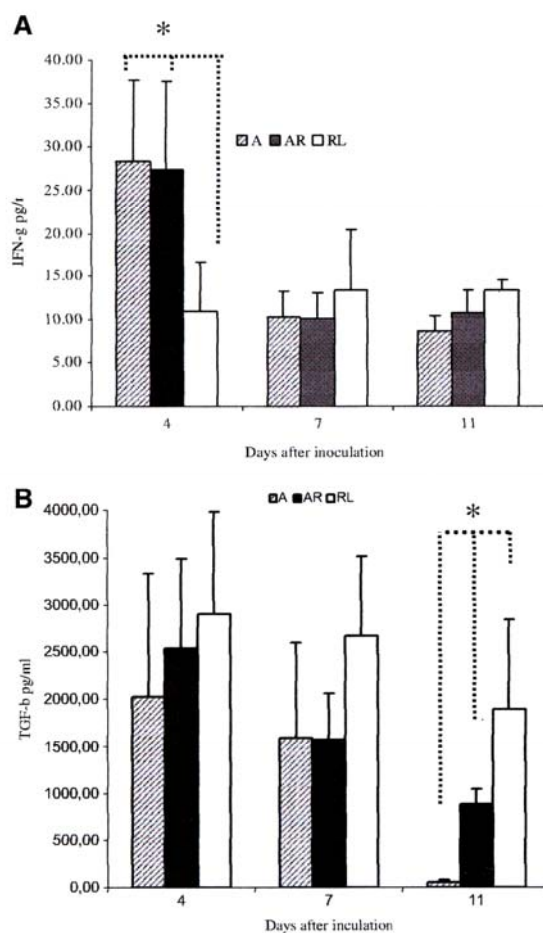


Fig. 9. IFN- γ (A) and TGF- β (B) from blood of rats inoculated with Walker 256, lineage A, AR and RL. (A) Serum IFN- γ in response to inoculation of lineage A, AR and RL. A statistically significant increase was observed to both lineages on day 4, compared to RL. (B) TGF- β was significantly decreased on day 11 from serum of rats inoculated with lineage A, compared with lineage AR and RL group. * $p < 0.05$ were considered as indicative of significance.

affect erythropoiesis by inhibiting the growth of erythroid progenitor cells [25,26]. Proinflammatory immune modulators, such as TNF- α , INF- γ and Type I interferons, block erythropoietic burst formation (BFU-e) and erythropoietic colony formation (CFU-e). However, IFN- γ appears to be most potent inhibitor of erythropoiesis by directly blocking CFU-e proliferation [25,27,28], and this notion is also reflected by an inverse correlation between IFN- γ level with hemoglobin concentrations and reticulocyte count [29]. The inhibitory effects of TNF- α or INF- γ on erythropoiesis may occur due to their ability to induce a nitric oxide toxic oxygen radicals production. Nitric oxide can directly block erythropoiesis by inhibiting the proliferation of erythroid progenitor cells in

bone marrow [30]. Conversely, in the present work the serum level of IFN- γ was increased only on day 4 for both lineages A and AR, suggesting other factors to explain the anemia and changes in erythrocyte fragilities.

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is an essential anti-inflammatory cytokine, thought to play a key role in regulating hematopoiesis [31]. Moreover, this cytokine is related to metastasis and tumor progression [24,32–34]. Our results show that the tumor TGF- β production increases on day 7 for both lineages, suggesting the critical period for tumor growth. Further analysis concerning the period between 7 and 11th days must be considered. Furthermore the decrease in tumor and host TGF- β , need better understanding.

Collectively, these observations suggest that differences in RBC osmotic fragility, spleen and mRNA cytokines expression might be associated with the immune response against cancer and could be related to the environment. These results show that the immunological environment affects the tumor growth capacity. Throughout the entire process of cancer aetiology, progression and metastasis, the microenvironment of the local host tissue can actively participate. Invasion occurs within tumour–host microecology, where stroma and tumor cells exchange enzymes and cytokines that modify the local extracellular matrix, stimulate migration, and promote proliferation and survival [14,30–37].

Overall, our results suggest that the aggressiveness of variant A is related to cytokine modulation, mainly downregulating INF- γ , facilitating the growth and escape of tumor cells. Furthermore, IL-12 seems to be constitutively expressed in both tumor lineage A and AR.

References

- [1] Meyers R. Studies on tumor antigens of the Walker 256 carcinosarcoma. *Immunochemistry* 1974;12:589–95.
- [2] Rettori O, Vieira-Matos AN, Tahin QS. Variability and discontinuity of the pathognomic systemic effects caused by The Walker –256 tumor progression in rats. *Tumori* 1995;81:370–7.
- [3] Rettori O, Vieira-Matos N, Gontijo JAR. Reduced renal sodium excretion in Walker –256 tumor bearing rats. *Acta Physiol Latino Am* 1996;46:111–8.
- [4] Guimarães F, Rettori O, Vieira-Matos AN, Fernandes GA. The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:309–17.
- [5] Banyer JL. Cytokines in innate and adaptative immunity. *Rev Immunogenet* 2000;2:359–73.
- [6] Chouaib S. The host–tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997;18:493–7.
- [7] Belardelli F, Ferrantini M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* 2002;23:201–8.
- [8] Aboself S, El-Sakka A, Young P, Cunha G. Mesenchymal reprogramming of adult human epithelial differentiation. *Differentiation* 1999;65:113–8.
- [9] Guimarães F, Retori O, Vieira-Matos NA, Fernandes GA. The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:309–17.
- [10] Dacie JV, Lewis SM, Gordon-Smith EC. Investigation of hereditary haemolytic anaemias. In: Dacie JV, Lewis SM, editors. *Practical Haematology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1984. p. 152–78.

- [11] Chomczynsky P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- [12] Ventura-Oliveira D, Villela CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF- α , 1991 and IFN- γ mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1347–55.
- [13] Monteiro Castro G, Zanin ME, Ventura Oliveira D, Villela CA, Ashimine R, Zollner RL. Th1 and Th2 cytokine immunomodulation by gangliosides in experimental autoimmune encephalomyelites. *Cytokine* 2004;26:155–63.
- [14] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991–8.
- [15] Vido AA, Cavalcanti TC, Guimarães F, Vieira-Matos AN, Rettori O. The hemolytic component of cancer anemia: effects of osmotic and metabolic stress on the erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:815–22.
- [16] Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM. Interferon- α in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:119–34.
- [17] Brunda MJ, Luistro L, Hendrzak JA, Fountoukakis M, Garrota G, Gattely MK. Role IFN- γ in mediating the antitumor efficacy of IL-12. *J Immunother* 1995;17:71–7.
- [18] Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnick MA, Brunda MJ, et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- γ production. *J Immunol* 1994;153:1697–706.
- [19] Young HA, Hardy KJ. Role of interferon γ in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 1995;58:373–81.
- [20] Rajan P, Sodhi A, Srivastava A. Cisplatin and interferon γ treated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells lines. *Anti-Cancer Drugs* 1997;8:797–806.
- [21] Stern AS, Magram J, Presley DH. Interleukin-12 an integral cytokine in the immune response. *Life Sci* 1996;58:639–54.
- [22] Schanoski AS, Cavalcanti TC, Campos CBL, Vieira-Matos AN, Rettori O, Guimarães F, Walker 256 MHC class I expression during shift from A variant to the immunogenic AR variant. *Cancer Letters* 2004;211:119–27.
- [23] Simpkins H, Lehman JM. A morphological and phenotypic analysis of Walker 256 cells. *Cancer Res* 1991;51:1334–8.
- [24] Kubin M, Chow JM, Trinchieri G. Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor α and IL-1 β production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1994;83:1847–55.
- [25] Pierce DF. Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4254–8.
- [26] Weiss G. Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. *Blood Rev* 2002;16:87–96.
- [27] Means RT, Krantz SB. Progress in understanding the pathogenesis of anaemia of chronic disease. *Blood* 1992;80:1639–44.
- [28] Zoumbos NC, Djeu J, Young NS. Interferon is the suppressor of hematopoiesis generated by stimulated lymphocytes. *J Immunol* 1984;133:769–77.
- [29] Wang CQ, Udupa KB, Lipschitz DA. Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J Cell Physiol* 1995;162:134–8.
- [30] Fucks D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H. Immune activation and the anaemia associated with chronic inflammatory disorders. *Eur J Haematol* 1991;46:65–70.
- [31] Dybedal I, Guan F, Borge OJ, Veiby OP, Ramsfjell V, Nagata S, Jacobsen SE. Transforming growth factor-beta1 abrogates Fas-induced growth suppression and apoptosis of murine bone marrow progenitor cells. *Blood* 1997;90:3395–403.
- [32] Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753–91.
- [33] Pierce DF. Inhibition of mammary duct development but not alveolar outgrowth during pregnancy in transgenic mice expressing active TGF- β 1. *Genes Dev* 1993;7:2308–17.
- [34] Jhappan C. Targeting expression of a transforming growth factor beta 1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *EMBO J* 1993;12:1835–45.
- [35] Liotta LC, Kohn EC. The microenvironment of the tumour – host interface. *Nature* 2001;411:375–9.
- [36] Istfan NW, Ling PR, Blackburn GL, Bistrian BR. Enhanced of tumor proteolysis by TNF- α : correlation of in vivo isotope estimates with growth. *Amer Physiol Soc* 1991;106–16.
- [37] Vaccariello M, Javaherian A, Wang Y, Fusenig NE, Garlick JA. Cell interactions control the fate of malignant keratinocytes in an organotypic model of early neoplasia. *J Invest Dermatol* 1999;113:384–91.