



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

EFEITOS *IN VIVO* E *EX VIVO* DE COMPOSTOS
DERIVADOS DO NITROESTIRENO NA RESPOSTA
IMUNOHEMATOPOÉTICA

ANDRANA KARLA CALGAROTTO

Campinas, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

EFEITOS *IN VIVO* E *EX VIVO* DE COMPOSTOS
DERIVADOS DO NITROESTIRENO NA RESPOSTA
IMUNOHEMATOPOÉTICA

ANDRANA KARLA CALGAROTTO

Tese de Doutorado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade de
Campinas - UNICAMP para obtenção
de título de Doutor em Farmacologia.
Sob orientação da Profa. Dra. Mary
Luci de Souza Queiroz.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C128e Calgarotto, Andrana Karla, 1983 -
Efeitos *in vivo* e *ex vivo* de compostos derivados do
Nitroestireno na resposta imunoematopoética / Andrana
Karla Calgarotto. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

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

1. Células matadoras naturais. 2. Hematopoese. 3.
Citocinas. 4. Carcinoma de Ehrlich. 5. Macrófagos. I.
Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: *In vivo* and *ex vivo* effects of Nitrostyrene compounds in the immunohematopoietic response.

Palavras-chave em inglês:

Killer cells, natural

Hematopoiesis

Cytokines

Carcinoma, Ehrlich tumor

Macrophages

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Mary Luci de Souza Queiroz [Orientador]

Maria Helena Catelli de Carvalho

Priscila Totarelli Monteforte

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Wanda Pereira Almeida

Data da defesa: 29-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

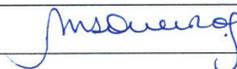
Banca Examinadora de Tese de Doutorado

ANDRANA KARLA CALGAROTTO

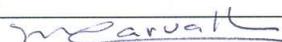
Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



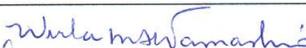
Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho



Profa. Dra. Priscila Totarelli Monteforte



Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro



Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida



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

Data: 29/02/2012

À Deus, pelo Seu grande amor e presença constante em minha vida.

Ao amor da minha vida, Victor Maso, por todos os momentos ao meu lado, pelo amor, carinho, dedicação e apoio. E a nova razão da minha vida, o meu filho Joaquim, que renovou a cada minuto nesse último ano a minha razão de viver.

À minha mãe, Maria de Lourdes, que sempre me revestiu de amor, carinho e dedicação. Por estar sempre pronta para uma palavra amiga, me acolhendo com um abraço em momentos de aflição e vibrando e se orgulhando a cada desafio vencido.

Ao meu pai Ires, pelas oportunidades, pelo incentivo e pelo grande amor.

À minha princesa, minha irmã, minha amiga, minha companheira Andressa. Por seu amor incondicional e por estar sempre presente na minha vida. Por ser minha defensora e por sempre me dar seu colo amigo. E também ao meu querido cunhado e compadre Taluí pela grande amizade e pelo amor e carinho dedicados a minha irmã.

À querida professora Mary, pela amizade, pelos conselhos, por todas as oportunidades e pelo crescimento científico.

À minha sogra Ivete pelo carinho e apoio.

À minha grande amiga Michelle pelo apoio, pela amizade e pela ajuda incondicional.

Às minhas também grandes amigas Miriam, Juliana, Sueli (Suélen para os íntimos), Aline e Cris pela grande amizade, ajuda e apoio. Encontrei amigas do peito nesse laboratório.

Aos animais, que serviram com sua morte para que pudéssemos cuidar da vida, meu respeito e eterna gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao departamento de Farmacologia e Hemocentro que possibilitaram a realização deste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta etapa vencida na minha vida.

LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. Busca de novos agentes no tratamento do câncer	27
1.2. Síntese e análise dos compostos 1-nitro-2-((E)-2- nitrovinil)benzeno e 1-nitro-3-((E)-2- nitrovinil)benzeno.....	28
1.3. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	30
1.4. Hematopoese.....	32
1.5. Via de sinalização p38MAPK na regulação da hematopoese.....	35
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1. Compostos	45
3.2. Animais	45
3.3. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	45
3.4. Realização das curvas de sobrevida	46
3.5. Tratamento dos animais	47
3.6. Ensaio de unidade formadora de colônia para granulócitos/macrófagos da medula óssea	48
3.6.1 Preparo de culturas de medula.....	48
3.6.2 Preparo de culturas do baço.....	49
3.6.3 Avaliação da atividade estimuladora de colônias (CSA)	49

3.7.	Avaliação da atividade citotóxica de células “Natural Killer” (NK).....	50
3.7.1.	<i>Manutenção e preparo das células alvos.....</i>	50
3.7.2.	<i>Células efetoras esplênicas.....</i>	50
3.7.3.	<i>Ensaio de liberação de 51Cr.....</i>	50
3.8.	Proliferação de células mononucleares esplênicas	51
3.9.	Caracterização e cultivo de macrófagos peritoneais.....	52
3.9.1.	<i>Obtenção de sobrenadante de cultura para dosagem de citocinas.....</i>	52
3.9.2.	<i>Produção de nitrito (NO₂⁻)</i>	53
3.10.	Quantificação de citocinas	53
3.11.	Isolamento e cultura de células CD34+	54
3.12.	Avaliação da apoptose.....	54
3.13.	Análise histoquímica de células hematopoéticas.....	54
3.14.	Marcação com lactoferrina	55
3.15.	Análise de Western blot.....	55
3.16.	Análise de citometria de fluxo para células progenitoras mielóides.....	56
3.17.	Ensaio de unidade formadora de colônia (CFU)	56
3.18.	Análise Estatística.....	56
4.	RESULTADOS	59
4.1.	Atividade in vivo dos compostos NTS1 e NTS2 utilizando o tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	61
4.1.1.	<i>Análise da sobrevivida</i>	61
4.1.2.	<i>Ensaio de unidade formadora de colônia para granulócitos/macrófagos da medula óssea e baço de animais normais e portadores de TAE.....</i>	64

4.1.3. Atividade estimuladora de colônia (CSA).....	68
4.1.4. Atividade citotóxica de células Natural Killer.....	70
4.1.5. Capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas	72
4.1.6. Determinação de esplenócitos CD4 ⁺	74
4.1.7. Produção de IFN-gama, IL-2 e IL-10 por células mononucleares esplênicas	76
4.1.8. Avaliação da frequência de macrófagos (Mac3) peritoneais.....	82
4.1.9. Produção de TNF-alfa, IL-1 e IL-10 por macrófagos peritoneais.....	84
4.1.10. Produção de NO ₂ ⁻ por macrófagos peritoneais	90
4.2. Atividade ex vivo dos compostos NTS1 e NTS2 em células CD34+ isoladas	
de sangue de cordão umbilical	92
4.2.1. Determinação da proliferação e viabilidade de células CD34+	92
4.2.2. Determinação de células tronco hematopoéticas (CD34+)	94
4.2.3. Determinação da frequência de Progenitor Mielóide Comum (PMC) e	
Progenitor de Granulócito e Macrófago (PGM)	96
4.2.4. Capacidade formadora de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-	
GM) de células CD34+.....	98
4.2.5. Análise do processo de diferenciação de células CD34+.....	100
4.2.6. Atividade de NTS1 e NTS2 na via de sinalização p38MAPK na expansão de	
neutrófilos a partir de progenitores CD34+.....	102
5. DISCUSSÃO.....	103
6. CONCLUSÕES.....	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
8. ANEXOS.....	141

Figura 1.1: Estrutura química do 1-nitro-2-(E)-2-nitrovinil)benzeno (NTS1) e do 1-nitro-3-(E)-2-nitrovinil)benzeno (NTS2).	30
Figura 1.2: A) Camundongo portador de TAE; B) Esfregaço do líquido ascítico de camundongo portador de TAE corado com Giema. Células mononucleares (M) e células tumorais (T); C) Células de TAE coradas com PAS.	31
Figura 1.3: Modelo proposto para maturação hematopoética a partir de células tronco hematopoéticas (CTH).).....	35
Figura 3.1: Protocolo experimental para avaliação do efeito do tratamento de diferentes doses de NTS1 e NTS2 (0,05, 0,1,0,5,1,5 e 10 mg/Kg) na sobrevida de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich.	46
Figura 3.2: Protocolo experimental para avaliação da atividade de NTS1 e NTS2 na manutenção da hematopoese, atividade estimuladora de colônias de células hematopoéticas no soro, atividade de células NK, capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas, bem como a produção de IFN-gama, IL-2 e IL-10 por estas células e proliferação e atividade de macrófagos através da determinação dos níveis de TNF- α , IL-1, IL-10 e NO ₂ - em modelo experimental in vivo de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich.	48
Figura 4.1: Efeito do tratamento com diferentes concentrações de NTS1 (0,05, 0,1,0,5,1,5 e 10 mg/Kg) na sobrevida de camundongos BALB/c portadores de TAE.....	62
Figura 4.2: Efeito do tratamento com diferentes concentrações de NTS2 (0,05, 0,1,0,5,1,5 e 10 mg/Kg) na sobrevida de camundongos BALB/c portadores de TAE.....	63
Figura 4.3: Ensaio de unidade formadora de colônia para granulócitos/macrófagos da medula óssea de animais normais e portadores de TAE tratados com NTS1 ou NTS2...	65
Figura 4.4: Ensaio de unidade formadora de colônia para granulócitos/macrófagos do baço de animais normais e portadores de TAE tratados com NTS1 ou NTS2	67

Figura 4.5: Atividade estimuladora de colônias (unidades de CSF/mL) de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.....	69
Figura 4.6: Atividade das células NK de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2	71
Figura 4.7: Atividade proliferativa de células esplênicas de camundongos BALB/c portadores de TAE tratados com NTS1 ou NTS2.	73
Figura 4.8: Quantificação de linfócitos T CD4+ no baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.	75
Figura 4.9: : Produção de IFN-gama (pg/ml) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.....	77
Figura 4.10: Produção de IL-2 (pg/ml) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.	79
Figura 4.11: Produção de IL-10 (pg/ml) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.	81
Figura 4.12: Quantificação de macrófagos Mac3 no peritônio de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.	83
Figura 4.13: Produção de TNF-alfa (pg/ml) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.....	85
Figura 4.14: Produção de IL-1 (pg/ml) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.....	87
Figura 4.15: Produção de IL-10 (pg/ml) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.....	89
Figura 4.16: Produção de NO ₂ ⁻ (µmol) por 1x10 ⁵ macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com NTS1 ou NTS2.....	91

Figura 4.17: Proliferação e viabilidade de células CD34+, tratadas com NTS1 ou NTS2....	93
Figura 4.18: Determinação de células tronco hematopoéticas (CD34+), tratadas com NTS1 ou NTS2	95
Figura 4.19: Determinação de Progenitor Mielóide Comum (PMC) e Progenitor de Granulócito e Macrófago (PGM) a partir de células CD34+, tratadas com NTS1 ou NTS2.....	97
Figura 4.20: Determinação de progenitores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos a partir de células CD34+, tratadas com NTS1 ou NTS2.....	99
Figura 4.21: Análise do processo de diferenciação a partir de células CD34+, tratadas com NTS1 ou NTS2.....	101
Figura 4.22: Atividade de NTS1 e NTS2 na via de sinalização p38MAPK na expansão de neutrófilos a partir de progenitores CD34+, tratadas com NTS1 ou NTS2	102

Neste trabalho avaliamos os efeitos de compostos derivados do nitroestireno, NTS1 e NTS2, sobre a resposta imunoematopoética de camundongos normais e portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). O estudo dos mecanismos envolvidos no tratamento de camundongos com NTS1 e NTS2 frente às alterações induzidas pelo TAE mostra efeitos imunológicos distintos dos dois compostos. O composto NTS1 induziu aumentos significativos na atividade de células NK, na proliferação de células mononucleares esplênicas e na produção de citocinas com padrão Th1 (IL-2 e IFN- γ) liberadas por células mononucleares do baço. Em contrapartida, a atividade de NTS2 esteve relacionada com ativação macrófaga. Nossos resultados demonstram que o tratamento com NTS2 promove aumento significativo nos níveis de TNF- α e IL-1 no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais. Outro efeito importante de NTS2 sobre macrófagos peritoneais foi o estímulo na produção de NO $_2^-$. Além dos parâmetros imunológicos citados, avaliamos, os efeitos de NTS1 e NTS2 sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos. Tanto NTS1 como NTS2 foram capazes de reverter a mielossupressão provocada pela evolução do tumor, além de aumentar a atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro de camundongos Balb/c. Os resultados obtidos demonstram que os compostos compartilham da habilidade de regular positivamente os desequilíbrios hematopoéticos e imunológicos envolvidos na evolução temporal do TAE. A partir disso, testamos a capacidade dos compostos no processo de diferenciação mielocítica utilizando um sistema de cultura ex- vivo no qual células humanas CD34+ foram tratadas com NTS1 e NTS2. Nossos resultados apresentaram atividade dose-dependente de NTS1 e NTS2 na proliferação e viabilidade de células CD34+. Além de aumentar significativamente o número de progenitores mielóide comum e para granulócitos de macrófagos. Os compostos apresentaram diferentes efeitos durante o processo de diferenciação. Inibiram a formação de neutrófilos maduros, porém, NTS1 aumentou significativamente a produção de metamielócitos e NTS2 de monócitos. Estes efeitos fenotípicos na proliferação e na diferenciação observados após o tratamento com NTS1 e NTS2 podem estar relacionados com a via p38MAPK e o fator transcricional CEBP- α .

In this work, we have investigated the effects of two nitrostirene derivatives compounds, NTS1 and NTS2, in the immune-hematopoietic system in normal and Ehrlich ascites tumor (EAT)-bearing mice. The study of the mechanisms involved in the treatment produced by the NTS1 and NTS2 against induced alterations by EAT were different, showing significant improvements in the NK cells activity, proliferation and Th1 (IL-2 and INF- γ) by mononuclear spleen cells. On the other hand, NTS2 activity was related to macrophage activation. Our results show that treatment with NTS2 promotes significant increase in the TNF- α and IL-1 levels in supernatants of the cultures of peritoneal macrophages. Another important effect of NTS2 on peritoneal macrophage was the stimulation in the production of NO₂⁻. Beyond immunological parameters, we investigated the NTS1 and NTS2 effects on hematopoietic progenitors. Treatment with NTS1 and NTS2 protected the host of myelosuppression caused by tumor development and increase the colony-stimulating activity (CSA) in the serum of Balb/c mice. The results showed that NTS1 and NTS2 share the ability of regulating positively the hematopoietic and immunological unbalance involved in the TAE development. Concerning their effects on myelopoiesis, we investigated the compounds utilizing an ex-vivo differentiation system in which umbilical cord blood derived CD34⁺ cells were treated with NTS1 and NTS2. Our results show that NTS1 and NTS2 have concentration dependent effects on proliferation and viability of CD34⁺ cells. Moreover, NTS1 and NTS2 significantly increase common myeloid and granulocyte/macrophage progenitors. The compounds have differential effects on terminal differentiation, inhibiting mature neutrophil, however, NTS1 significantly increased metamyelocytes and NTS2 monocytes. The phenotypic effects on proliferation and differentiation observed after NTS1 and NTS2 treatment can be explained by changes in p38MAPK cell signaling and with CEBP- α transcription factor.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Busca de novos agentes no tratamento do câncer

O câncer resulta de um comportamento celular anormal, incluindo a proliferação celular irregular e descontrolada. Na maioria dos casos, é causado por mutação nos genes que controlam o crescimento, a divisão e a apoptose celular (morte celular programada) (Wang, 2010). A partir da década de 40, ocorreu enorme progresso na compreensão dos processos neoplásicos, havendo uma rápida expansão no arsenal de agentes citotóxicos disponíveis. Entretanto, o avanço no tratamento de tumores de ocorrência freqüente é ainda modesto. Somente no Brasil, estima-se a ocorrência de aproximadamente 90.000 óbitos por ano, chegando-se a mais de 4 milhões em todo o mundo. Além disso, a mortalidade por câncer em nosso país vem crescendo, representando um aumento em torno de 150% em apenas 15 anos (Ministério da saúde, 2005). Segundo estimativas, o número de novos casos de câncer saltará de 11,3 milhões em 2007 para 15,5 milhões em 2030 (Organização Mundial da Saúde, 2008). Isto faz do câncer uma doença emergencial, sendo fundamental o desenvolvimento de novas drogas, visando terapias mais eficientes.

Os tratamentos atualmente empregados na terapia do câncer, a quimioterapia e a radioterapia são destituídos de toxicidade seletiva, provocando efeitos colaterais graves, dentre eles a inibição da resposta imune, crítica para a recuperação do paciente (Wang, 2008). Neste contexto, a citoredução induzida quimicamente tem sido utilizada não apenas no tratamento de neoplasias, mas também para abrogar a medula óssea em situações de transplante deste órgão. O tratamento com tais agentes é limitado principalmente por causar mielossupressão e imunossupressão, além de outros efeitos colaterais em células normais. Neste caso, a indução farmacológica de uma resposta imune apropriada, ou a modulação do sistema imune, são ferramentas úteis que visam, principalmente, aumentar ou restabelecer os mecanismos de defesa próprios do hospedeiro para agir contra as células cancerosas.

Um alvo atraente para a pesquisa quimioterápica é o desenvolvimento de novas substâncias dotadas de alta seletividade aos tecidos neoplásicos em associação a uma maior atividade e espectro de ação. Uma destas estratégias está no desenvolvimento dirigido de novos fármacos por intermédio da manipulação química de compostos com ação antitumoral comprovada, com o objetivo de intensificar a atividade e o potencial de

cura destas drogas. Uma outra abordagem é a síntese de substâncias de baixa toxicidade e com potencial farmacológico para modificar a resposta das células imunocompetentes. A atividade antitumoral destas drogas é determinada pela sua capacidade de induzir ou modular a resposta imune contra as células malignas.

Neste sentido, resultados encorajadores têm sido obtidos com compostos derivados do nitroestireno os quais apresentaram uma série relevante de atividades biológicas. Alguns derivados do nitroestireno têm recentemente sido testados como agentes antitumorais apresentando atividade pró-apoptótica em tumor de pituitária em ratos através de inibição de proteínas fosfatases (Fathi et al. 2000). Estes compostos também têm sido descritos como inibidores potentes e seletivos da telomerase em células cancerosas humanas (Kaa et al, 2003), além de apresentarem atividades citotóxica, antifúngica, antibacteriana e inibidora do metabolismo e da agregação plaquetária (Milharez et al, 2006).

1.2. Síntese e análise dos compostos 1-nitro-2-((E)-2- nitrovinil)benzeno e 1-nitro-3-((E)-2- nitrovinil)benzeno

Os compostos 1-nitro-2-((E)-2- nitrovinil)benzeno e 1-nitro-3-((E)-2-nitrovinil)benzeno denominados aqui como NTS1 e NTS2 respectivamente, foram sintetizados pelo grupo do Prof. Dr. José Augusto Villar, da Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ), segundo protocolo estabelecido na literatura (Villar et al., 2008, Vogel, 1989). Além do processo de síntese, foram realizados testes de relação estrutura-atividade para identificar possíveis atividades biológicas desses compostos.

Em química medicinal, o termo “relação estrutura-atividade” compreende o estudo dos efeitos que a estrutura química de um composto (ligante) pode causar durante sua interação com o receptor biológico e, conseqüentemente, racionalizar os principais fatores que governam esta interação. As interações de um fármaco com seu receptor biológico são determinadas por forças intermoleculares, ou seja, interações lipofílicas, polares, eletrostáticas e estéreas. Assim sendo, substâncias que apresentam propriedades terapêuticas, ao interagirem com um alvo específico (uma enzima, um receptor, um canal de íons, um ácido nucléico ou qualquer outra macromolécula biológica), devem possuir uma estrutura tridimensional de forma que as disposições de seus grupos funcionais favoreçam uma maior complementaridade ao sítio de ligação. Isto pode ser resumido da

seguinte forma: quanto melhor o “encaixe” e a complementaridade das propriedades superficiais de um fármaco, maior será sua afinidade e maior poderá ser sua atividade biológica (Barreiro, 2001, Kubiny, 1993).

Estudos das relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR), ou entre a estrutura química e algum tipo de propriedade físico-química (QSPR), são de grande importância na química e bioquímica modernas. O objetivo central em estudos de QSAR/QSPR é racionalizar a procura por compostos com propriedades desejadas utilizando intuição e experiência química de uma forma matematicamente quantificada e computadorizada. Devido aos recentes progressos na área computacional e no desenvolvimento de eficientes algoritmos de cálculos, um grande avanço também foi verificado no desenvolvimento dos cálculos químico-quânticos. Métodos de Química Quântica e técnicas de modelagem molecular permitem a definição de um grande número de propriedades atômicas e moleculares caracterizando propriedades relacionadas à reatividade, forma e modo de ligação de fragmentos e substituintes moleculares.

Diante disso, os compostos NTS1 e NTS2 foram analisados por um método de Química Quântica denominado *ab initio* para relacionar suas estruturas com a atividade de inibição da enzima fosfolipase A₂. Esse método permitiu relacionar a estrutura com a inibição enzimática causada pelos compostos mostrando que o posicionamento do grupamento nitro no anel aromático é de grande importância para o desenvolvimento da atividade biológica. Inibidores enzimáticos seletivos possuem grande importância e interesse clínico no tratamento de tumores uma vez que podem apresentar potencial citotóxico ativando de forma específica processos apoptóticos. Resultados obtidos em nosso laboratório mostram atividade antitumoral seletiva dos nitroestirenos em células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), causando morte celular programada ao mesmo tempo que ativam processos autofágicos os quais auxiliam a apoptose no combate ao câncer (Calgarotto et al, 2012, artigo aceito para publicação).

Estes resultados positivos tornaram os compostos 1-nitro-2-(E)-2-nitrovinil)benzeno e 1-nitro-3-(E)-2-nitrovinil)benzeno substâncias bastante promissoras para maiores investigações. Neste trabalho avaliamos o mecanismo de ação antitumoral e a eficácia terapêutica de NTS1 e NTS2 (Figura 1.1) utilizando o tumor ascítico de Ehrlich e o modelo com células CD34+ humanas em um sistema de diferenciação *ex vivo*.

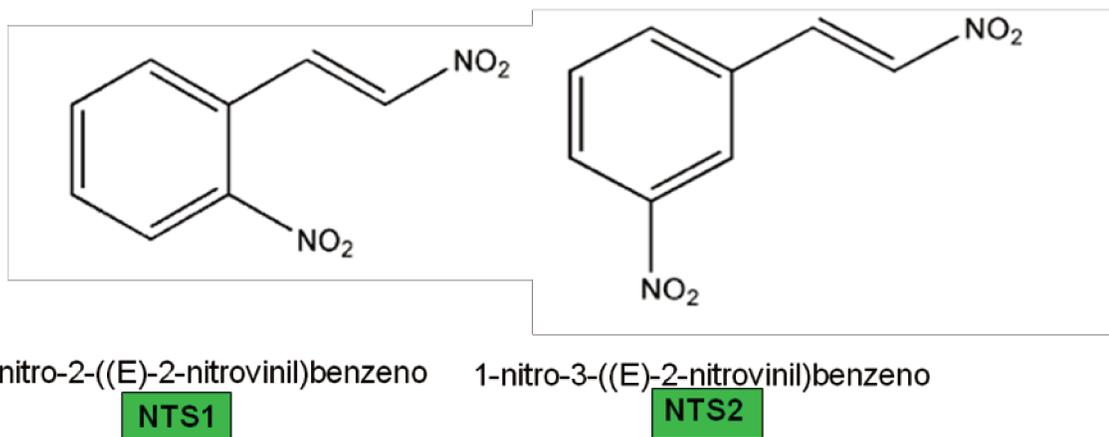


Figura 1.1: Estrutura química do 1-nitro-2-(E)-2-nitrovinil)benzeno (NTS1) e do 1-nitro-3-(E)-2-nitrovinil)benzeno (NTS2).

1.3. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

Os modelos tumorais experimentais são instrumentos laboratoriais que, sob condições adequadas, facilitam a compreensão da imunologia tumoral e possibilitam a avaliação de atividade e mecanismo antitumoral de diferentes compostos. Em 1905, Ehrlich e Apolant (Ehrlich e Apolant, 1905) descreveram o aparecimento de um tumor espontâneo na região da glândula mamária de um camundongo fêmea. Naquela ocasião foi observado se tratar de um tumor maligno e, testes de transplantabilidade mostraram a capacidade de crescimento em camundongos receptores. Diferentes patologistas têm classificado o tumor de Ehrlich como carcinoma; entretanto, as definições como tumor de Ehrlich ou tumor ascítico de Ehrlich (TAE) são igualmente empregadas.

O modelo ilustrado na Figura 1.2 tem sido amplamente utilizado em estudos fisiopatológicos associados aos efeitos sistêmicos comprometidos com a evolução temporal do tumor (Sakai et al, 2006). O TAE oferece inúmeras vantagens como modelo experimental para a avaliação da atividade e mecanismo antitumoral de diferentes compostos. Tais características incluem, basicamente, a sua inespecificidade frente a diferentes linhagens murinas, sendo facilmente transplantável, com porcentagem de “pega” de até 100%. Além disso, diferentes vias de inoculação podem ser utilizadas para a administração das células tumorais possibilitando desde o crescimento subcutâneo de tumores sólidos, até a formação abundante de líquido ascítico como resultado da inoculação de uma suspensão de células tumorais na cavidade peritoneal dos animais.

Desta forma, as células do TAE crescem rapidamente em praticamente qualquer linhagem de camundongos, podendo induzir tumores sólidos ou ascíticos que levam o hospedeiro à morte, mesmo quando administradas em doses extremamente baixas.

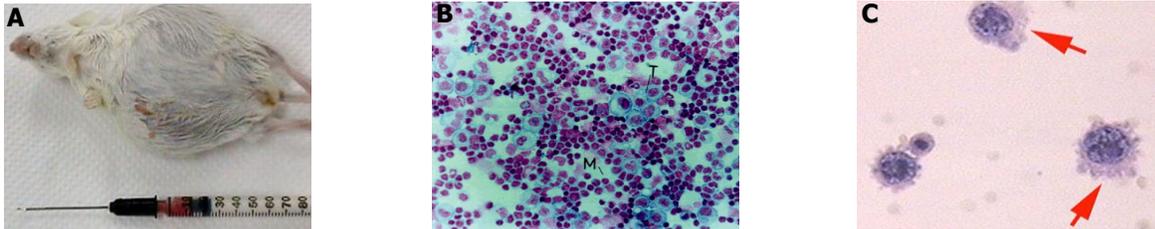


Figura 1.2: A) Camundongo portador de TAE; B) Esfregaço do líquido ascítico de camundongo portador de TAE corado com Giemsa. Células mononucleares (M) e células tumorais (T); C) Células de TAE coradas com PAS.

A influência do crescimento tumoral na proliferação e diferenciação das células pluripotentes (CFU-S) e nas células progenitoras (CFU-C) tem sido sugerida por vários autores. Como muitos outros tumores experimentais, o tumor de Ehrlich produz alterações severas no sistema hematopoético do hospedeiro (Delmonte et al, 1966, Clerici et al, 1970, Pessina et al, 1982, Queiroz et al, 2008). Neste sentido, o envolvimento de fatores solúveis produzidos pelas células tumorais ou pela interação tumor-hospedeiro nos mecanismos homeostáticos da medula óssea tem sido proposto. Pessina et al. (1982) verificaram que o pré-tratamento *in vitro* de células de medula óssea normais com fluído ascítico de Ehrlich produz uma redução severa no número de colônias formadas a partir de células precursoras da medula óssea (CFU-C) e de células pluripotentes (CFU-S). Ademais, foi observado maior sensibilidade do compartimento granulocítico-macrofágico aos efeitos provocados pelo crescimento tumoral (Queiroz et al, 2008).

Em relação ao envolvimento da imunidade celular, Marusic (1979), em estudo da resposta imune contra o TAE utilizando camundongos deficientes em células T, comprovou que a imunidade desenvolvida frente a este tumor é também dependente das células T.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a supressão da resposta imunológica do tipo celular mediada por macrófagos (Fecchio et al. 1990, Bincoletto et al. 2005), linfócitos

T (Segura et al. 1997, 2000) e células NK (Valadares et al. 2006a, Sheeja & Kuttan 2007) é conseqüência inevitável da progressão tumoral. Vários mecanismos têm sido descritos como sendo responsáveis pela supressão imunológica induzida pelo tumor, incluindo a regulação negativa de fatores humorais (Valadares et al. 2004, Justo et al. 2003), a produção de citocinas imunossupressoras (Yamamoto et al. 2005), e a indução de macrófagos (Mantovani et al. 1992, Elgert et al. 1998) e células T supressoras (Utsumi et al. 1990). Durante o desenvolvimento do TAE ocorre alteração do fenótipo Th1 para o Th2 com conseqüente inibição da liberação de IL-2, IFN- γ e TNF- α (Yamamoto et al. 2005, Grynberg et al. 1999), redução da capacidade citotóxica de células NK (Valadares et al. 2003), aumento nos níveis de IL-10 (Valadares et al. 2004) e de PGE2 (Valadares et al. 2006a, Bincoletto et al. 2005, Pelus & Bockman 1979), acompanhado de reduzido influxo de células inflamatórias na cavidade peritoneal (Ruiz de Morales et al. 1999, Segura et al. 1997, Valadares et al. 2003, Valadares et al. 2004, Justo et al. 2003, Parhar & Lala 1988).

Resultados encorajadores vêm sendo obtidos em nosso laboratório com o uso deste modelo experimental (Valadares et al. 2003, 2004, 2006b, Justo et al. 2003, Queiroz et al. 2008, Cezamar et al. 2002, Matsuzaki et al, 2003, Gupta et al. 2004, Sunila & Kuttan 2004). Um perfil da resposta terapêutica dos compostos em estudo consiste na reversão da profunda mielossupressão medular e da acentuada mioestimulação extra-medular (esplênica) induzida pelo tumor. Resultados positivos são aqueles que aumentam a taxa ou a duração da sobrevivência e reduzem o crescimento tumoral na cavidade abdominal. Em adição aos trabalhos disponíveis na literatura, estes resultados vêm corroborar o emprego do tumor de Ehrlich como modelo tumoral experimental e também sua utilização em estudos da atividade imunomoduladora de diferentes compostos.

1.4. Hematopoese

Todas as células de defesa especializadas possuem dois aspectos comuns: passam parte de suas vidas na corrente sanguínea e originam-se de uma única célula indiferenciada comum pluripotente denominada célula-tronco hematopoética (CTH) (“HSC-Hematopoietic Stem Cell”) presente na medula óssea (Lord and Testa, 1988, Guest and Utrecht, 2001, Lilly et al, 2011, Park et al, 2012). Tais células são classicamente identificadas pela presença ou ausência de antígenos de superfície celular. As CTH foram primeiramente identificadas fenotipicamente como Lin⁻Sca-1⁺C-kit⁺ encontradas na medula de óssea de camundongos (Spangrude et al. 1988, Morrison e

Weissman, 1994, Osawa et al, 1996). Entretanto, hoje sabe-se que há muitas diferenças entre marcadores de células hematopoéticas humanas e murinas.

O modelo proposto por Weissman (2001) (Figura 1.3) apresenta uma via de maturação hematopoética na qual as células tronco denominadas “long-term” que são fenotipicamente descritas como Lin⁻IL-7R α ⁻ Sca-1⁺ C-kit⁺ Flt-3-Thy1^{low} CD34⁻, fazem parte de uma subpopulação quantitativamente pequena, a qual possui alta capacidade de auto-renovação e diferenciação nas diferentes linhagens (Weissman, 2001, Kondo et al, 2003). Além disso, estas têm a capacidade de gerar as células denominadas “short-term” (Lin⁻IL-7R α ⁻ Sca-1⁺ C-kit⁺ Flt-3^{low}Thy1^{low} CD34⁺) as quais possuem potencial de se diferenciar nas diferentes linhagens, porém com capacidade de auto-renovação diminuída (Morrison et al, 2005). Este modelo também faz discriminação entre progenitor linfóide comum (PLC) que gera todas as linhagens linfóides, e progenitor mielóide comum (PMC) que produz todas as células mielóides, dando suporte ao conceito de que linhagens linfóides e mielóides se desenvolvem independentemente a partir de células tronco-hematopoéticas (Kondo et al, 1997, Akashi et al, 2002).

A progenia das células-tronco hematopoéticas compromete-se com uma das três linhagens: eritróide, mielóide e linfóide, originando os eritrócitos, linfócitos e células mielóides, respectivamente (Manz et al. 2001, Traver et al. 2000). As células mais primitivas em cada linhagem, denominadas progenitoras de linhagem específica, não podem ser identificadas morfológicamente, entretanto, sua existência e parte de suas propriedades são deduzidas pela capacidade de produzir tipos particulares de células maduras em sistema de ensaio biológico específico. As células maduras mielóides compreendem os neutrófilos, monócitos, mastócitos, eosinófilos, basófilos e megacariócitos. As células linfóides são constituídas de linfócitos B, linfócitos T e possivelmente as células “natural killer” (NK) (Traver e Akashi, 2004). Em conjunto, estas duas linhagens mielóides e linfóides, de suma importância, abrangem todas as células de defesa do hospedeiro responsáveis pelo o estabelecimento de resposta imune efetiva.

Dentro da medula óssea as células do estroma que são constituídas de células endoteliais, células acumuladoras de lipídeos, macrófagos e células fibroblásticas, regulam a maturação e diferenciação dos precursores hematopoéticos. Esta regulação é mediada tanto por contato direto, envolvendo moléculas de adesão entre as células do estroma/células hematopoéticas, quanto indiretamente via fatores de crescimento

(Gordon et al, 1987, Gupta et al, 2000, Tripodo et al, 2011). A adesão de células pluripotentes ao estroma ocorre por meio de várias interações entre receptores-moléculas, como as integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e CD44, presentes nas células hematopoéticas e ligantes presente nas células do estroma (Lawal e Calvi, 2011).

Adicionalmente aos mecanismos de adesão, fatores de crescimento (citocinas) estimuladores e inibidores regulam a maturação das células pluripotentes e progenitoras comprometidas com uma linhagem celular específica. A ação dos estímulos, positivos: fator estimulador de células tronco (SCF), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas-(IL)-1, 3 e 6, e o fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), juntamente com estímulos negativos: SCF, IL-1, TNF- α e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), é dependente tanto da localização da citocina quanto do estágio de maturação das células hematopoéticas (Batard et al, 2000, Wilson et al, 2007, Winkler et al, 2010).

A capacidade proliferativa e de diferenciação das células hematopoéticas é tipicamente avaliada *in vitro* por ensaios padrão de cultura denominados ensaios formadores de colônias e os progenitores freqüentemente descritos como unidades formadoras de colônias (CFU). Esta técnica de cultura de células progenitoras da medula óssea em meio semi-sólido permitiu a compreensão da biologia de formação da célula sanguínea, sendo hoje amplamente empregada no auxílio diagnóstico e como ferramenta de estudo dos efeitos de agentes químicos exercidos sobre a formação das células imuno/hematopoéticas.

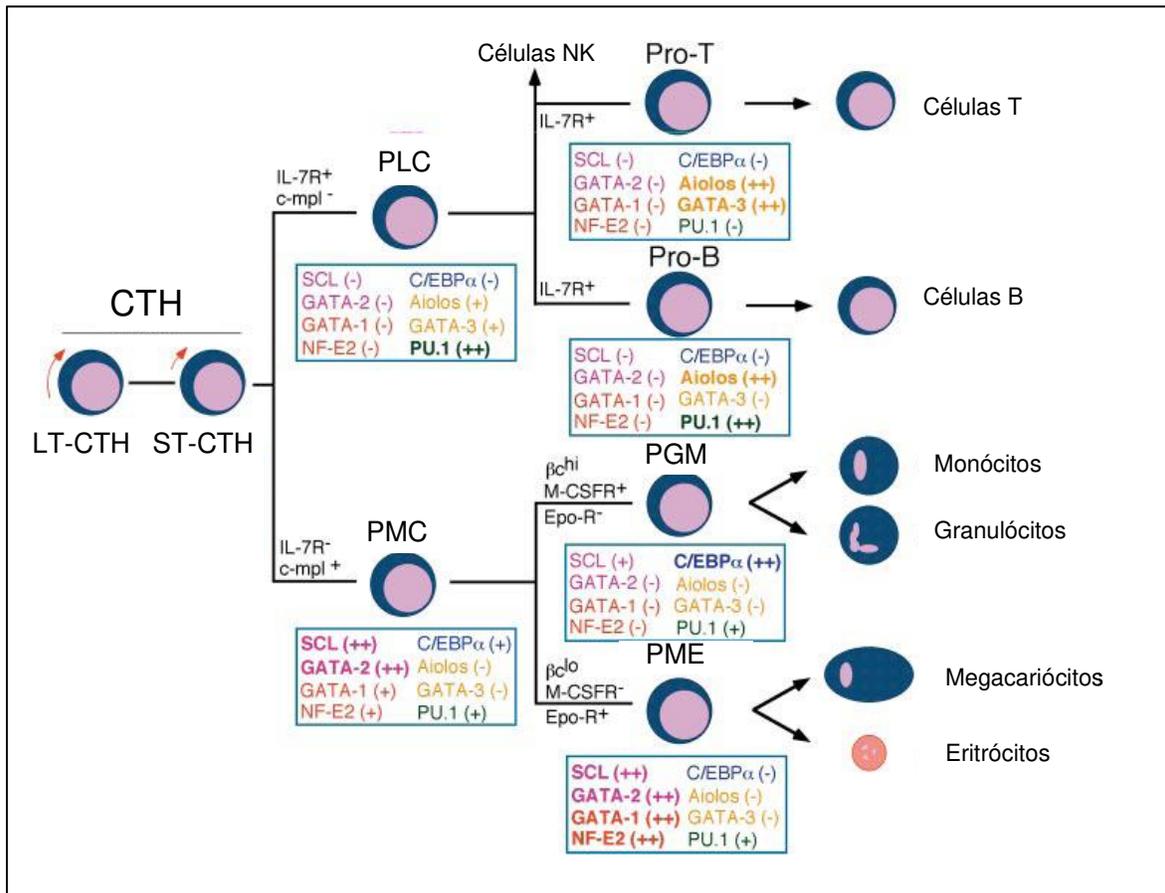


Figura 1.3: Modelo proposto por Weissman (2001) para maturação hematopoética a partir de células tronco hematopoéticas (CTH). Células tronco hematopoética “long-term” (LT-CTH) produzem as células tronco hematopoética “short-term” (ST-CTH), a quais formam progenitor linfóide comum (PLC) que formam todas as linhagens linfóides, e progenitor mielóide comum (PMC) que podem se diferenciar em progenitor para granulócitos/macrófagos (PGM) ou progenitor para megariócitos/eritrócitos (PME).

1.5. Via de sinalização p38MAPK na regulação da hematopoese

A hematopoese é um processo altamente regulado que resulta na formação de diferentes células sanguíneas e, o controle apropriado da auto-renovação e diferenciação de células tronco hematopoéticas é crucial para a manutenção do equilíbrio hematopoético. As citocinas possuem um papel importante na manutenção da homeostasia hematopoética por regular o crescimento, proliferação e diferenciação destas células, através de alterações intra-celulares que resultam na ativação específica de fatores transcricionais e subsequente modulação da expressão do gene alvo (Chang e

Karin, 2001). Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são uma família de serina/treonina quinases que possuem papel fundamental na conexão entre receptores de superfície celular e mudanças no processo transcricional. Elas são altamente expressas e estão envolvidas em uma ampla variedade de funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, migração e apoptose (Dong et al, 2002, Wada e Penninger, 2004, Schaeffer e Weber, 1999, Davis, 2000, Kyriakis e Avruch, 2001, Zarubin e Han, 2001). Três maiores grupos da super família MAPK foram caracterizados em mamíferos: ERKs, JNKs e p38MAPKs (Chang e Karin, 2001, Schaefer e Weber MJ, 1999).

No grupo da p38MAPK foram identificados quatro variantes: p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ das quais a p38 α , p38 β são amplamente expressas (Zarubin e Han, 2005). Essa via está relacionada com uma variedade de estímulos extra celulares como choque osmótico, radiação UV, hipoxia, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (Raman et al, 2007). Sua ativação ocorre através do processo de fosforilação regulando substratos como fatores transcricionais (CEBP/ α , Stat1 e Stat3) e proteínas quinases (RSK).

Estudos recentes mostram o envolvimento da p38MAPK na manutenção da quiescência das células tronco hematopoéticas (Ito et al, 2006, Jang et al, 2007). Essa via aparece constitutivamente ativada em células tronco hematopoéticas obtidas de camundongos deficientes para o gene *Atm*. A deleção desse gene resulta em elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a fosforilação da p38MAPK foi acompanhada de uma diminuição na capacidade de auto renovação e defeitos na manutenção dessas células. Tratamento com antioxidantes ou inibidores da via recuperam a medula óssea dos animais, sugerindo que a via p38MAPK contribui para exaustão de células tronco hematopoéticas em resposta ao estresse oxidativo causado pelas EROs (Ito et al, 2006).

Análises de camundongos deficientes de p38MAPK revelaram que p38 apresenta papel importante na desenvolvimento de vários processos. Embriões de camundongos p38(-/-) não conseguem sobreviver devido a defeitos na angiogênese placentária. Esses embriões exibem morfologia normal, mas apresentam anemia devido ao estresse causado pela eritropoese anormal (Mudgget et al, Tamura et al, 2000). A falta da atividade de p38 está relacionada com uma interferência na estabilização do mRNA da eritropoetina, resultando então na diminuição da expressão do gene para a eritropoetina. A deleção de p38MAPK em camundongos adultos, resulta no aumento da proliferação e

defeitos na diferenciação de progenitores e células do pulmão. Além disso, a p38MAPK tem sido relacionada por regular o processo de diferenciação de vários tipos celulares, incluindo cardiomiócitos, células neuronais, adipócitos, e células imune (Engel et al, 2005, Engelman et al, 1998, Morooka et al, 1998, Simone et al, 2004).

Estudos *ex vivo* utilizando um modelo de diferenciação de células CD34+ estabeleceram a importância da p38 tanto na eritropoese como na mielopoese (Nagata et al, 1999, Geest et al, 2009). Geest (2009) demonstraram que a inibição da p38MAPK aumenta o desenvolvimento neutrofílico e que a ativação constitutiva dessa via bloqueia totalmente a maturação de neutrófilos. Além disso, experimentos *in vivo* usando camundongos NOD/SCID transplantados com células CD34+ expressando MKK3 apresentaram redução do processo de diferenciação de neutrófilos. Os autores mostram ainda que o mecanismo molecular envolvido parece ser através do fator transcricional CEBP/α no qual a fosforilação inibitória deste fator ocorre em resposta a ativação da p38MAPK. CEBP/α é um fator transcricional que apresenta papel crucial na manutenção da mielopoese. Sua expressão é detectada em precursores mielóides regulando principalmente o comprometimento com a linhagem granulocítica. Camundongos deficientes de CEBP/α apresentam falta de neutrófilos e eosinófilos maduros, e acumulam mieloblastos imaturos na medula óssea (Zhang et al, 2002).

Estes achados demonstram que a via p38MAPK é de fundamental importância para regulação da proliferação e diferenciação das células sanguíneas e que a ativação desordenada dessa via pode ser considerada uma causa de desordens hematopoéticas.

2. OBJETIVOS

Constitui objetivo do presente trabalho avaliar os efeitos do tratamento com NTS1 e NTS2 sobre as alterações hematológicas observadas em camundongos Balb/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Para isso, analisamos:

- ❖ a sobrevivência de animais portadores de TAE;
- ❖ capacidade formadora de colônia para granulócitos/macrófagos da medula óssea e baço de animais;
- ❖ a atividade estimuladora de colônias (Colony stimulating activity – CSA) de células hematopoéticas no soro de animais;
- ❖ a atividade de células NK;
- ❖ a capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas, bem como a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10 por estas células;
- ❖ a capacidade proliferativa de macrófagos bem como a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e nitrito;
- ❖ a proliferação e viabilidade de células CD34+;
- ❖ a quantificação de células CD34+;
- ❖ a quantificação de progenitor mielóide comum (PMC) e progenitor para granulócito/macrófago (PGM);
- ❖ a capacidade formadora de colônias para granulócitos/macrófagos (CFU-GM) a partir de células CD34+;
- ❖ o processo de diferenciação a partir de células CD34+;
- ❖ a atividade da via de sinalização MAPK em células CD34+.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Compostos

Os trabalhos de síntese e análise dos compostos derivados do nitroestireno que foram estudados, 1-nitro-2-(E)-2-nitrovinil)benzeno (NTS1) e 1-nitro-3-((E)-nitrovinil)benzeno (NTS2) foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. José Augusto Villar, da Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ), segundo protocolo estabelecido na literatura (Villar et al., 2008). As substâncias foram administradas intraperitonealmente (i.p). O veículo de administração utilizado foi dimetilsulfóxido (DMSO)/solução fisiológica estéril 1:9 (V/V). As soluções foram preparadas diariamente antes da administração.

3.2. Animais

Para a realização dos experimentos utilizamos camundongos BALB/c machos, com idade entre seis e oito semanas, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório- UNICAMP (CEMIB). Os animais foram mantidos em gaiolas forradas com maravalha estéril, em sala climatizada com ciclos claro-escuro de 12 horas. Ração comercial padrão e água foram fornecidos *ad libitum*. Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação animal (CEEA) sob o Protocolo nº 662-1 (em anexo).

3.3. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

A linhagem tumoral de Ehrlich é mantida em nosso laboratório através de sucessivas passagens intraperitoneais entre animais. As células tumorais de Ehrlich crescem de forma ascítica na cavidade peritoneal de camundongos. Para o desenvolvimento do tumor de Ehrlich, camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 0,2 mL de uma suspensão de células tumorais contendo 1×10^3 células/animal, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos doadores. Após a retirada do líquido ascítico do peritônio de camundongos doadores, o número e a viabilidade das células foram determinados pelo método de exclusão do corante Trypan blue 0,2%, em câmara hemocitométrica, considerando adequado no mínimo 95% de viabilidade.

3.4. Realização das curvas de sobrevida

Com a finalidade de avaliar os efeitos da administração terapêutica de NTS1 e NTS2 na sobrevida dos animais portadores de TAE, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=10), a saber:

1) animais controle positivo, portadores de TAE e sem tratamento;

2, 3, 4, 5, 6 e 7) animais portadores de TAE, tratados com NTS1 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/Kg;

8, 9, 10, 11, 12 e 13) animais portadores de TAE, tratados com NTS2 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/Kg.

Todos os animais foram inoculados intraperitonealmente com 0,2 ml de uma suspensão de células tumorais contendo 1×10^3 células/animal. A administração de NTS1 e NTS2 foi realizada via i.p. nas doses de 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/Kg, utilizando-se salina como veículo de administração, uma vez por semana durante três semanas consecutivas após a inoculação destas células (tratamento terapêutico– grupo 2 a 13). Os animais controle receberam somente o veículo acima mencionado, durante os dias de tratamento. Observamos os animais por um período de 50 dias.

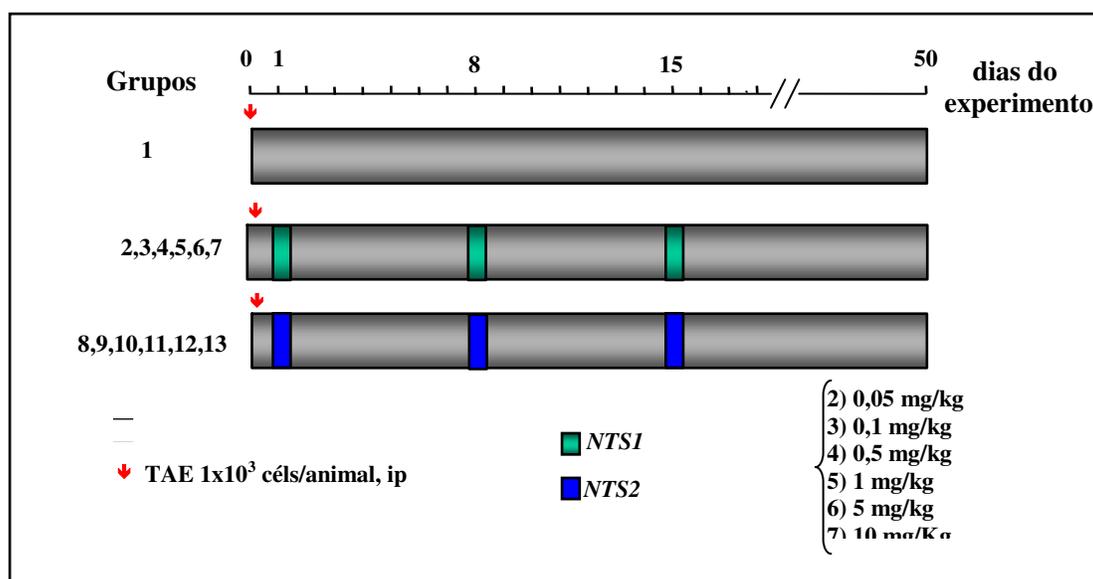


Figura 3.1: Protocolo experimental para avaliação do efeito do tratamento terapêutico de diferentes doses de NTS1 e NTS2 (0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/Kg) na sobrevida de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich.

3.5. Tratamento dos animais

Com a finalidade de avaliar os efeitos da administração terapêutica de NTS1 e NTS2 na manutenção da hematopoese, atividade estimuladora de colônias de células hematopoéticas no soro, atividade de células NK, capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas, bem como a produção de IFN- γ , IL-2 e IL-10 por estas células e proliferação e atividade de macrófagos através da determinação dos níveis de TNF- α , IL-1, IL-10 e nitrito de animais portadores de TAE, os animais foram divididos em grupos experimentais de 6 animais e submetidos ao seguinte protocolo de tratamento:

- 1) animais controle negativo, não portadores de TAE e sem tratamento (**CTRL**);
- 2) animais controle positivo, portadores de TAE e sem tratamento (**TAE**);
- 3) animais portadores de TAE, tratados com NTS1 (**NTS1+TAE**);
- 4) animais tratados com NTS1, não portadores de TAE (**NTS1**);
- 5) animais portadores de TAE, tratados com NTS2 (**NTS2+TAE**);
- 6) animais tratados com NTS2, não portadores de TAE (**NTS2**);

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados no segundo (a), nono (b) e décimo sexto (c) dia após inoculação do TAE.

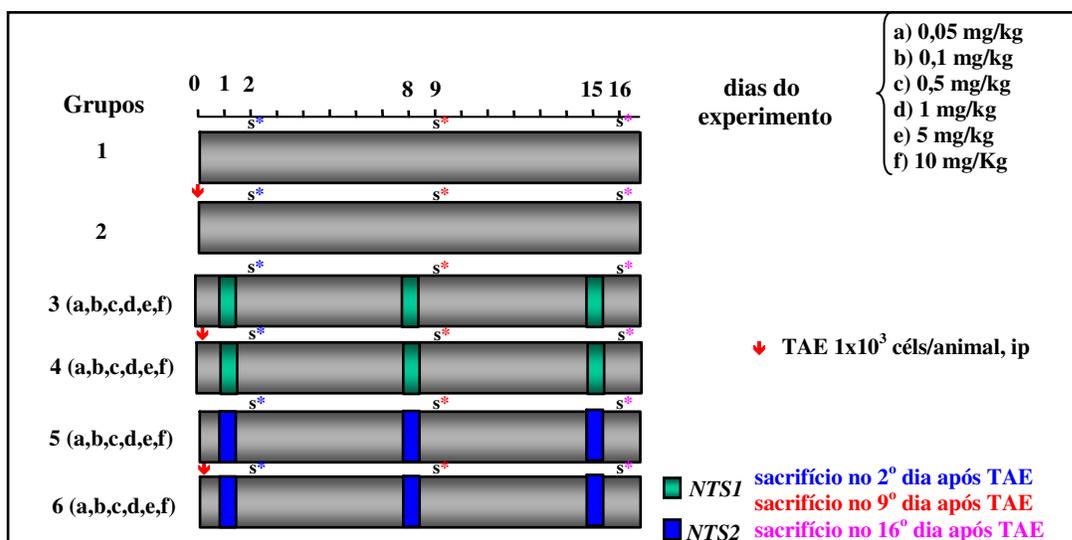


Figura 3.2: Protocolo experimental para avaliação de NTS1 e NTS2 na manutenção da hematopoese, atividade estimuladora de colônias de células hematopoéticas no soro, atividade de células NK, capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas, bem como a produção de IFN- γ , IL-2 e IL-10 por estas células e proliferação e atividade de macrófagos através da determinação dos níveis de TNF- α , IL-1, IL-10 e nitrito em modelo experimental *in vivo* de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich.

3.6. Ensaio de unidade formadora de colônia para granulócitos/macrófagos da medula óssea

1.1.1 Preparo de culturas de medula

Após a morte por deslocamento cervical, os animais submetidos aos diferentes tratamentos descritos no item 3.5 foram mergulhados em álcool 70%. Os fêmures foram coletados e a medula óssea foi transferida com auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI-1640 (Cultilab). As suspensões celulares foram mantidas no gelo. O número de células na suspensão foi contada em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em azul-tripán 0,2 %. Alíquotas contendo 1×10^5 células foram adicionadas a 2 mL do meio semi-sólido que consiste de: 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Difco) 2X concentrado; 20% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab) e 50% de Agar (Bacto-ágar Difco). A seguir, distribuímos volumes de 2,0 ml em cada placa de Petri, as quais já continham 100 μ L de recombinante GM-CSF (0,5

ng/mL) (Sigma). Incubamos por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ no ar e a seguir contamos o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40X.

1.1.2 Preparo de culturas do baço

Baços de camundongos submetidos aos tratamentos referidos no item 3.5 foram coletados assepticamente e colocados em tubos do tipo Falcon (15 mL) contendo meio RPMI-1640 (Cultilab). As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH₄Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após 3 lavagens com meio RPMI-1640 o número de células na suspensão foi contada em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em azul-tripán 0,2 %. Alíquotas contendo 2 x 10⁵ células foram adicionadas a 2 mL do meio semi-sólido que consiste de: 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Difco) 2X concentrado; 20% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab) e 50% de Agar (Bacto-ágar Difco). A seguir, distribuimos volumes de 2,0 ml em cada placa de Petri, as quais já continham 100 µL de recombinante GM-CSF (0,5 ng/mL) (Sigma). Incubamos por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ no ar e a seguir contamos o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40X.

1.1.3 Avaliação da atividade estimuladora de colônias (CSA)

O sangue dos animais submetidos aos referidos tratamentos (rever item 3.5) foi coletado por punção cardíaca, sendo separado em "pools", centrifugado para obtenção do soro e armazenado a -20°C. A atividade dos fatores estimuladores de colônias no soro dos animais foi determinada pela capacidade de induzir o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos da medula óssea de animais normais. A atividade estimuladora de colônias foi expressa em unidades por mL e determinada a partir de curva de titulação. De acordo com Van Den Engh & Bol (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias é considerada como 1 unidade de CSF.

3.7. Avaliação da atividade citotóxica de células “Natural Killer” (NK)

3.7.1. Manutenção e preparo das células alvos

Para o ensaio de atividade citotóxica das células natural killer, as células alvo utilizadas pertencem à linhagem tumoral YAC-1, linfoma de célula T originário A/SN induzido pelo vírus Maloney. Esta linhagem celular cresce em suspensão e foi mantida em cultura contínua *in vitro* em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Para o ensaio de citotoxicidade, 5 x 10⁶ células alvo foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% SBF e ressuspensas em 0,2 mL de SBF. Em seguida, as mesmas foram marcadas com 100 µCi de Na₂⁵¹CrO₄ por um período de 90 minutos a 37°C sob agitação periódica. Novamente, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF e ajustou-se a concentração celular para 1 x 10⁵ células/mL.

3.7.2. Células efetoras esplênicas

Dois, nove e dezesseis dias após a inoculação do TAE, baços de camundongos submetidos aos tratamentos referidos no item 3.5 foram coletados assepticamente e colocados em tubos do tipo Falcon (15 mL) contendo meio RPMI-1640. As células mononucleares foram separadas em gradiente ficoll-hypaque (d=1,077) (Sigma), lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF e incubadas em placa de Petri de vidro (100x20 mm) por 2 h em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células não aderentes (sobrenadante) foram cuidadosamente aspiradas da placa, lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF, ajustando-se a concentração para 5 x 10⁶ células/mL. A atividade citotóxica das células NK foi avaliada contra as células alvo YAC-1 (célula de referência para NK), em ensaio de liberação de ⁵¹Cr.

3.7.3. Ensaio de liberação de ⁵¹Cr

Em microplacas de cultura (96 wells Corning) foram adicionados 100µL da suspensão de células efetoras, em triplicata, com reserva de três poços para a lise espontânea (100 µL de SBF ou meio de cultura) e outros 3 para a lise máxima (100 µL de Triton X-100 50%). A seguir, 100 µL de células alvo previamente marcadas com ⁵¹Cr

foram distribuídos nos poços de reação e controles. Após centrifugação a 800 rpm por 5 minutos, a placa foi incubada por 4 h em estufa úmida a 37° e 5% CO₂. A seguir, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm e 100 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos plásticos. A leitura foi realizada em contador gama (Gamma Counter 5500BBeckman) e os resultados expressos em porcentagem de lise específica.

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

3.8. Proliferação de células mononucleares esplênicas

Baços de camundongos submetidos aos tratamentos referidos no item 3.5 foram coletados assepticamente e colocados em tubos do tipo Falcon (15 mL) contendo meio RPMI-1640. As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH₄Cl 0,85% Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após 3 lavagens com meio RPMI-1640, as células foram ajustadas a uma concentração de 1x10⁶ células/mL em meio RPMI-1640 completo suplementado com 5% de SBF. Com a finalidade de avaliar a capacidade proliferativa das células mononucleares esplênicas, em cada poço da placa de microcultura (96 wells-Corning) foram adicionados 200 µL da suspensão celular em presença de solução de Concanalina A (Con A) (5µg/mL) (Sigma). O ensaio foi realizado em triplicata para cada animal. As placas foram mantidas 72 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Dezoito horas antes do término dos cultivos, 1,0 µCi de Timidina tritiada (³H) (Amershan Pharmacia Biotech) foi adicionada. Completado o período de incubação, a Timidina ³H incorporada às células em proliferação foi determinada em cintilador (Beckman LS 6000 Series Scintillation System, USA). De acordo com os resultados fornecidos da radioatividade incorporada pelas células, foi possível definir se houve ou não ativação e proliferação celular. Os resultados foram obtidos subtraindo-se a média das cpm das triplicatas estimuladas pela média com das triplicatas basais correspondentes.

Para quantificação de esplenócitos CD4+ os animais foram sacrificados no 16º dia após a inoculação do tumor e as células do baço foram marcadas com anticorpo específico FITC anti-mouse CD4+ (eBioscience), e seguindo o protocolo indicado pelo

respectivo fabricante. As amostras foram lidas em Citômetro de Fluxo FACScalibur FACS Calibur (Becton-Kickinson, Mountain View, CA).

Para avaliar a produção de IFN- γ , IL-2 e IL-10, em placa de cultura de 24 wells (Corning), foram adicionados 800 μ L de meio RPMI-1640 enriquecido com 5% de SBF em cada poço e, em seguida, 200 μ L de suspensão celular em presença de solução de Con A (5 μ g/mL) (Sigma). As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Após 48 h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada poço e congelado a – 20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de citocina conforme item 3.12.

3.9. Caracterização e cultivo de macrófagos peritoneais

Os macrófagos foram assepticamente coletados dos camundongos submetidos aos tratamentos referidos no item 3.5, por lavagem peritoneal com 10 mL de meio RPMI-1640 a 4°C. O lavado peritoneal foi coletado em tubo plástico e mantido no gelo. O número e a viabilidade dos macrófagos foram determinados pela exclusão do corante azul-tripan (0,2%) e também utilizando o corante vermelho neutro, em câmara hemocitométrica, considerando adequado no mínimo 95% de viabilidade. A população de macrófagos nas diferentes amostras foi quantificada através de Citometria de Fluxo utilizando-se o anticorpo específico FITC anti-mouse Mac-3 (eBioscience), e seguindo o protocolo indicado pelo respectivo fabricante. As amostras foram lidas em Citômetro de Fluxo FACScalibur FACS Calibur (Becton-Kickinson, Mountain View, CA.).

3.9.1. Obtenção de sobrenadante de cultura para dosagem de citocinas

As suspensões de células peritoneais de cada camundongo foram transferidas (1x10⁶ macrófagos/well), em triplicata para placa de cultura de 24 wells (Corning). As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas. Após este período as células não aderentes foram cuidadosamente aspiradas da placa. Adicionamos 1mL de meio RPMI-1640 enriquecido com 5% de SBF em cada poço e, em seguida, solução de LPS (1 μ g/mL) (Sigma). Como controles, células de cada amostra foram cultivadas na ausência de LPS para controle. As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Após 24h, o sobrenadante foi coletado individualmente de

cada poço e congelado a -20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de citocina conforme item 3.12.

3.9.2. Produção de nitrito (NO_2^-)

Os macrófagos foram transferidos (1×10^5 macrófagos/well) para micro placa de cultura (96 wells- Corning). As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO_2 por 2 horas. Após este período as células não aderentes foram cuidadosamente aspiradas da placa. Em seguida, 100 μL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF foram transferidos para cada poço da placa juntamente com solução de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma) Simultaneamente, incubamos células de cada amostra sem LPS para controle. As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. A produção de NO foi determinada, segundo o método colorimétrico baseado na reação de Griess descrito por Green et al (1981). Para isso, 100 μL dos sobrenadantes foram transferidos para micro placa de cultura (96 wells- Corning) às quais foram adicionados 100 μL do reagente de Griess (Sigma). As amostras foram lidas em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540nm contra um branco constituído por reagentes de Griess. Os resultados foram expressos em μmols de NO_2^- por 1×10^5 células, comparando-se a D.O. com uma curva padrão em concentrações conhecidas de NO_2^- .

3.10. Quantificação de citocinas

As citocinas foram quantificadas conforme descrito abaixo:

- Sobrenadante de culturas de células mononucleares esplênicas: IFN- γ , IL-2 e IL-10;
- Sobrenadante de cultura de macrófagos peritôneais: TNF- α , IL-1 e IL-10.

As citocinas foram quantificadas através do método imunoenzimático (ELISA) utilizando-se Kits de anticorpos monoclonais anti-mouse específicos para cada citocina [R&D System, Kit DuoSet[®]– ELISA Development System: IL-1 α /IL-1F1, TNF- α /TNFSF1A, IFN- γ , IL-2 e IL-10. A quantificação foi realizada em placa de microcultura para ELISA (96 wells), seguindo a indicação do fabricante para utilização de cada Kit. A leitura foi realizada em leitor de ELISA ($\lambda = 450 \text{ nm}$) (Labsystem) e os resultados expressos em pg/mL .

3.11. Isolamento e cultura de células CD34+

As células mononucleares foram isoladas do sangue do cordão umbilical e separadas com gradiente Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/mL). Foi utilizada separação imunomagnética (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) utilizando anticorpo anti-CD34 conjugado a "beads". As células foram ajustadas para a concentração de $1.0-2.0 \times 10^5$ /mL células em meio IMDM (Gibco) suplementado com 8% de SBF (Hyclone), 50 $\mu\text{mol/L}$ de β -mercaptanol, 10 unidades/mL de penicilina, 10 $\mu\text{mol/L}$ de estreptomicina e 2 mM de glutamina. As células foram diferenciadas em neutrófilos por 17 dias adicionando fator estimulador de colônia (CSF) (50 ng/mL), ligante FLT-3 (50 ng/mL), fator estimulador de colônia para granulócito/macrófago (GM-CSF) (0.1 nmol/L), interleucina 3 (IL-3) (0.1 nmol/L), e fator estimulador de colônia para granulócito (G-CSF) (30 ng/mL) (todos da Cell Signaling Technology). A cada 3 dias, o número de células na suspensão foi contada em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em azul-tripán 0,2 % e o meio foi renovado com a adição de 5×10^5 células/mL. Após 3 dias de diferenciação apenas G-CSF foi adicionado ao meio. Os compostos NTS1 (0,5, 1 e 5 μM) e NTS2 (0,5, 1 e 5 μM) foram adicionados ao meio a cada 3 dias. As células do cordão umbilical foram coletadas após consentimento de acordo com a declaração de Helsinque. Os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética da University Medical Center Utrecht.

3.12. Avaliação da apoptose

As células nas culturas foram coletadas nos dias 7, 10 e 14 da cultura e lavadas com PBS. As amostras foram incubadas por 15 minutos com AnnexinV-FITC (Alexis) em solução de ligação (10 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl_2). As células foram lavadas e ressuspensas em solução de ligação juntamente com 1 μM de iodeto de propídio (Alexis). Porcentagens de apoptose foram (Annexin V- e iodeto de propídio positivos) determinadas por análises de citometria de fluxo (FACS Canto, Becton Dickinson, Alphen a/d Rijn, The Netherlands).

3.13. Análise histoquímica de células hematopoiéticas

Marcação com May-Grunwald/Giemsa foi utilizada para analisar a diferenciação mielóide. Citospin foi preparado com 5×10^4 células as quais foram fixadas em metanol por 3 minutos. Após a fixação foram marcadas com solução de azul de eosina 50% de

acordo com May-Grunwald (Sigma) por 15 minutos. Em seguida lavadas por 5 segundos, e o núcleo foi marcado com solução de Giemsa (Merck kGaA) por 20 minutos. A diferenciação de neutrófilos pode ser caracterizada por estágios distintos: mieloblastos, pró-mielócito I, pró-mielócito II, mielócito, metamielócito e neutrófilos maduros com núcleo segmentado. Fotografias foram feitas após a marcação com May-Grunwald/Giemsa utilizando microscópio Axiostar plus (Carl Zeiss, Sliedrecht, The Netherlands).

3.14. Marcação com lactoferrina

As células CD34+ foram colocadas em cultura na presença de G-CSF para induzir a diferenciação de neutrófilos. Após 17 dias de cultivo, as células foram fixadas em 100 µL de formaldeído 0,5% por 15 minutos a 37°C e em seguida permeabilizadas em 900 µL de metanol gelado por 30 minutos. As células foram lavadas com PBS, ressuspensas em solução contendo anticorpo para lactoferrina conjugada com ficoeretrina (PE) (Immunotech) por 25 minutos. As células foram novamente lavadas e analisadas em Citômetro de Fluxo (FACS Canto, Becton Dickinson, Alphen a/d Rijn, The Netherlands).

3.15. Análise de Western blot

A análise de Western blot foi realizada utilizando técnica padrão (Towbin et al, 1979). Células CD34+ em processo de diferenciação foram lisadas com solução Laemmli [0.12 mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 0.05 µg/µL bromophenol blue e 35 mmol/L β mercaptoethanol], sonicadas e aquecidas por 5 minutos. Quantidades iguais do lisado total foram analisadas por gel SDS 10% (Laemmli, 1970). As proteínas foram transferidas para membrana de di-flúor polivinilideno, incubadas com solução bloqueadora (Tris/Tween20) contendo 5% de leite por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida incubada com anticorpos contra p-p38, p38, p-CEBP-α, CEBP-α ou contra tubulina (todos da Cell Signaling Technology) overnight a 4°C em solução contendo Tris/Tween20 com 5% de albumina fetal bovina (BSA). A membrana então foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente. Quimiluminescência foi utilizada como método de detecção (Amersham Pharmacia, Amersham, United Kingdom).

3.16. Análise de citometria de fluxo para células progenitoras mielóides

As células CD34+ foram colocadas em cultura na presença de G-CSF para induzir a diferenciação de neutrófilos. Após 3 e 7 dias de cultivo, as células foram lavadas e ressuspendidas em PBS e SBF (5%) e subsequentemente incubadas por 30 minutos no gelo com uma mistura de anticorpos. Células com característica de não linhagem são negativas para os marcadores (todos da Becton Dickinson) CD2, CD3, CD4, CD7, CD14 e CD235a. As células da população linhagem negativa (Lin-), CD34+ e CD38- são consideradas células tronco hematopoéticas (CTH). Lin-, CD34+, CD38+, CD123+ e CD45RA- são consideradas progenitor mielóide comum (PMC) Lin-, CD34+, CD38+, CD123+ e CD45RA+ são consideradas progenitor para granulócito/macrófago (PGM). As populações celulares contendo CTH, PMC e PGM foram caracterizadas por análise de Citometria de Fluxo (FACS Canto, Becton Dickinson, Alphen a/d Rijn, The Netherlands). Células marcadas com controles isotópicos foram utilizadas para a correta seleção das populações.

3.17. Ensaio de unidade formadora de colônia (CFU)

Quinhentas células CD34+ foram plaqueadas em meio IMDM (Gibco) suplementado com 35% de SBF 44,4% de metilcelulose (Stem Cell Technology), 11.1 µmol/L de β-mercaptoethanol, 2.2 units/mL de penicilina, 2.2 µg/mL de estreptomicina e 0.44 mmol/L de glutamina. Os ensaios de CFU foram realizados na presença de SCF (50 ng/mL), ligante para FLT-3 (50ng/mL), GM-CSF (0.1 nmol/L), IL-3 (0.1 nmol/L), G-CSF (60 ng/mL) (todos da Cell Signaling Technology) e os compostos NTS1 e NTS2 em uma dose única. Incubamos por onze dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ e em seguida foi realizada a contagem das colônias de CFU-GM (granulócito/macrófago), CFU-G (granulócito) e CFU-M (macrófago).

3.18. Análise Estatística

Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi utilizada Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que houve diferença significativa, o Teste de Tukey foi utilizado para detectar diferenças existentes entre todos os grupos.

As curvas de sobrevida foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Maier (1958) (Collet 1994). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (procedimentos não paramétricos).

Os gráficos apresentam as médias e desvios-padrão dos diferentes grupos. Consideramos estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade in vivo dos compostos NTS1 e NTS2 utilizando o tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

4.1.1. Análise da sobrevivência

A eficácia do tratamento com NTS1 e NTS2 em camundongos portadores de TAE está representada na Figura 4.1 e 4.2, respectivamente. Como podemos observar todos os camundongos apenas portadores de TAE morreram até o 30º dia após a inoculação do tumor. Resultados semelhantes foram observados com os animais portadores de tumor tratados com a dose de 0,05 mg/Kg tanto de NTS1 como de NTS2. Por outro lado, o tratamento com as doses de 0,1 de NTS1 (Figura 4.1) e 1 mg/Kg de NTS2 (Figura 4.2) prolongaram 60% e 50% respectivamente a sobrevivência de animais portadores de TAE, comparado com os animais apenas portadores do tumor ($P < 0,001$). Sendo consideradas as menores doses efetivas.

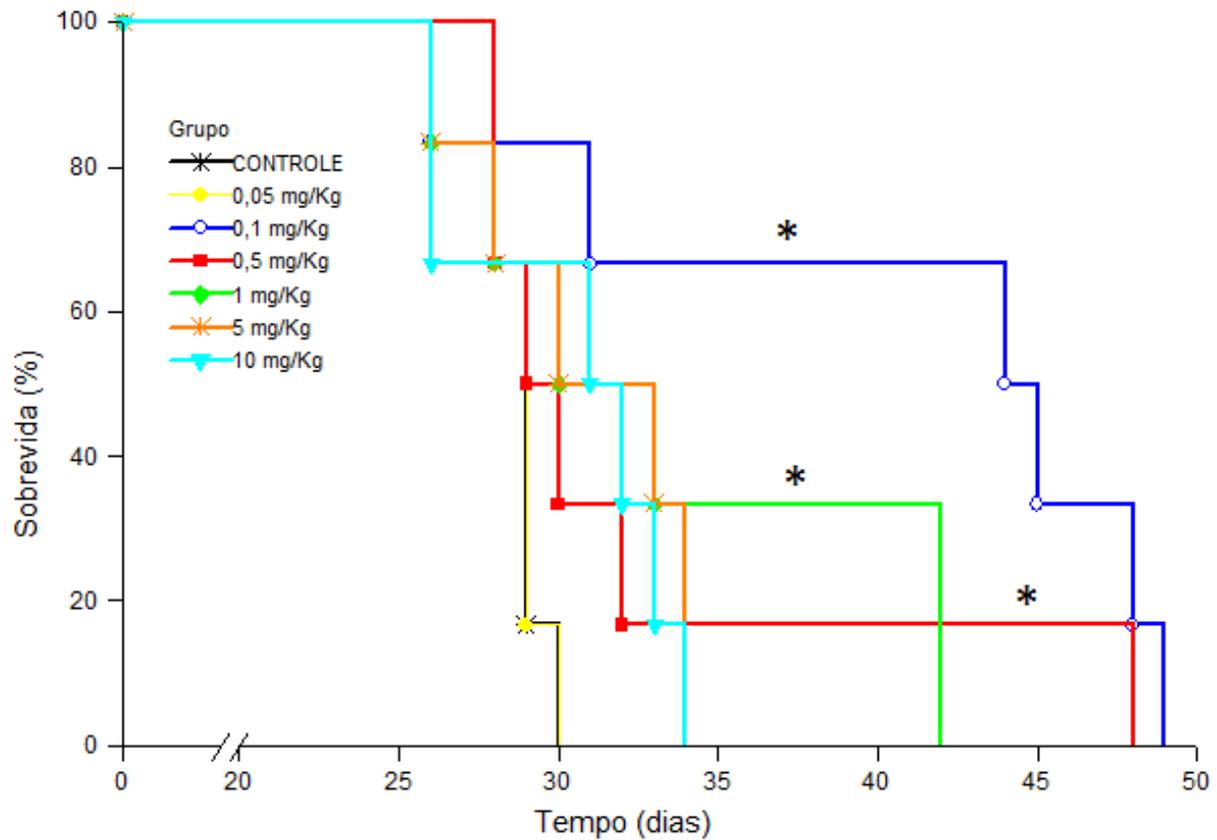


Figura 4.1: Efeito do tratamento com NTS1 na sobrevivência de camundongos Balb/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com diferentes doses de NTS1 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/kg por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os animais controle receberam apenas diluente. Grupos de 20 animais foram observados diariamente. $P < 0,001$ comparado com o grupo controle (Kaplan-Meier).

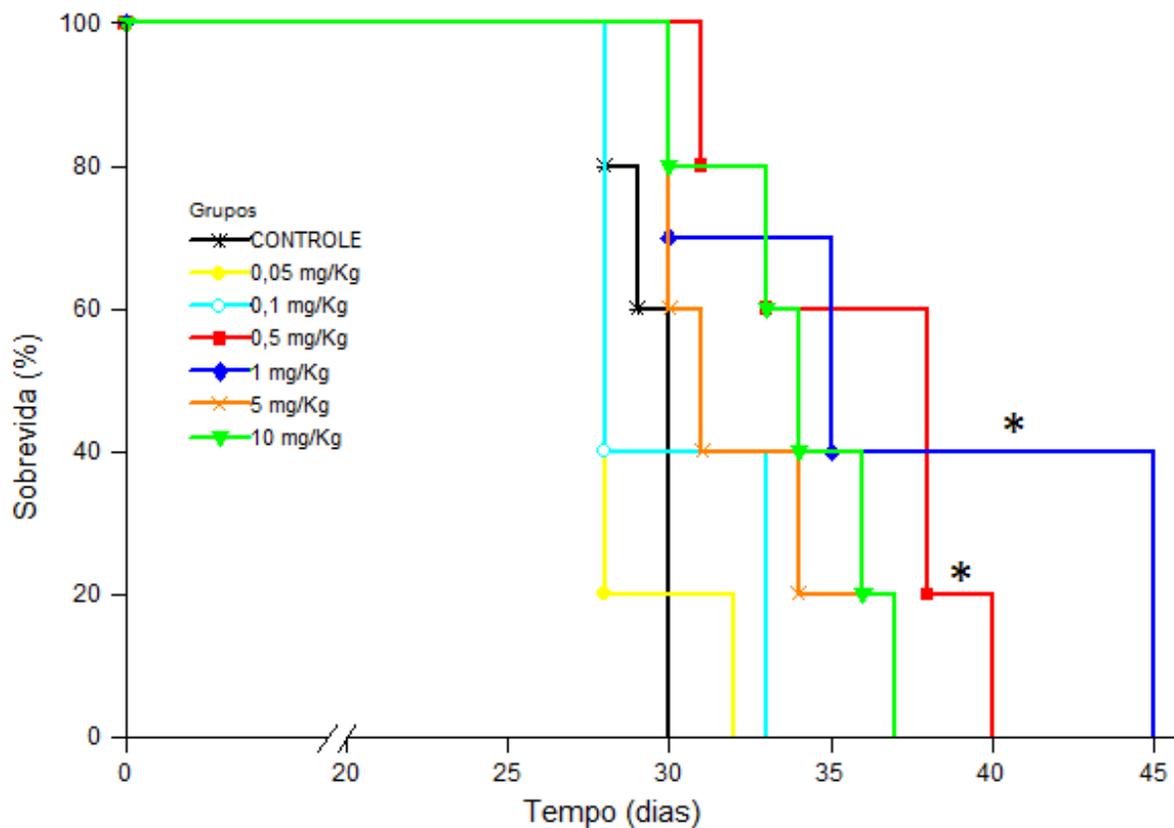
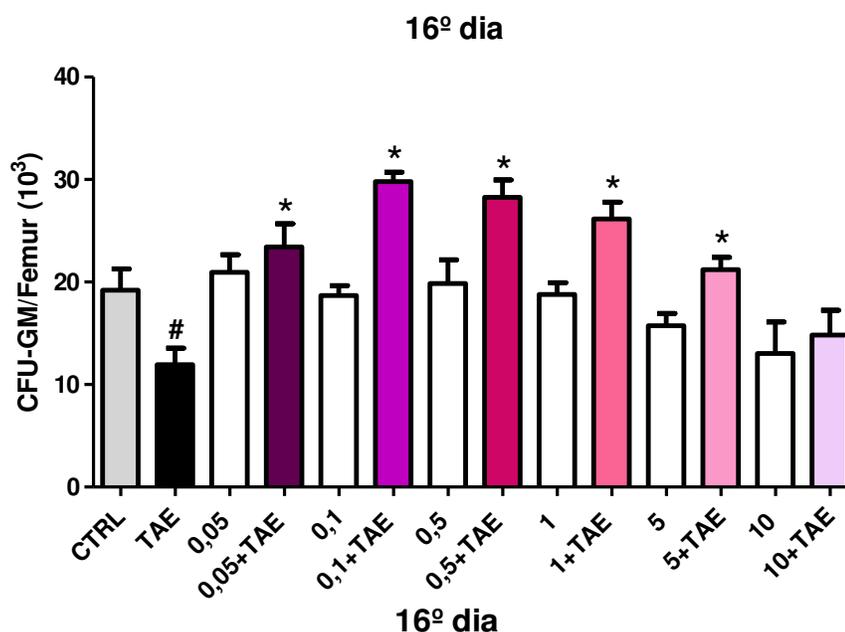


Figura 4.2: Efeito do tratamento com NTS2 na sobrevida de camundongos Balb/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com diferentes doses de NTS2 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/kg por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os animais controle receberam apenas diluente. Grupos de 20 animais foram observados diariamente. $P < 0,001$ comparado com o grupo controle (Kaplan-Meier).

4.1.2. Ensaio de unidade formadora de colônia para granulócitos/macrófagos da medula óssea e baço de animais normais e portadores de TAE

Os resultados do tratamento com as doses de 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/kg tanto de NTS1 como de NTS2 sobre o número de CFU-GM da medula óssea e baço de animais normais e portadores de TAE estão apresentados na Figura 4.3 e 4.4 respectivamente. Em animais normais, o tratamento com as diferentes doses dos compostos não produziu alterações significativas no número de CFU-GM medular quando comparado com o grupo controle. Nos animais portadores de TAE, observamos uma drástica mielossupressão quando comparado com o grupo controle ($P < 0,001$), o que corrobora com estudos anteriores de nosso laboratório. No entanto, exceto a dose de 10mg/Kg de NTS1, o tratamento com todas as doses tanto de NTS1 (Figura 4.3A) como de NTS2 (Figura 4.3B) foi capaz de reverter a mielossupressão causada pelo tumor. As doses de 0,1 mg/Kg de NTS1 e 1 mg/Kg NTS2 foram as doses mais efetivas quando comparadas com as demais ($P < 0,001$), resultado que corrobora com a análise de sobrevivência. Neste sentido, selecionamos as doses de 0,1 mg/Kg de NTS1 e 1 mg/Kg NTS2 para o estudo dos demais parâmetros, tanto hematopoéticos como imunológicos.

A)



B)

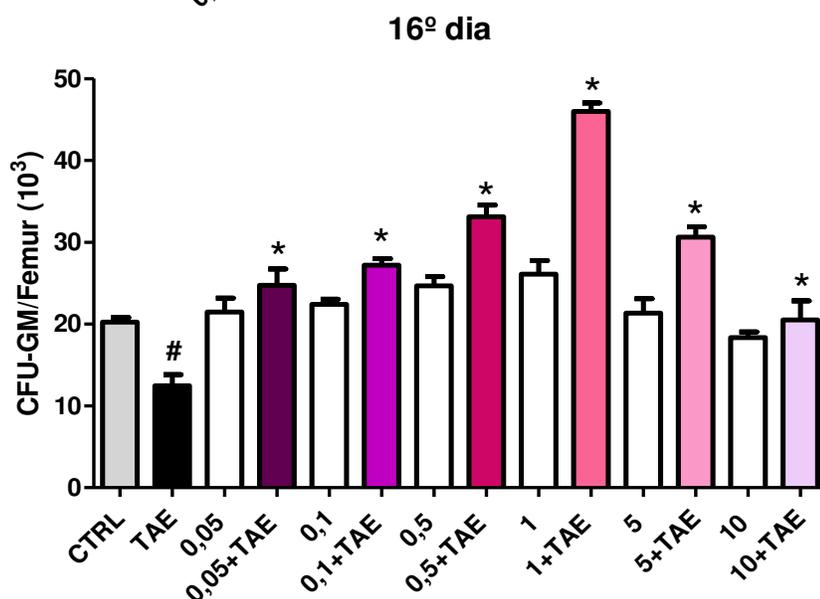
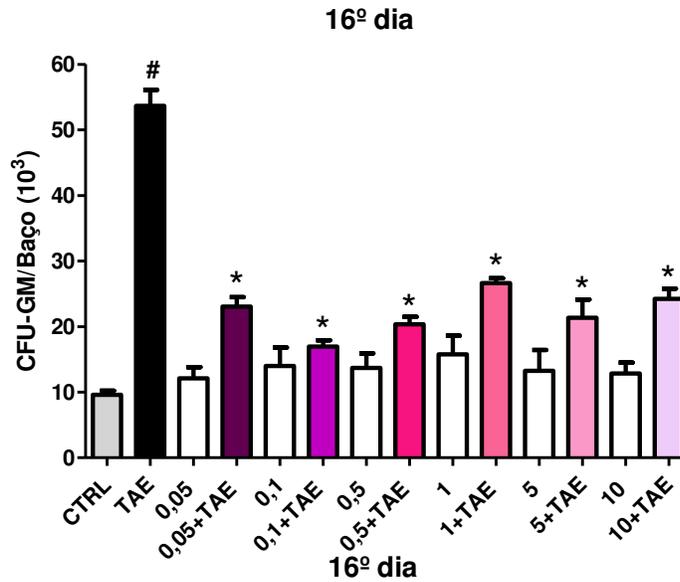


Figura 4.3: Efeito do tratamento com NTS1 (A) e NTS2 (B) nas unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos Balb/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com diferentes doses (0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados no 16º dia após a inoculação do tumor. Os fêmures de cada animal foram coletados e a medula óssea foi transferida com auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI-1640. O número de células na suspensão foi contada em câmara hemocitométrica e adicionadas em volume apropriado (1×10^5 células/ml) em meio mais ágar que consiste de: 30% de meio DMEM 2X concentrado; 20% de soro bovino fetal e 50% de ágar. O ensaio de CFU, realizado em triplicata para cada animal foi incubado por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ no ar e a seguir contamos o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40X. Os valores representam a média \pm D.P. de 6 animais por grupo. # $P < 0,001$ comparado ao controle; * $P < 0,001$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

Em relação à hematopoese extramedular (Figura 4.4), podemos observar que o tratamento tanto de NTS1 como de NTS2 de animais normais não alterou o número de CFU-GM esplênico dos animais. Em animais portadores do tumor ocorreu um aumento expressivo no número de CFU-GM quando comparado ao grupo controle ($P < 0,001$). O tratamento com os dois compostos foi capaz de reverter este aumento de colônias esplênicas com todas as doses testadas ($P < 0,001$), atingindo valores similares aos observados no grupo controle. Novamente as doses de 0,1 mg/Kg de NTS1 e 1 mg/Kg NTS2 foram as doses mais efetivas.

A)



B)

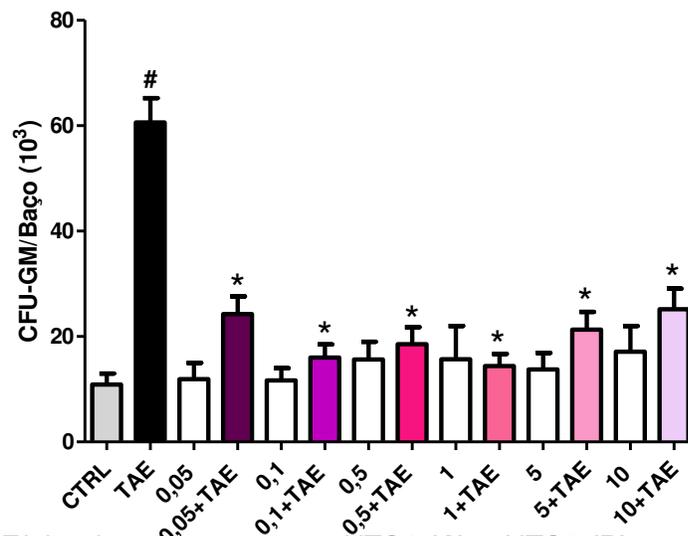


Figura 4.4: Efeito do tratamento com NTS1 (A) e NTS2 (B) nas unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos Balb/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com diferentes doses (0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados no 16º dia após a inoculação do tumor. Baços de camundongos foram coletados assepticamente e colocados em tubos contendo meio RPMI 1640. As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH₄Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após 3 lavagens com meio RPMI o número de células na suspensão foi contada em câmara hemocitométrica e adicionadas em volume apropriado (1×10^5 células/ml) em meio mais ágar que consiste de: 30% de meio DMEM 2X concentrado; 20% de soro bovino fetal e 50% de ágar. O ensaio de CFU, realizado em triplicata para cada animal, foi incubado por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ no ar e a seguir contamos o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40X. Os valores representam a média \pm D.P. de 6 animais por grupo. # $P < 0,001$ comparado ao controle; * $P < 0,001$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.1.3. Atividade estimuladora de colônia (CSA)

Os efeitos de NTS1 e NTS2 na atividade estimuladora de colônias de células da medula óssea de animais normais estão ilustrados na Figura 4.5A e 4.5B respectivamente. Podemos observar que o tratamento de animais normais tanto com NTS1 como com NTS2 duplicou o número de CSA quando comparado aos animais controle ($P < 0,001$) nos três períodos estudados. A presença do tumor induziu um aumento progressivo da CSA de 100, 138 e 128%, respectivamente no 2º, 9º e 16º dias de evolução tumoral, quando comparado aos animais controle ($P < 0,001$). O tratamento destes animais com NTS1 produziu um aumento adicional na CSA, equivalente a em média de 51% ($P < 0,001$) nos três períodos avaliados. Já com NTS2 o aumento médio foi de 81% quando comparado aos animais apenas portadores de TAE ($P < 0,001$).

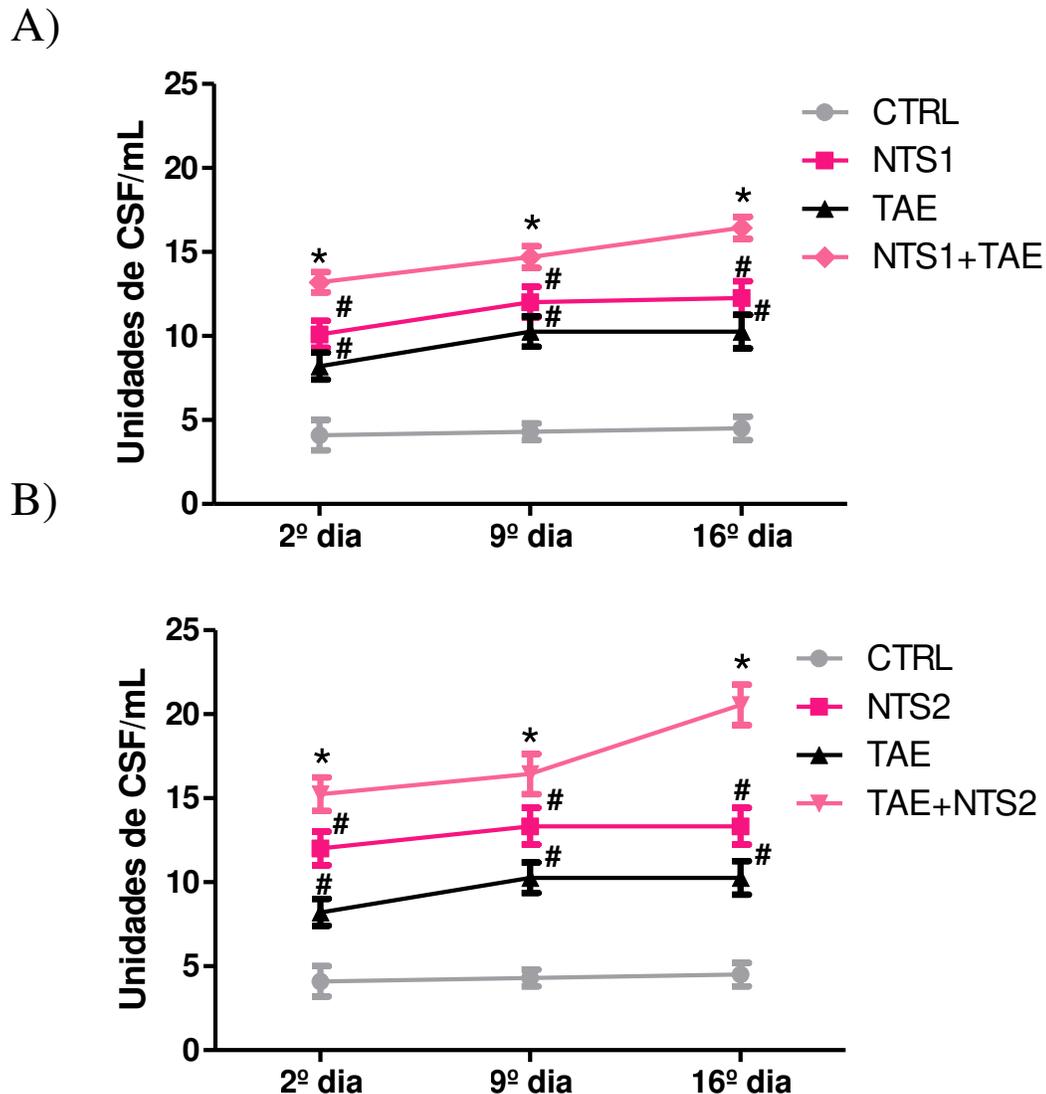


Figura 4.5: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 na atividade estimuladora de colônias (unidades de CSF/mL) no soro de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1mg/Kg de NTS1 (**A**) e 1mg/Kg de NTS2 (**B**) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca, sendo separado em “pools”, centrifugado para obtenção do soro e armazenado a -20°C . A atividade dos fatores estimuladores de colônias no soro dos animais foi determinada pela capacidade de induzir o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos de células da medula óssea de animais normais. A atividade estimuladora de colônias foi expressa em unidades por mL e determinada a partir de curva de titulação. De acordo com Van Den Engh & Bol (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias é considerada como 1 unidade de CSF. Os valores representam a média \pm D.P. de triplicatas por grupo. # $P < 0,001$ comparado ao controle; * $P < 0,001$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.1.4. Atividade citotóxica de células Natural Killer

A atividade citotóxica de células NK provenientes de suspensão de células esplênicas não aderentes foi avaliada através do teste de citotoxicidade clássico baseado na liberação de cromo. Como podemos observar na Figura 4.6A, em todos os períodos avaliados a atividade citotóxica de células NK aumentou em média 34% no grupo tratado com NTS1 quando comparado ao grupo controle ($P < 0,001$). O grupo apenas portador de TAE apresenta uma diminuição desta atividade em média de 52% ($P < 0,001$) quando comparada ao grupo controle. A atividade dessas células é revertida totalmente no grupo de animais portadores de TAE tratados com NTS1, representado pelo aumento de 300% ($P < 0,001$) em relação ao grupo portador do tumor. Por outro lado, o tratamento com NTS2 em animais portadores do tumor não apresentou ação significativa na atividade citotóxica de células NK quando comparados aos animais apenas com TAE (4.6B). O grupo que apenas recebeu NTS2 apresentou inibição desta atividade quando comparado aos animais normais a partir do 9º dia de tratamento.

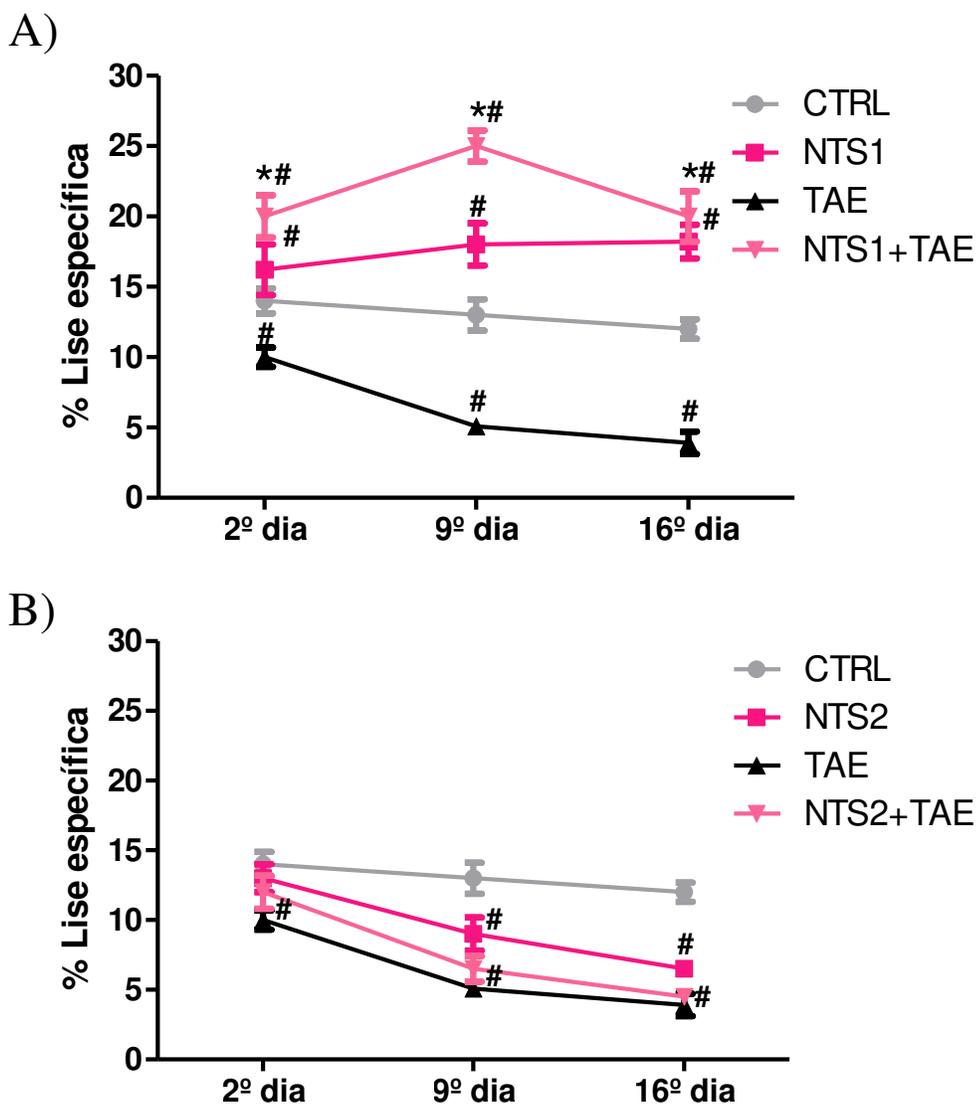


Figura 4.6: Efeito do tratamento com NTS1 e NTS2 sobre a atividade lítica de células NK de camundongos Balb/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1mg/Kg de NTS1 (A) e 1mg/Kg de NTS2 (B) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). Baços de cada camundongo foram coletados assepticamente, colocados em tubos contendo meio RPMI 1640 e as células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, As células mononucleares foram separadas em gradiente ficoll-hypaque ($d=1,077$), lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF. A suspensão de células efectoras, juntamente com células alvo (YAC-1) previamente marcadas com ^{51}Cr foram distribuídos em triplicata, nos poços de reação e controles. Após incubação de 4 h os sobrenadantes foram transferidos para tubos plásticos. A leitura foi realizada em contador gama e os resultados expressos em porcentagem de lise específica. Os valores representam a média \pm D.P. de 6 animais por grupo. # $P < 0,001$ comparado ao controle; * $P < 0,001$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.1.5. Capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas

A Figura 4.7 demonstra que a resposta proliferativa de células mononucleares esplênicas de camundongos portadores de TAE foi em média 30% maior que o grupo controle ($P < 0,001$) a partir do 9º dia após a inoculação do tumor. Neste sentido, o tratamento destes animais com NTS1 aumentou a taxa de proliferação celular ($P < 0,001$) no 2º, 9º e 16º dias após a inoculação do tumor, respectivamente, 1,6, 2,12 e 1,85 vezes (4.7A, 4.7B e 4.7C) comparado ao grupo apenas portador de TAE. Por outro lado, o tratamento com NTS2 em animais portadores do TAE não apresentou aumentos significativos na capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas em nenhum dos três períodos analisados (4.7D, 4.7E e 4.7F). O tratamento tanto com NTS1 como com NTS2 não produziu nenhuma mudança na resposta proliferativa em animais normais.

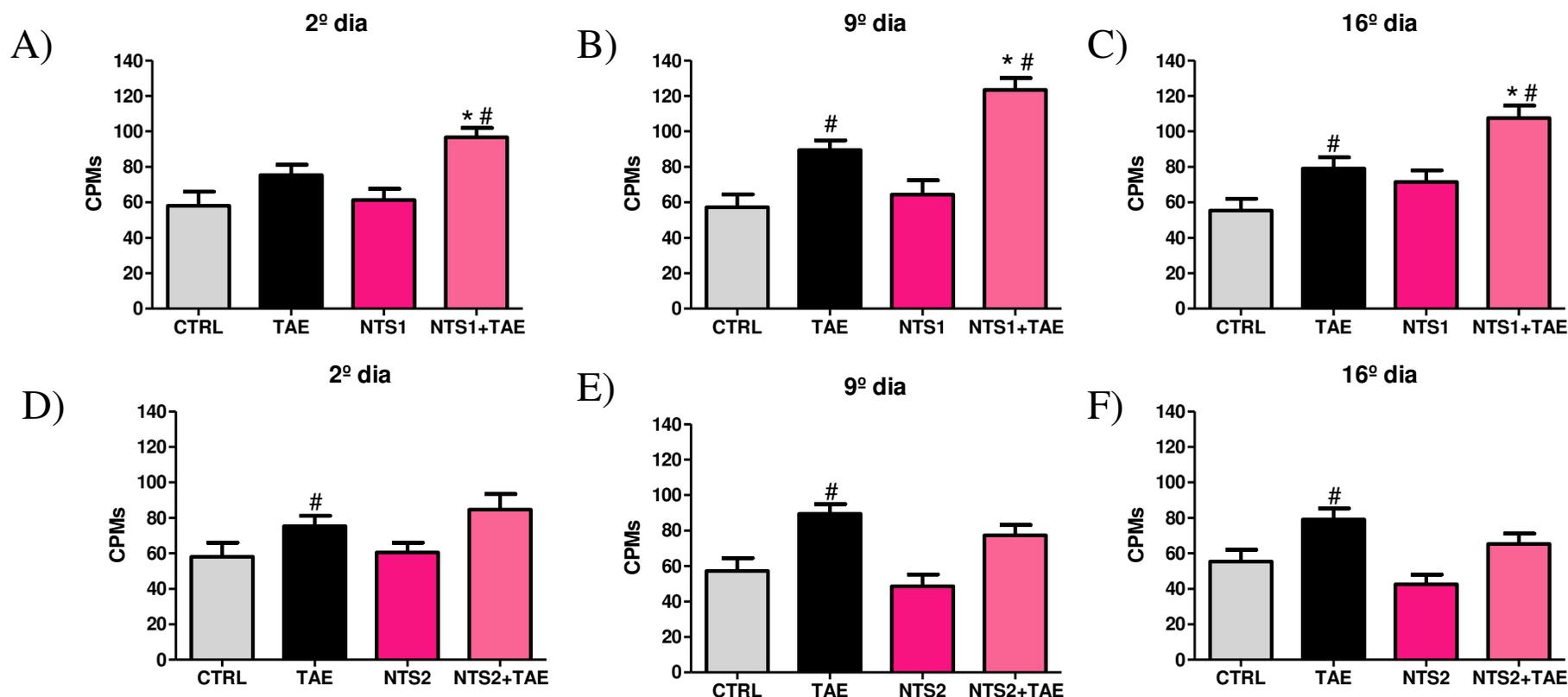


Figura 4.7: Efeito do tratamento com NTS1 e NTS2 sobre a resposta proliferativa de células esplênicas de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1mg/Kg de NTS1 (2º (A), 9º (B) e 16º (C) e 1 mg/Kg de NTS2 (2º (D), 9º (E) e 16º (F) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga.. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). Baços de camundongos foram coletados assepticamente e colocados em tubos contendo meio RPMI 1640. As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH_4Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. A suspensão celular de cada animal foi incubada em triplicata na presença de solução de Con A ($5\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas foram mantidas 72 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 . Dezoito horas antes do término dos cultivos, $1,0 \mu\text{Ci}$ de Timidina tritiada (^3H) foi adicionada. Completado o período de incubação, a Timidina ^3H incorporada às células em proliferação foi determinada em cintilador. Os valores representam a média \pm D.P. de 6 animais por grupo. # $P < 0,001$ comparado ao controle; * $P < 0,001$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.1.6. Determinação de esplenócitos CD4⁺

Para determinação de células CD4⁺ os animais foram sacrificados no 16^o dia após a inoculação do tumor e as células do baço foram marcadas com anticorpo para CD4⁺ e analisadas por citometria de fluxo. Como podemos observar na Figura 4.8 o tratamento tanto com NTS1 como com NTS2 não produziu nenhuma mudança na porcentagem de células CD4⁺ em animais normais. Por outro lado, o grupo apenas portador TAE apresentou um aumento de 2,27 vezes em relação ao grupo controle ($P < 0,001$). O tratamento com NTS1 produziu aumento além do encontrado no grupo apenas portador do tumor, atingindo níveis 2,5 vezes maiores dos que os encontrados no grupo controle ($P < 0,001$). O tratamento com NTS2 em animais portadores do TAE não apresentou aumentos significativos na porcentagem de esplenócitos CD4⁺.

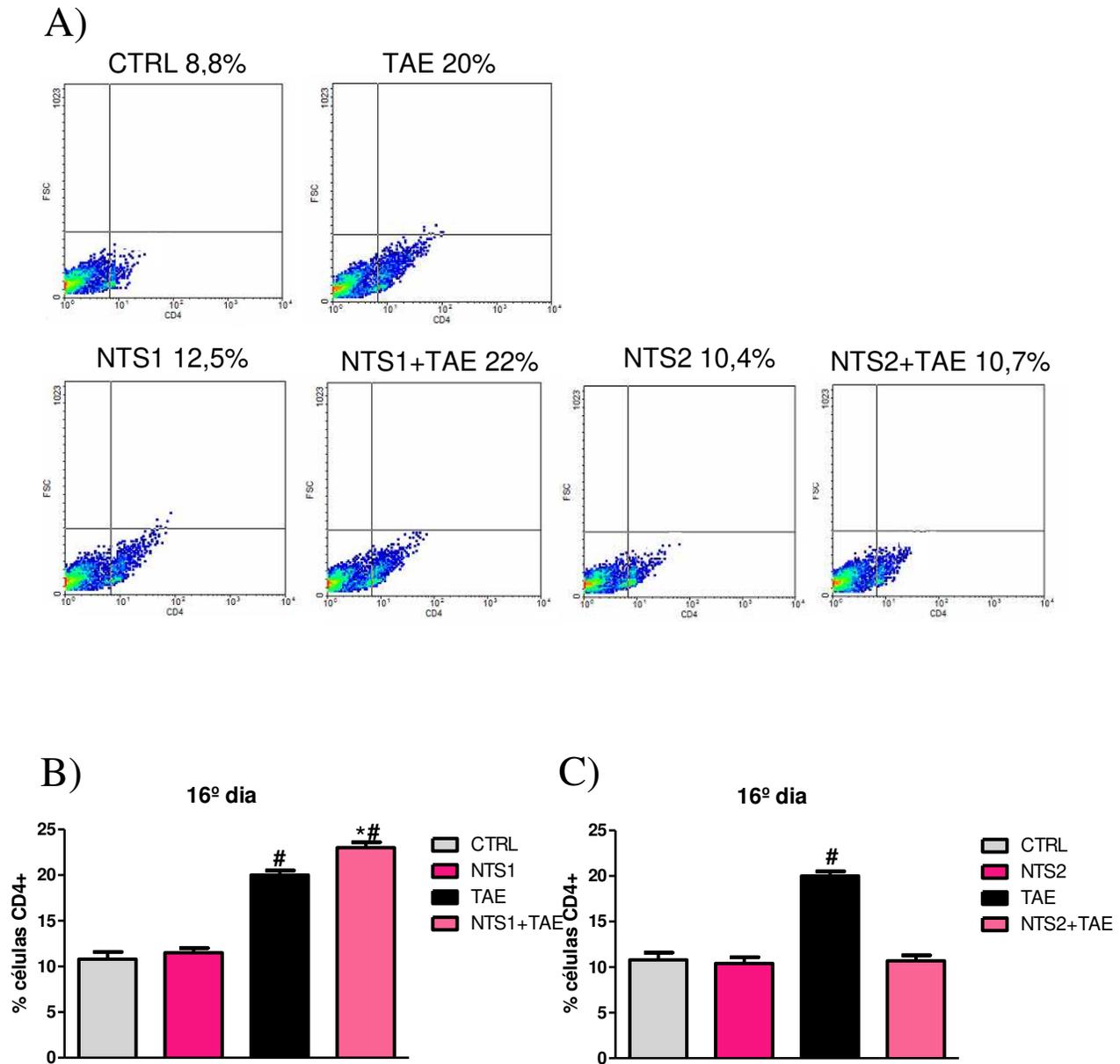


Figura 4.8: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 sobre a frequência de esplenócitos em baço de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1 mg/Kg de NTS1 (**B**) e 1mg/Kg de NTS2 (**C**) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados no 16º dia após a inoculação do tumor. Bãos de camundongos foram coletados assepticamente e colocados em tubos contendo meio RPMI 1640. As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH₄Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. As células foram marcadas com anticorpo para CD4+ e analisadas por citometria de fluxo. Os valores representam a média \pm D.P. de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ comparado ao controle; * $P < 0,05$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.1.7. Produção de IFN-gama, IL-2 e IL-10 por células mononucleares esplênicas

a. IFN-gama

Os efeitos de NTS1 e NTS2 sobre a produção de IFN-gama estão representados na Figura 14. Podemos observar que em animais portadores de TAE houve uma diminuição progressiva de 25 e 33% nos níveis de IFN-gama em relação ao controle ($P < 0,001$), respectivamente no 9º e 16º dias de desenvolvimento do tumor. O tratamento destes animais com NTS1 (4.9A) impediu o efeito supressor induzido pelo tumor mantendo os níveis de IFN-gama constantes e semelhantes aos encontrados em animais controle, a partir do 9º dia após a inoculação. Já o tratamento com NTS2 (4.9B) não foi capaz de impedir a supressão de IFN-gama causada pela progressão tumoral. O tratamento de animais normais tanto com NTS1 como com NTS2 produziu uma diminuição na produção desta citocina em relação aos animais controle ($P < 0,001$).

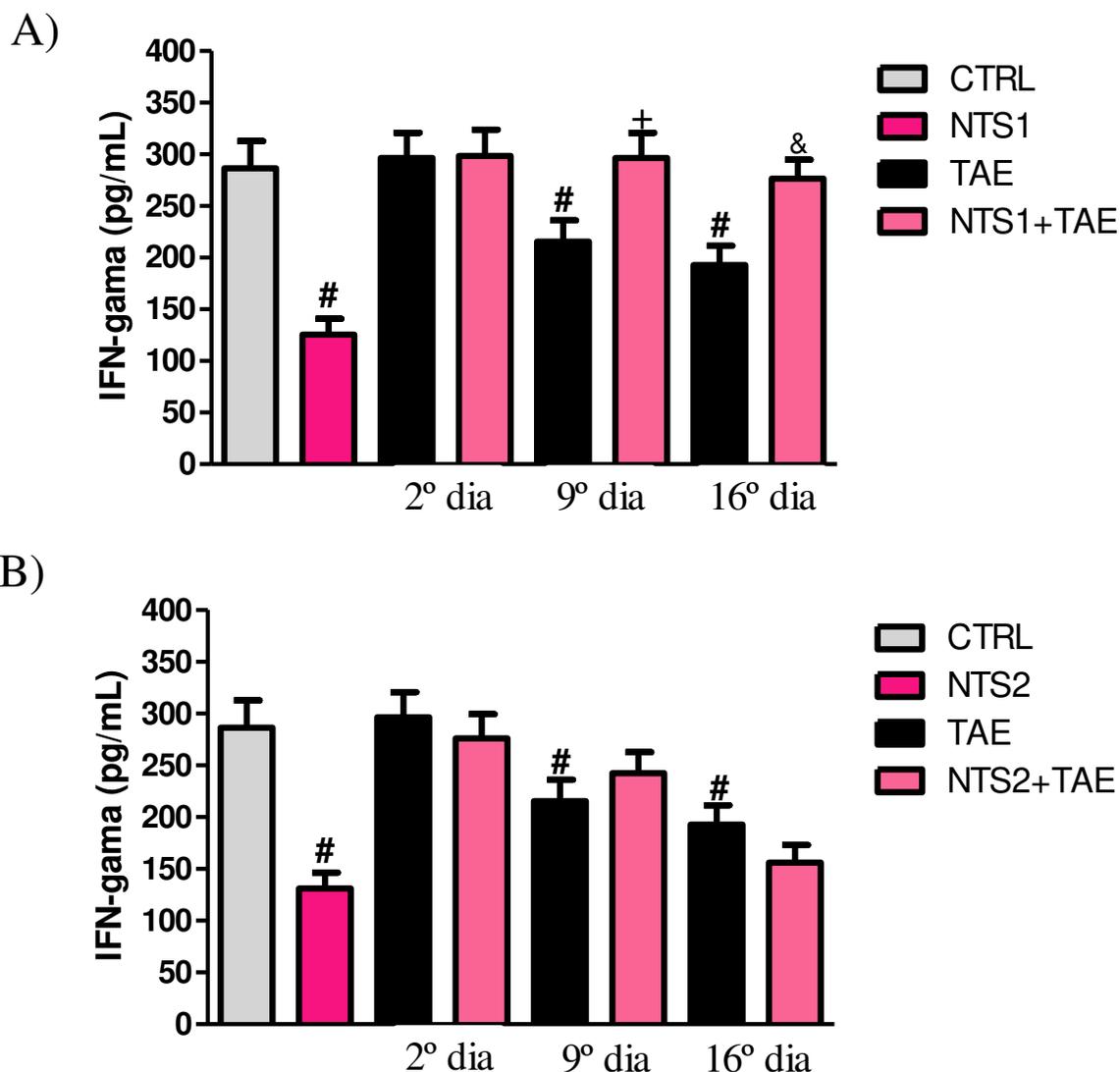


Figura 4.9: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 na produção de IFN-gama (pg/mL) por células do baço de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1mg/Kg de NTS1 (A) e 1mg/Kg de NTS2 (B) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). Baços de cada camundongo foram coletados assepticamente e colocados em tubos contendo meio RPMI 1640. As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH_4Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. A suspensão celular foi incubada em triplicata, na presença de solução de Con A ($5\mu\text{g/mL}$). Após 48 h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada poço e congelado a -20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de IFN-gama. Os valores representam a média \pm D.P. de 6 animais por grupo. # $P < 0,001$ comparado ao controle; + $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 9º dia após a inoculação do tumor; & $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 16º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

b. IL-2

A Figura 4.10 mostra que em animais apenas portadores de TAE ocorre uma diminuição de 49 e 58% nos níveis de IL-2, respectivamente no 9º e 16º dias da progressão tumoral, quando comparado ao grupo controle ($P < 0,001$). Quando analisamos os animais portadores de TAE tratados com NTS1 (15A) observamos uma reversão total dos níveis desta citocina, sinalizado com um dramático aumento de 2,55, 3,88 e 4,81 vezes nos três períodos avaliados quando comparado ao grupo apenas portador de TAE ($P < 0,001$) atingindo valores maiores dos encontrados no grupo controle. Em animais normais o tratamento com NTS1 não provocou aumentos significativos na produção de IL-2, quando comparado aos animais controle. Por outro lado, o tratamento com NTS2 (4.10B) em animais portadores do TAE produziu uma diminuição de em média 50% desta citocina quando comparado aos animais apenas portador do tumor ($P < 0,001$). Essa diminuição também pode ser observada em animais normais e tratados com NTS2.

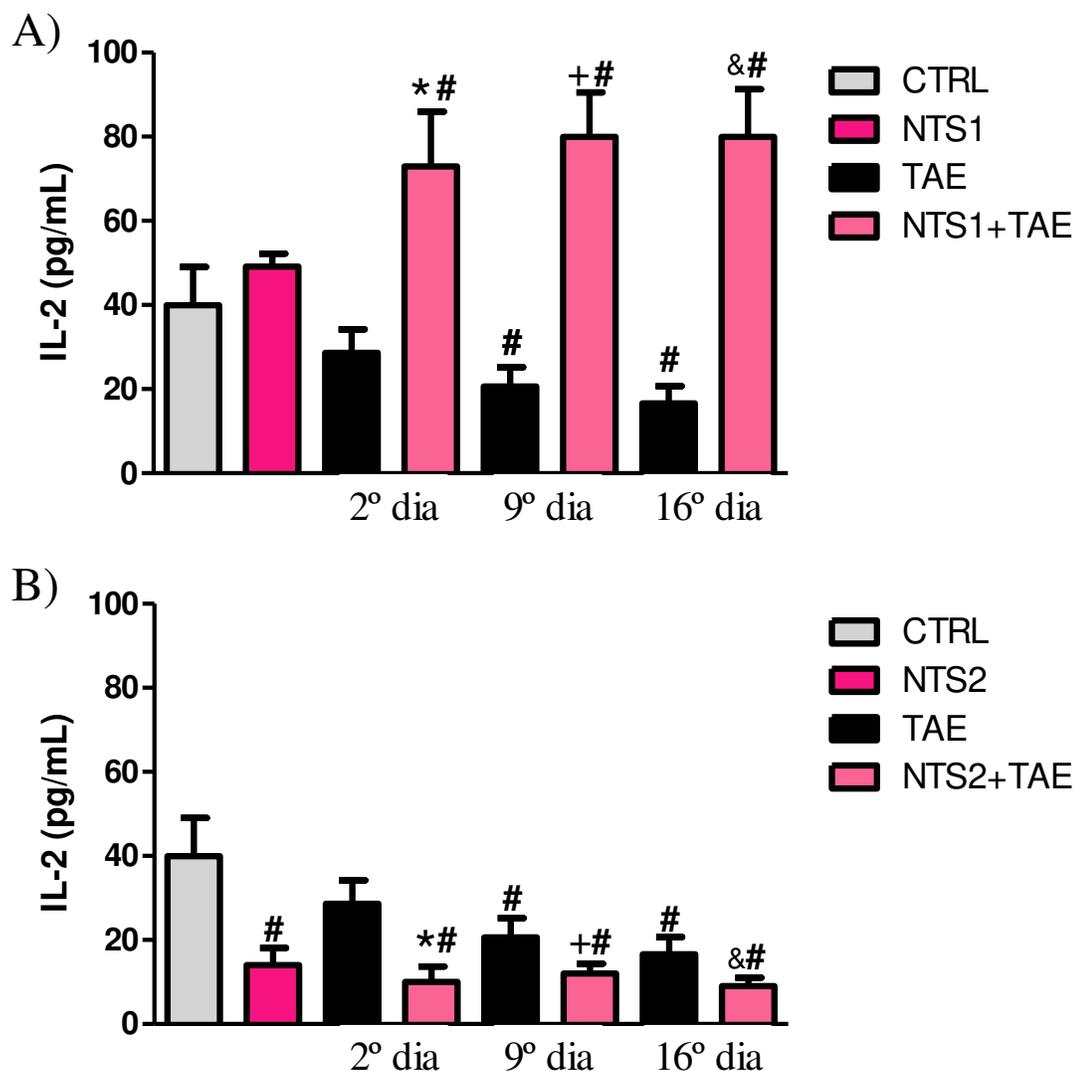


Figura 4.10: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 na produção de IL-2 (pg/mL) por células do baço de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1mg/Kg de NTS1 **(A)** e 1mg/Kg de NTS2 **(B)** por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). Baços de cada camundongo foram coletados assepticamente e colocados em tubos contendo meio RPMI 1640. As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH₄Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. A suspensão celular foi incubada em triplicata, na presença de solução de Con A (5µg/mL). Após 48 h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada poço e congelado a -20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de IL-2. Os valores representam a média ± D.P. de 6 animais por grupo. # $P < 0,001$ comparado ao controle; * $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 2º dia após a inoculação do tumor; + $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 9º dia após a inoculação do tumor; & $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 16º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

IL-10

Os efeitos de NTS1 e NTS2 na produção de IL-10 estão representados na Figura 4.11. Verificamos que nos 2 primeiros dias do desenvolvimento tumoral, os níveis de IL-10 nos grupos controle, controle tratado, tumor e tumor tratado tanto com NTS1 (4.11A) como com NTS2 (4.11B) mantiveram-se semelhantes. Por outro lado, nos animais apenas portadores de TAE aumentos significativos de 42 e 36% nos níveis desta citocina foram detectados no 9^o e 16^o dias de evolução tumoral, quando comparado ao controle ($P < 0,001$). O tratamento destes animais com ambos os compostos foi capaz de proteger os animais, uma vez que a produção de IL-10 manteve-se aos níveis do controle.

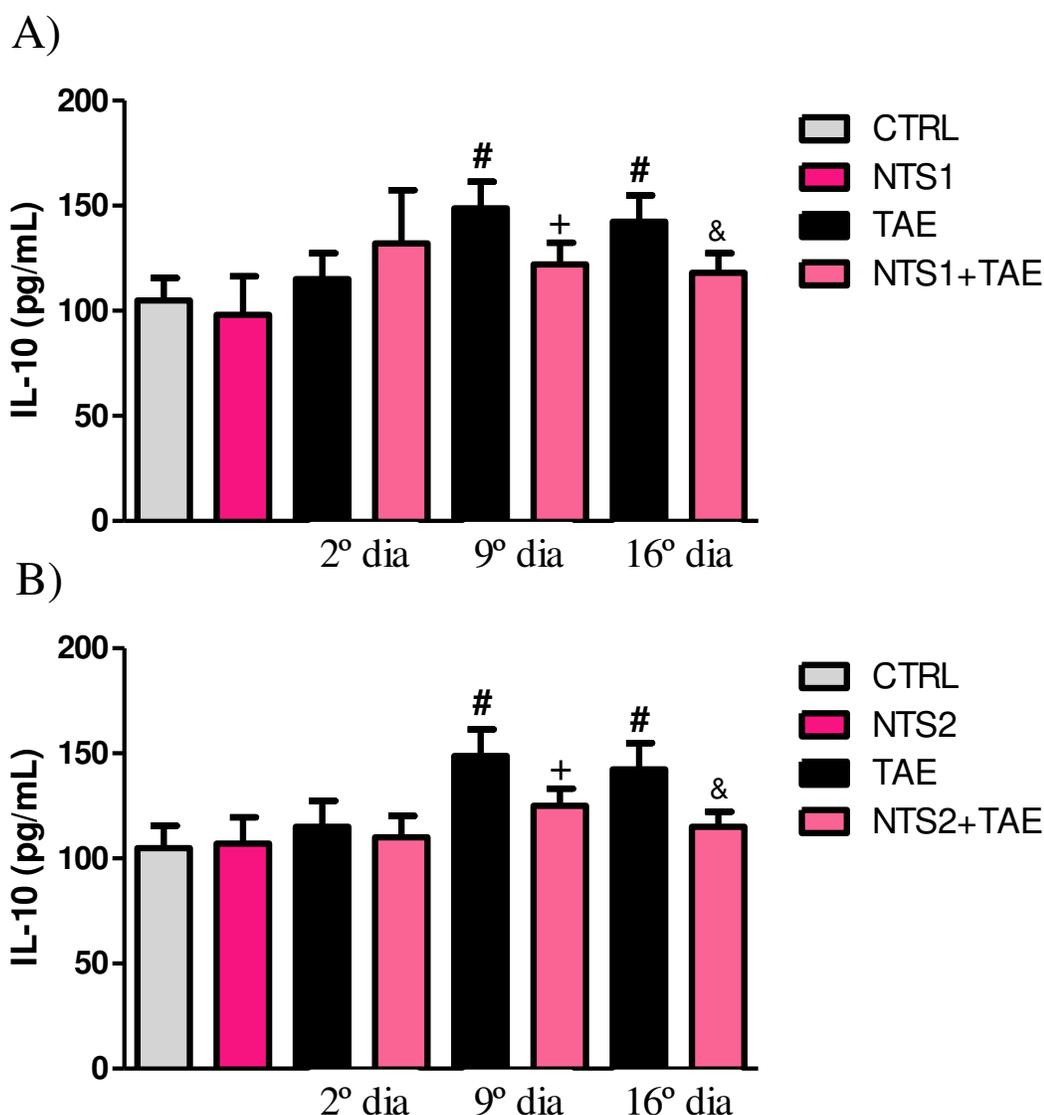
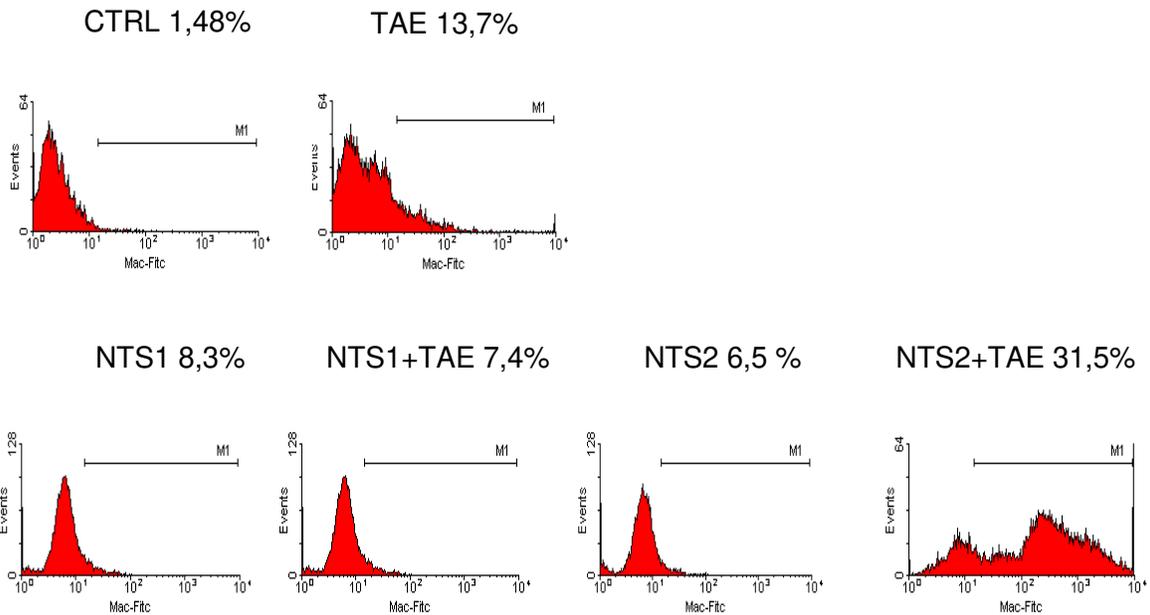


Figura 4.11: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 na produção de IL-10 (pg/mL) por células do baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 0,1mg/Kg de NTS1 (**A**) e 1mg/Kg de NTS2 (**B**) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). Baços de cada camundongo foram coletados assepticamente e colocados em tubos contendo meio RPMI 1640. As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH₄Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. A suspensão celular foi incubada em triplicata, na presença de solução de Con A (5µg/mL). Após 48 h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada poço e congelado a -20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de IL-10. Os valores representam a média ± D.P. de 6 animais por grupo. [#] $P < 0,001$ comparado ao controle; ⁺ $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 9º dia após a inoculação do tumor; [&] $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 16º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

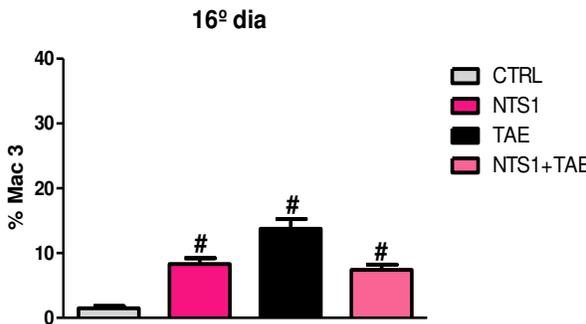
4.1.8. Avaliação da frequência de macrófagos (Mac3) peritoneais

Para determinação de macrófagos peritoneais os animais foram sacrificados no 16º dia após a inoculação do tumor, as células foram coletadas em lavados peritoneais, marcadas com anticorpo anti-Mac3 e analisadas por citometria de fluxo. Na Figura 4.12 observamos que os animais portadores do TAE apresentaram uma porcentagem de macrófagos peritoneais 9 vezes maior quando comparado ao grupo controle ($P < 0,001$). O tratamento com NTS1 aumentou em 5,6 vezes a porcentagem de Mac3 em relação ao controle ($P < 0,001$), porém não foi capaz de aumentar os níveis já elevados do grupo portador do TAE. Já nos animais portadores do tumor e tratados com NTS2 a porcentagem de Mac3 foi 2,29 vezes maior do que a encontrada no grupo do TAE ($P < 0,001$). O tratamento tanto com NTS1 como com NTS2 foi capaz de aumentar a porcentagem de Mac3 em animais normais ($P < 0,001$).

A)



B)



C)

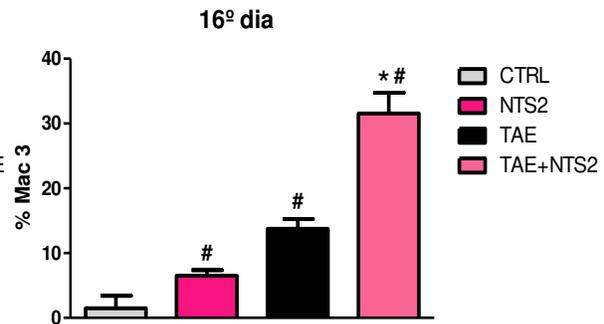


Figura 4.12: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 na frequência de macrófagos Mac3 no peritônio de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1 mg/Kg de NTS1 (A) e 1mg/Kg de NTS2 (B) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados no 16º dia após a inoculação do tumor. As células de cada animal foram assepticamente coletadas através de lavagem peritoneal com 10 mL de meio RPMI-1640 a 4°C. Em seguida foram marcadas com anticorpo para Mac3 e analisadas por citometria de fluxo. Os valores representam a média \pm D.P. de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ comparado ao controle; * $P < 0,05$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.1.9. Produção de TNF-alfa, IL-1 e IL-10 por macrófagos peritoneais

a. TNF-alfa

Os efeitos do tratamento com NTS1 e NTS2 sobre produção de TNF-alfa por macrófagos peritoneais de animais normais e portadores de TAE estão representados na Figura 4.13. Nos animais portadores de TAE, observamos uma diminuição significativa nos níveis desta citocina no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais, a qual foi representada no 9º e 16º dia de evolução tumoral, por valores 1,33 e 1,35 vezes menores que o controle respectivamente ($P < 0,05$). O tratamento destes animais com NTS2 (4.13B) produziu um aumento dramático na produção de TNF-alfa em todos os períodos da progressão tumoral avaliados e representado por valores em média 3 vezes maiores do que os observados no grupo controle ($P < 0,001$). Por outro lado, o tratamento com NTS1 (4.13A) não reverteu de forma significativa a produção de TNF-alfa no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais. Além disso, podemos observar que o tratamento tanto de NTS1 como de NTS2 manteve os níveis desta citocina ao nível do controle no grupo dos animais normais (4.13A e 4.13B respectivamente).

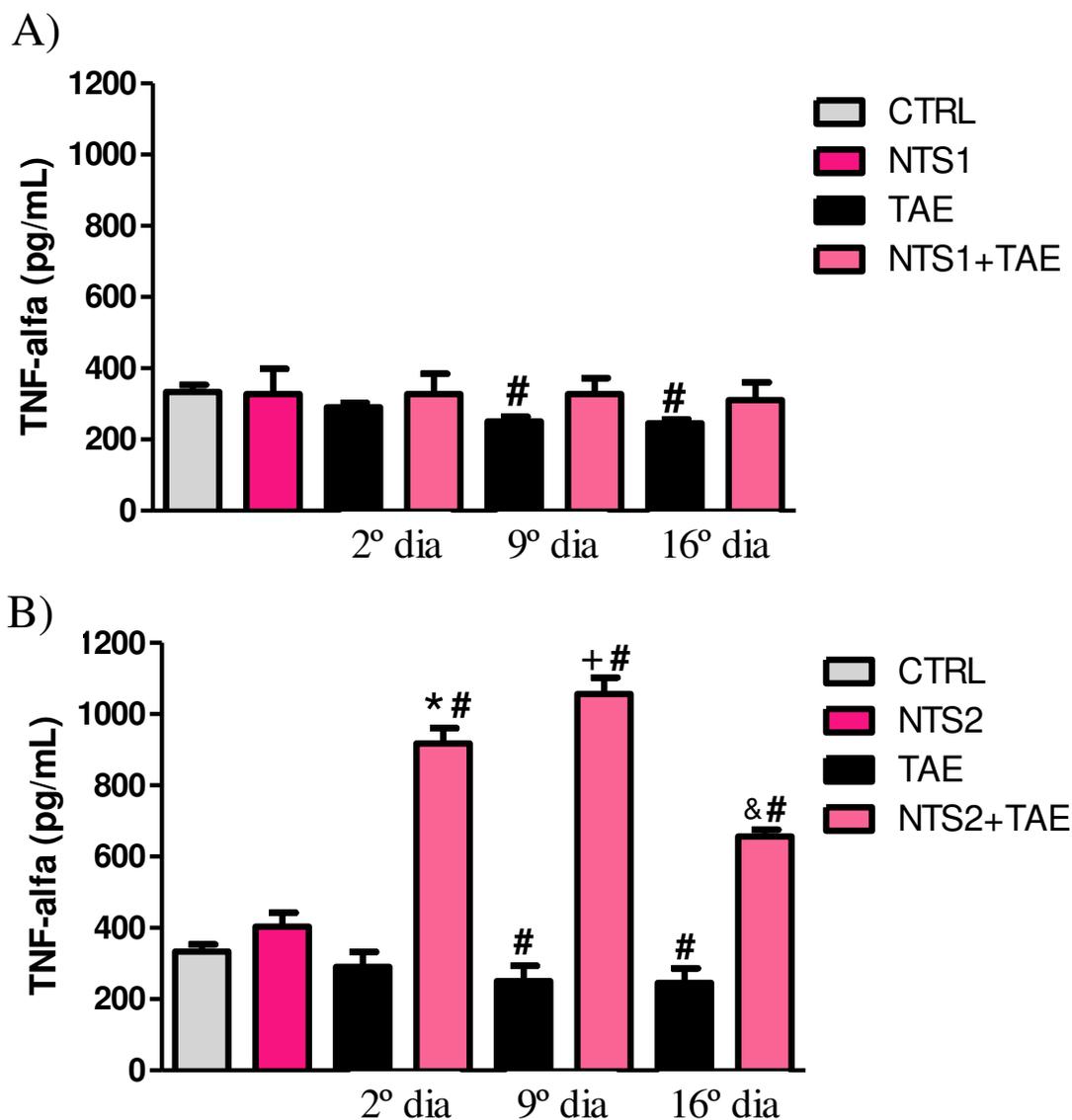


Figura 4.13: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 na produção de TNF-alfa (pg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1mg/Kg de NTS1 (**A**) e 1mg/Kg de NTS2 (**B**) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). As células de cada animal foram assepticamente coletadas através de lavagem peritoneal com 10 mL de meio RPMI-1640 a 4°C. Em seguida foram incubadas em triplicata, na presença de LPS e após 24h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada poço e congelado a -20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de TNF-alfa. Os valores representam a média \pm D.P. de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ comparado ao controle; * $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 2º dia após a inoculação do tumor; + $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 9º dia após a inoculação do tumor; &# $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 16º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

b. IL-1

A Figura 4.14 representa os efeitos do tratamento com NTS1 (4.14A) e NTS2 (4.14B) sobre produção de IL-1 por macrófagos peritoneais de animais normais e portadores de TAE. Em animais portadores de TAE, podemos observar uma diminuição brusca nos níveis de IL-1 no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais, a qual foi representada por valores 1,5 vezes menores do que os observados no grupo controle nos três períodos de desenvolvimento tumoral analisados ($P < 0,001$). O tratamento destes animais com NTS2 aumentou os níveis desta citocina, atingindo valores 2 vezes maiores aos encontrados no grupo controle ($P < 0,001$). Já em animais normais o tratamento com NTS1 e NTS2 não alterou a produção de IL-1 bem como o tratamento com NTS1 em animais portadores do tumor.

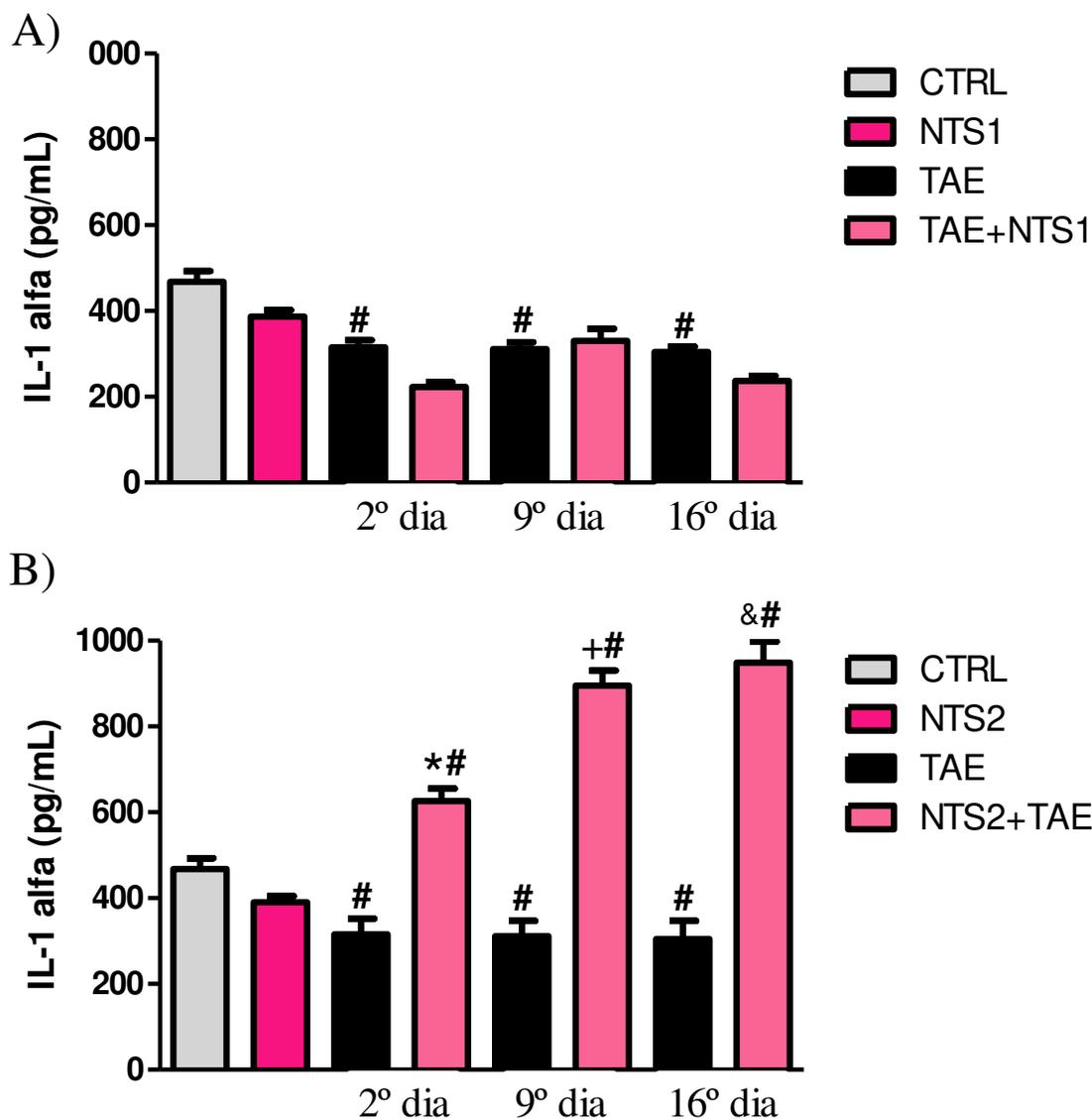


Figura 4.14: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 na produção de IL-1 (pg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1mg/Kg de NTS1 (A) e 1mg/Kg de NTS2 (B) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). As células de animal foram assepticamente coletadas através de lavagem peritoneal com 10 mL de meio RPMI-1640 a 4°C. Em seguida foram incubadas em triplicata, na presença de LPS e após 24h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada poço e congelado a -20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de IL-1. # $P < 0,001$ comparado ao controle; * $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 2º dia após a inoculação do tumor; + $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 9º dia após a inoculação do tumor; &# $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 16º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

c. IL-10

Os efeitos do tratamento com NTS1 e NTS2 sobre produção de IL-10 por macrófagos peritoneais de animais normais e portadores de TAE estão representados na Figura 4.15A e B respectivamente. O tratamento de animais normais tanto com NTS1 como com NTS2 não alterou a produção de IL-10. Por outro lado, aumentos significativos na produção de IL-10 foram observados no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de animais portadores de tumor. Houve um aumento progressivo na produção desta citocina, por macrófagos peritoneais, até o 9º dia após a inoculação do tumor, atingindo níveis 2,3 vezes maiores do que os observados no grupo controle ($P<0,001$), sendo que no 16º dia após a inoculação tumoral estes níveis foram reduzidos para 1,9 vezes maiores que o grupo controle ($P<0,001$). O tratamento destes animais tanto com NTS1 como com NTS2 reduziu de forma parcial, mas significativa ($P<0,05$), os níveis aumentados desta citocina observados no animal portador de TAE.

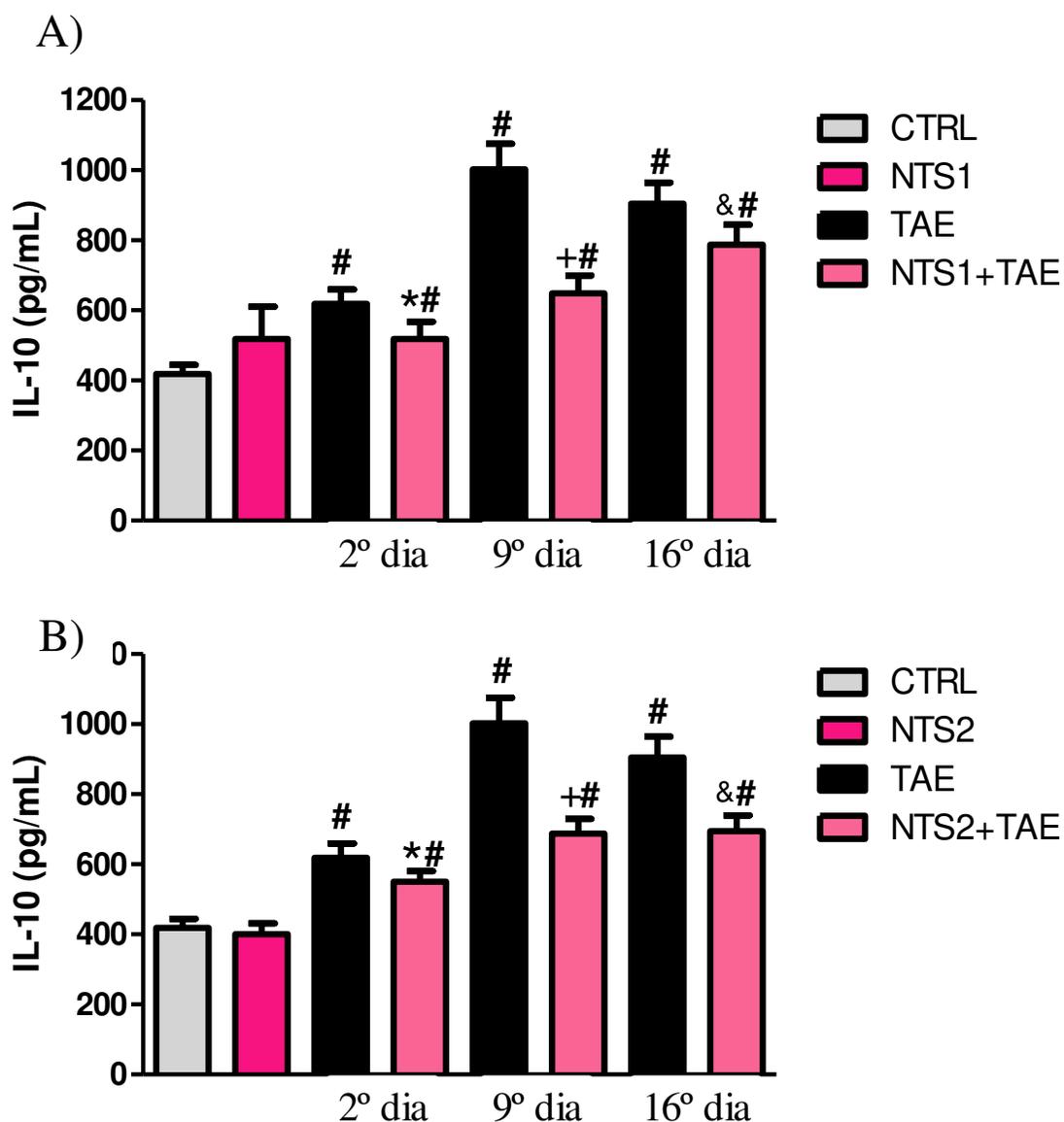


Figura 4.15: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 na produção de IL-10 (pg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1mg/Kg de NTS1 (A) e 1mg/Kg de NTS2 (B) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1×10^3 células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). As células de cada animal foram assepticamente coletadas através de lavagem peritoneal com 10 mL de meio RPMI-1640 a 4°C. As células foram incubadas em triplicata, na presença de LPS e após 24h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada poço e congelado a -20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de IL-10. Os valores representam a média \pm D.P. de 6 animais por grupo. [#] $P < 0,001$ comparado ao controle; ^{*} $P < 0,05$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 2º dia após a inoculação do tumor ⁺ $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 9º dia após a inoculação do tumor; [&] $P < 0,05$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 16º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

4.1.10. Produção de NO_2^- por macrófagos peritoneais

Os efeitos de NTS1 e NTS2 sobre a produção de NO_2^- por macrófagos peritoneais de camundongos saudáveis e portadores do TAE estão representados na Figura 4.16. Em animais portadores do tumor observamos um aumento acentuado na produção deste radical ($P < 0,001$) em relação ao controle, atingindo níveis em média de 300% nos três períodos avaliados. O tratamento de animais portadores de TAE com NTS2 (4.16B) produziu ativação adicional ($P < 0,001$) na atividade dos macrófagos, levando a produção de nitrito para níveis superiores aos animais apenas portadores de TAE a partir do 9º dia, sendo este aumento de 35 e 41% respectivamente no 9º e 16º após a inoculação do TAE. O tratamento de NTS2 também produziu aumentos significativos de NO_2^- em animais normais a partir do 9º dia ($P < 0,001$). Por outro lado, no grupo portador do tumor e tratado com NTS1 (4.16A) não observamos aumentos de NO_2^- além dos valores já elevados do grupo apenas portador de TAE.

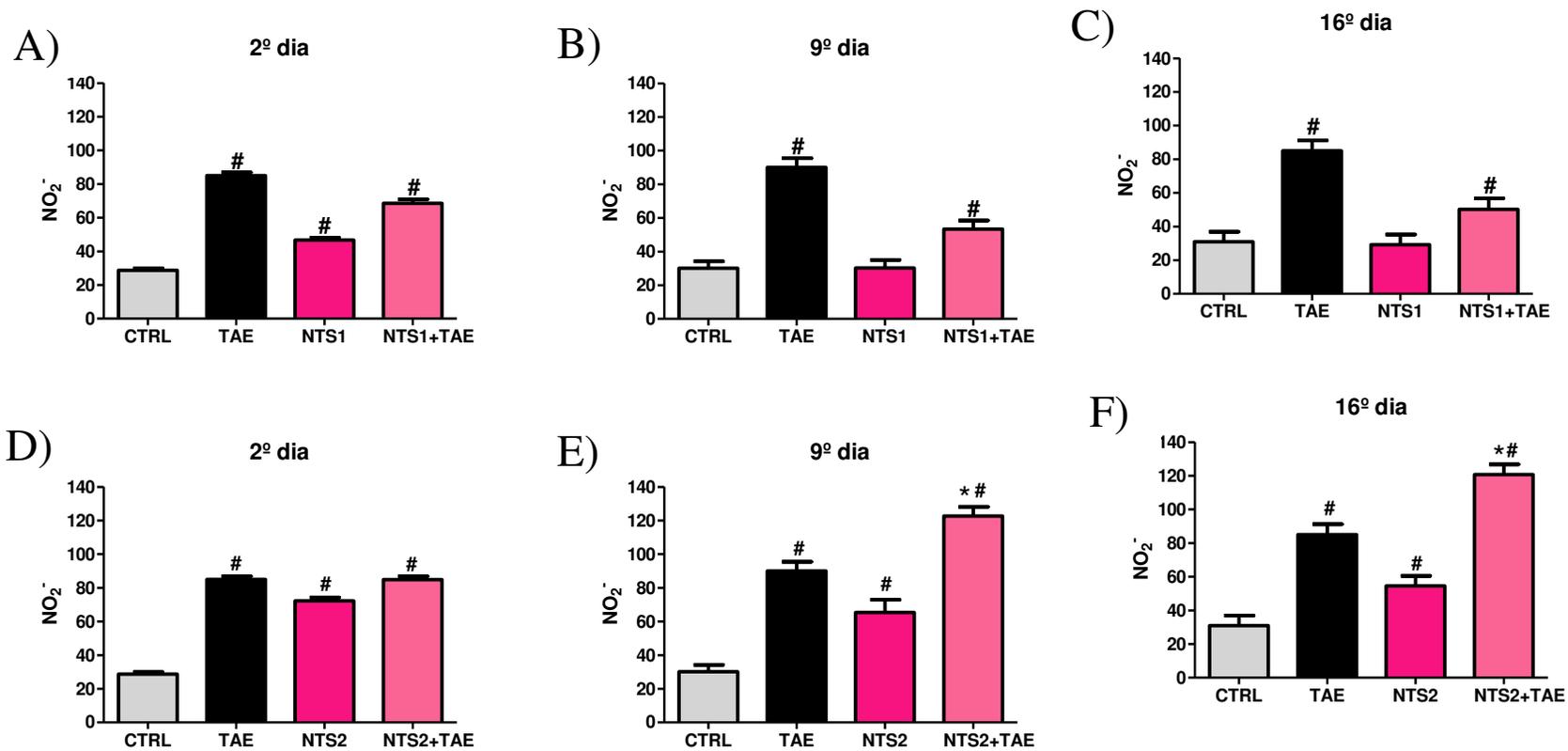


Figura 4.16: Efeito do tratamento de NTS1 e NTS2 na produção de NO₂⁻ (µmol) por 1x10⁵ macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE. Os animais foram tratados com 0,1 mg/Kg de NTS1 (2º (A), 9º (B) e 16º (C) e 1 mg/Kg de NTS2 (2º (D), 9º (E) e 16º (F) por via intraperitoneal (i.p), uma vez por semana durante 3 semanas após a inoculação do tumor (1 x 10³ células/animal). Os grupos controle e TAE receberam somente diluente da droga. Os animais foram sacrificados 24 h após cada tratamento (2º, 9º e 16º após o TAE). As células foram assepticamente coletadas através de lavagem peritoneal com 10 mL de meio RPMI-1640 a 4°C. Em seguida foram incubadas em triplicata, na presença de LPS e após 24h foi realizada uma reação colorimétrica baseada na reação Griess. As amostras foram lidas em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540nm contra um branco constituído por reagentes de Griess. Os resultados foram expressos em µmols de NO₂⁻ por 1x10⁵ células, comparando-se a D.O. com uma curva padrão em concentrações conhecidas de NO₂⁻. Os valores representam a média ± D.P. de 6 animais por grupo. #P<0,001 comparado ao controle; *P<0,001 comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.2. Atividade ex vivo dos compostos NTS1 e NTS2 em células CD34+ isoladas de sangue de cordão umbilical

4.2.1. Determinação da proliferação e viabilidade de células CD34+

Para determinar os efeitos de NTS1 e NTS2 sobre a funcionabilidade de células humanas progenitoras hematopoéticas CD34+, essas células foram isoladas a partir do sangue de cordão umbilical e colocadas em cultura na presença de G-CSF para induzir a diferenciação de neutrófilos. As células foram mantidas na ausência e na presença de NTS1 e NTS2 (0,5, 1 e 5 μM) e a proliferação (Figura 4.17A e 4.17C) e viabilidade (Figura 4.17B e 4.17D) foram analisadas. Enquanto a concentração de 0,5 μM tanto de NTS1 como de NTS2 aumentou significativamente a proliferação dos progenitores (46 e 25% respectivamente) em relação ao controle ($P < 0,05$), a adição de 5 μM de ambos resultou em diminuição da proliferação e aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas ($P < 0,05$).

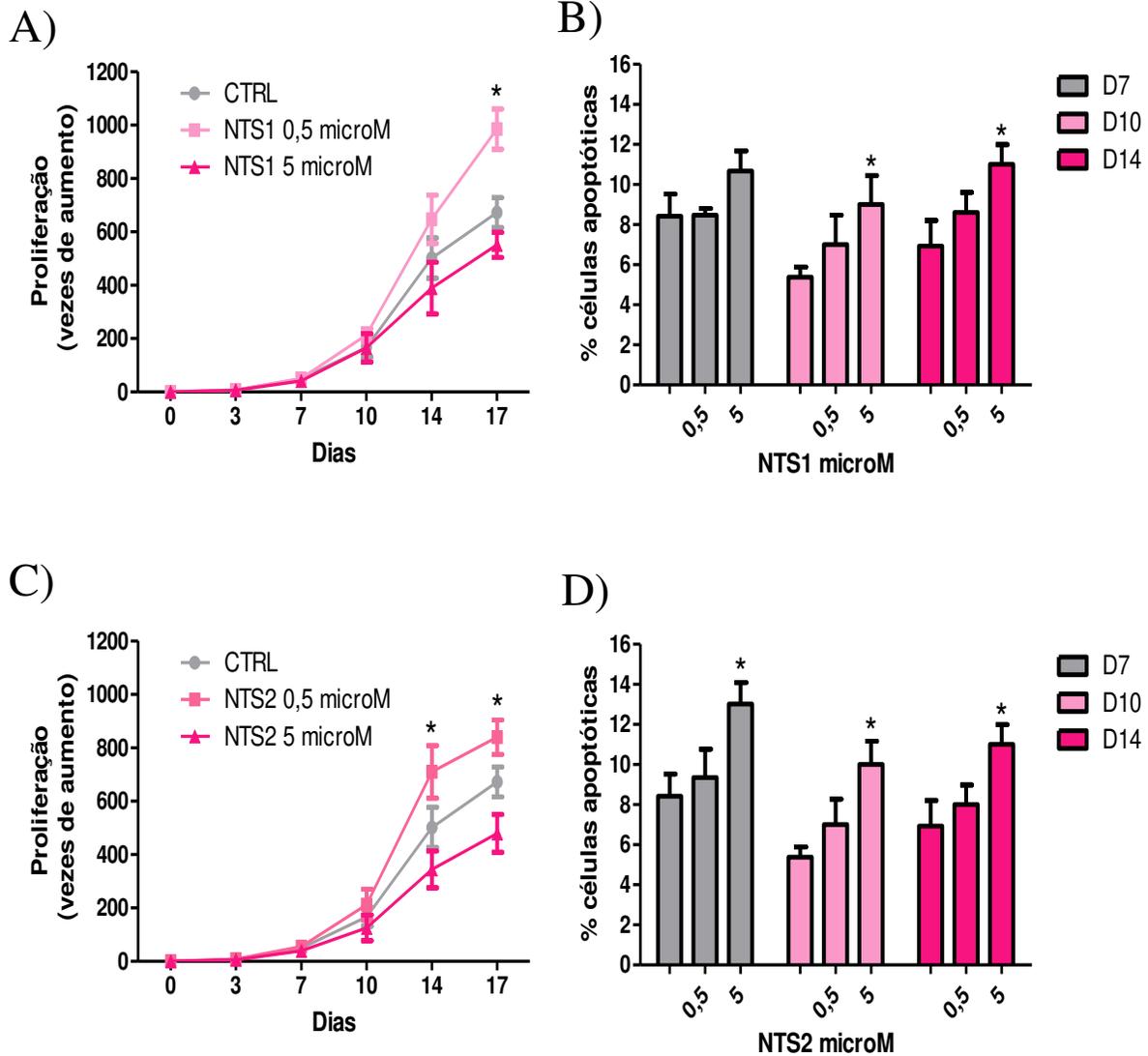


Figura 4.17: Proliferação e viabilidade de células CD34+ tratadas com NTS1 e NTS2. As células foram cultivadas na ausência e na presença de NTS1 (0,5 e 5 microM) (A e B) e NTS2 (0,5 e 5 microM) (C e D) durante 17 dias na presença de G-CSF para induzir a diferenciação de neutrófilos. A proliferação foi determinada por contagem em hemocitometro de células coradas com azul de trypan. Os resultados foram expressos como múltiplos do número inicial de células na cultura. A viabilidade foi determinada por apoptose utilizando citometria de fluxo através da marcação com Anexina-V/PI no 7º, 10º e 14º dia da cultura. Os dados foram expressos em porcentagem de células apoptóticas. Os valores representam a média \pm D.P. de 5 culturas. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle.

4.2.2. Determinação de células tronco hematopoéticas (CD34+)

Para avaliar os efeitos de NTS1 e NTS2 sobre a proliferação de progenitores CD34+ (Figura 4.18), as células foram cultivadas como descrito no item anterior e a frequência de células CD34+ foi analisada por citometria de fluxo no 3º e 7º dia de cultura. Como podemos observar na Figura 4.18A o tratamento ambos no 3º dia de cultura não produziu aumento significativo na porcentagem de células CD34+. Por outro lado, no 7º dia de cultura as duas concentrações testadas de NTS1 (0,5 e 5 µM) produziram aumentos de 36 e 18% respectivamente ($P < 0,05$) na porcentagem de células CD34+. Já a atividade de NTS2 na porcentagem destas células ocorreu apenas na concentração de 0,5 µM ($P < 0,05$).

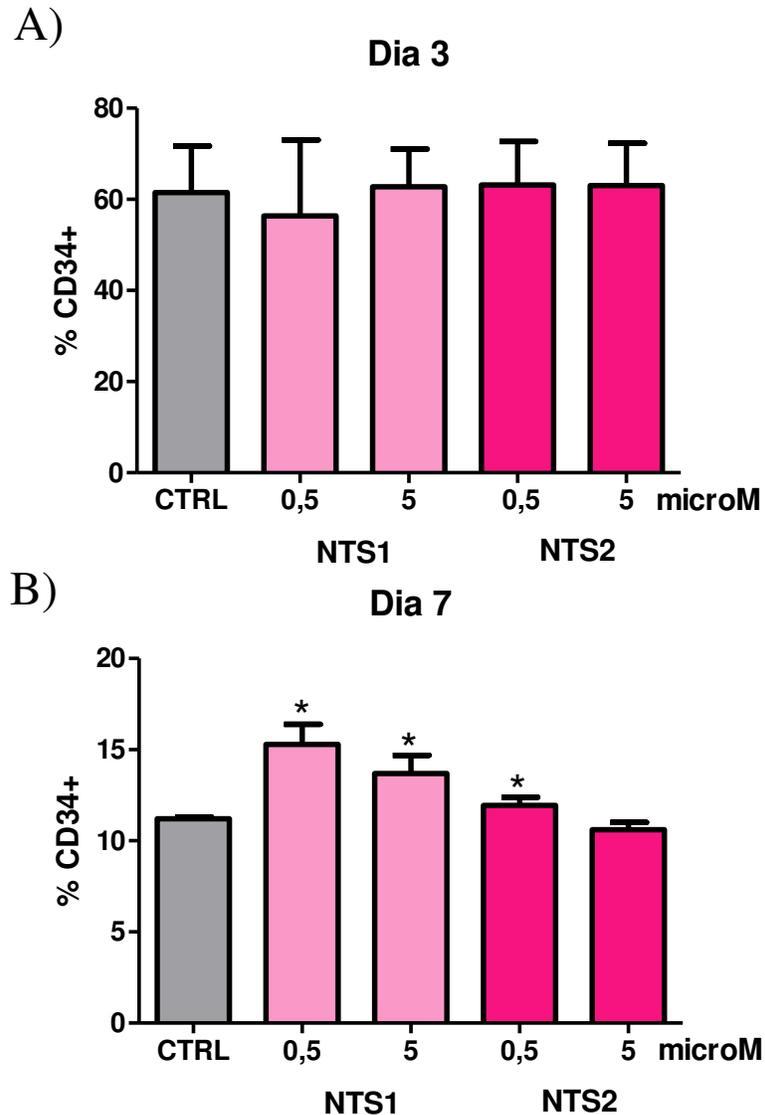


Figura 4.18: Frequência de células tronco hematopoéticas (CD34+) após o tratamento com NTS1 e NTS2. As células foram cultivadas na ausência e na presença de NTS1 e NTS2 (0,5 e 5 microM) durante 17 dias na presença de G-CSF para induzir a diferenciação de neutrófilos. A expressão de células CD34+ foi determinada em triplicata, por citometria de fluxo utilizando o marcador CD34+-Pe no 3^o (A) e 7^o (B) dia de cultura. Os dados foram expressos em porcentagem de células CD34+. Os valores representam a média \pm D.P. de 5 culturas. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle

4.2.3. Determinação da frequência de Progenitor Mielóide Comum (PMC) e Progenitor de Granulócito e Macrófago (PGM)

Para determinar os efeitos de NTS1 e NTS2 (0,5 e 5 μ M) nas populações de progenitores mielóides a partir de células CD34+, analisamos as populações como previamente descritas por Manz *et al.*¹ no 3^o e 7^o da cultura. Baseado na expressão dos marcadores CD123 e CD45RA, progenitores mielóides podem ser divididos em progenitor mielóide comum (PMC) CD123+/CD45RA–), progenitor para granulócito/macrófago (PGM) CD123+/CD45RA+) e progenitor para megariócito/eritrócito (PME) CD123–/CD45RA–) (Figura 4.19). Como podemos observar na Figura 4.19A o tratamento com 0,5 μ M tanto de NTS1 como de NTS2 produziu aumento na porcentagem de PMC de 20 e 24% respectivamente quando comparado ao controle ($P < 0,001$). Resultados semelhantes foram obtidos na análise de PGM com aumento de 25% para o tratamento com 0,5 μ M de NTS1 e 22% com NTS2 em relação ao controle (Figura 4.19B) ($P < 0,001$). A concentração de 5 μ M tanto de NTS1 como de NTS2 não foi capaz de aumentar os níveis de PMC e PGM.

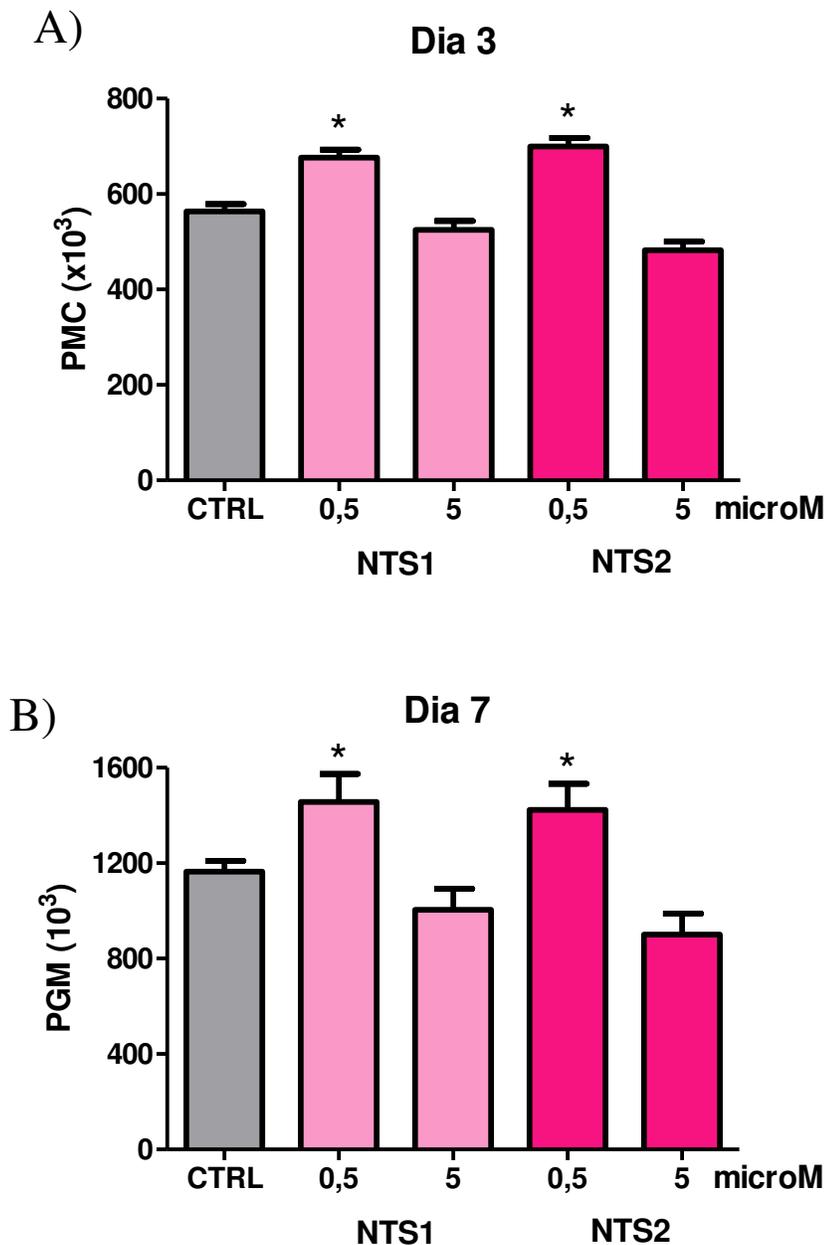


Figura 4.19: Frequência de Progenitor Mielóide Comum (PMC) e Progenitor de Granulócito e Macrófago (PGM) em cultura de células CD34+ tratadas com NTS1 e NTS2. As células foram cultivadas na ausência e na presença de NTS1 e NTS2 (0,5 e 5 microM) durante 17 dias na presença de G-CSF para induzir a diferenciação de neutrófilos. A expressão em triplicata de PMC foi determinada no 3º **(A)** e a expressão de PGM no 7º **(B)** dia da cultura utilizando citometria de fluxo. Primeiramente células CD34+/CD38+ foram caracterizadas e em seguida utilizando os marcadores CD123 e CD45 foram determinadas as expressões de PMC (CD123+/CD45-) e PGM (CD123+/CD45+). Os dados foram expressos em números absolutos ($\times 10^3$). Os valores representam a média \pm D.P. de 3 culturas. * $P < 0,001$ comparado com o grupo controle.

4.2.4. Capacidade formadora de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) de células CD34+

Para investigar os efeitos de NTS1 e NTS2 (0,5 e 5 μ M) na atividade formadora de colônias de células CD34+, utilizamos um sistema de cultura semi-sólido. As células CD34+ foram colocadas em cultura na presença de citocinas incluindo G-CSF para estimular a produção de colônias para granulócitos/macrófagos. A adição de ambos compostos resultou em aumento acentuado no número de unidades formadoras de colônia para granulócito/macrófago (CFU-GM) quando comparado ao controle nas duas doses analisadas (Figura 4.20A) ($P < 0,001$). Interessante observar que, ao contarmos de forma diferenciada as unidades formadoras de colônia para granulócito (CFU-G) e para macrófagos (CFU-M) verificamos que NTS1 aumentou 1,32 vezes o número de CFU-G (Figura 4.20C) enquanto NTS2 aumentou 1,55 vezes número de CFU-M (Figura 4.20D) ($P < 0,001$).

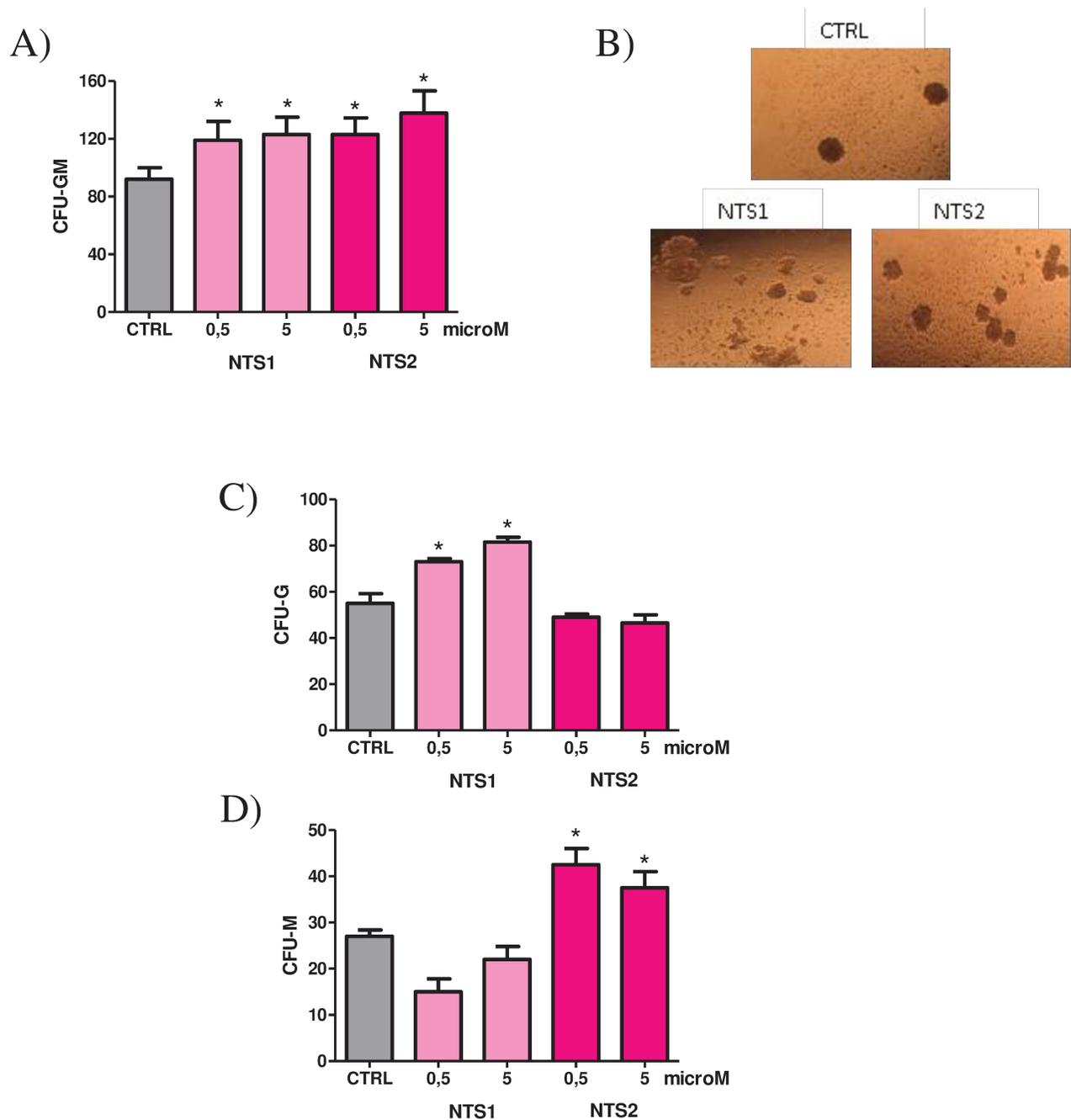


Figura 4.20: Determinação da frequência de progenitores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos a partir de células CD34⁺. As células foram cultivadas em meio semi sólido na ausência e na presença de NTS1 e NTS2 (0,5 e 5 microM) durante 11 dias em estufa a 37°C em presença de 5% de CO₂ para induzir a formação de CFU-GM. Os dados foram expressos em unidade de colônias formadas para granulócitos/macrófagos **(A)**, granulócitos **(C)** e macrófagos **(D)**. **(C)** Fotomicrografia de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) de células CD34⁺. As colônias foram fixadas em metanol em seguida marcadas com solução de hematoxilina 50% e Giemsa. Os valores representam a média ± D.P. de 5 ensaios. *P<0,05 comparado com o grupo controle.

4.2.5. Análise do processo de diferenciação de células CD34+

Para determinar os efeitos de NTS1 e NTS2 (0,5 e 5 μ M) na diferenciação de neutrófilos, progenitores CD34+ foram colocados em cultura por 17 dias na presença de G-CSF. Neutrófilos maduros foram determinados baseados na análise de citospin e marcação de lactoferrina, uma proteína expressa a partir do estágio mielocítico de desenvolvimento de neutrófilos. Neutrófilos maduros foram caracterizados por apresentarem núcleo segmentado. O tratamento com NTS1 e NTS2 resultou em diminuição significativa da porcentagem de neutrófilos maduros nas duas concentrações analisadas (Figura 4.21A). Além disso, o tratamento tanto com NTS1 como com NTS2 não apresentaram atividade na quantificação de lactoferrina (Figura 4.21B). Entretanto NTS1 nas duas concentrações estudadas aumentou em média 1,8 a porcentagem de metamielócitos (Figura 4.21C) ($P < 0,001$). E NTS2 (0,5, e 5 μ M) aumentou 1,5 vezes a porcentagem de monócitos (Figura 4.21D) ($P < 0,001$).

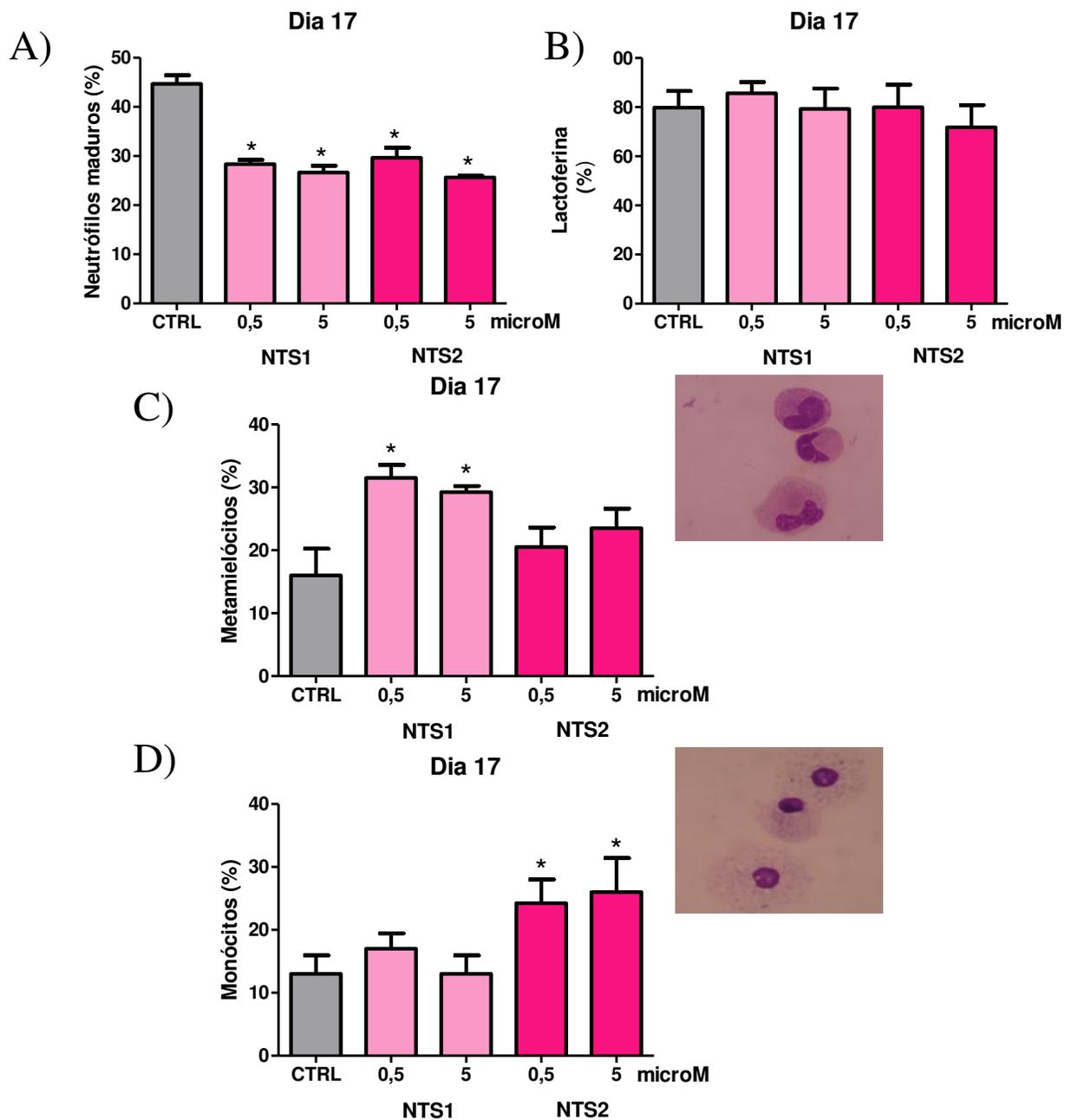


Figura 4.21: Avaliação da diferenciação de neutrófilos e monócitos em culturas de células CD34+. As células foram cultivadas na ausência e na presença de NTS1 e NTS2 (0,5 e 5 microM) durante 17 dias na presença de G-CSF para induzir a diferenciação de neutrófilos. No 17º dia da cultura foi realizado o ensaio de citospin e as células foram coradas com solução de May-Grunwald Giemsa para determinação morfológica. A expressão de lactoferrina foi determinada por citometria de fluxo utilizando o marcador Lactoferrina-Pe. Os dados foram expressos em porcentagem de neutrófilos maduros (A), lactoferrina (B), metamielócitos (C) e monócitos (D). Os valores representam a média \pm D.P. de 5 culturas. * $P < 0,001$ comparado com o grupo controle.

4.2.6. Atividade de NTS1 e NTS2 na via de sinalização p38MAPK na expansão de neutrófilos a partir de progenitores CD34+

Para determinar os efeitos de NTS1 e NTS2 na via de sinalização p38MAPK os progenitores CD34+ foram colocados em cultura na presença de G-CSF para induzir a diferenciação de neutrófilos. As células foram cultivadas na ausência e na presença de NTS1 e NTS2 (0,5 e 5 μ M). No 7^o dia da cultura foi feito o lisado protéico e análise de Western Blot com anticorpos para p-p38, p38, pC/EBP α , C/EBP α e tubulina. Como podemos observar na Figura 4.22 tanto o tratamento com NTS1 como com NTS2 teve habilidade de inibir a fosforilação de p38 em células CD34+. Resultado semelhante ocorreu com a atividade do fator transcricional CEBP- α na qual ambos compostos agiram inibindo a fosforilação deste fator.

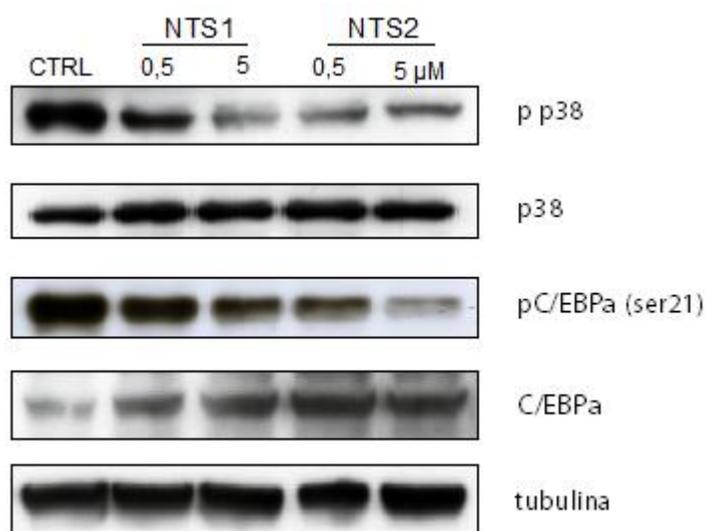


Figura 4.22: Efeito de NTS1 e NTS2 sobre a via de sinalização p38MAPK na expansão de neutrófilos a partir de progenitores CD34+. As células foram cultivadas na ausência e na presença de NTS1 e NTS2 (0,5 e 5 microM) durante 17 dias na presença de G-CSF para induzir a diferenciação de neutrófilos. No 7^o dia da cultura foi realizado o lisado protéico e análise de Western Blot com anticorpos para p-p38, p38, pC/EBP α , C/EBP α e tubulina.

5. DISCUSSÃO

O sistema hematopoético é constituído basicamente de três populações de células: as pluripotentes, as progenitoras, comprometidas com uma determinada linhagem, e aquelas em maturação. As duas últimas podem ser consideradas como população em transição, em constante multiplicação e diferenciação, e são originárias das células pluripotentes. Estas, por sua vez, são poucas em número, compreendendo entre 0,01 e 0,05% da população total da medula óssea, possuindo duas características distintas das demais células hematopoéticas. A primeira, é a sua capacidade de auto-renovação e a segunda, é seu potencial para sofrer diferenciação na presença de fatores de crescimento específicos (CSFs) e produzir nove diferentes tipos celulares: eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B.

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que, em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) ocorre uma redução na capacidade mieloproliferativa da medula óssea, mais especificamente uma diminuição no crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos com conseqüente hematopoese extramedular e elevação nos níveis séricos de fatores estimuladores de colônias (Souza-Queiroz et al., 2008; Teixeira et al., 2006; Eberlin et al., 2005; QUEIROZ et al., 2003; 2001; Melo et al., 2001). Outros estudos (Wing et al., 1985; Wing et al., 1984) sugerem que o tumor produz fatores inibidores, presentes no líquido ascítico, capazes de afetar a proliferação e diferenciação de células pluripotentes da medula óssea. Provavelmente estes fatores são produzidos diretamente por células tumorais ou resultam da interação entre hospedeiro e o tumor transplantado.

Tendo em vista que a presença de fatores estimuladores de colônias bem como a produção, maturação e mobilização eficiente dos precursores hematopoéticos derivados da medula óssea, principalmente do compartimento granulocítico/macrofágico, são fundamentais para reversão da profunda mielossupressão causada pelo TAE avaliamos o tratamento de NTS1 e NTS2 no crescimento e diferenciação desses precursores hematopoéticos (granulócitos e macrófagos) através da técnica de cultura clonal em meio semi-sólido a qual constitui uma ferramenta útil para o estudo dos mecanismos envolvidos no combate ao tumor (Metcalf, 2001).

Ao estudarmos os efeitos de NTS1 e NTS2 sobre os precursores hematopoéticos, observamos que administração dos compostos em animais normais, não portadores do tumor, não provocou aumento no número de CFU-GM da medula óssea. Nossos

resultados demonstram ainda, uma importante atividade antitumoral dose-dependente dos compostos. O tratamento tanto com NTS1 como com NTS2 restaurou a mielosupressão ao elevar o número de progenitores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea, além de diminuir a hematopoese extramedular causada pelo tumor. Além disso, essas doses proporcionaram um aumento de 60 e 50% respectivamente na taxa de sobrevivência dos animais portadores de TAE, o que sugere uma habilidade dos compostos em manter em equilíbrio estímulos positivos e negativos no controle da mielopoese.

A esplenomegalia e o aumento do número de CFU-GM no baço, associados à acentuada diminuição no número de CFU-GM da medula óssea de camundongos portadores de TAE, contribuem para a morte do animal. O aumento de CFU-GM no baço tem sido atribuído à migração de células progenitoras da medula óssea para esse órgão que, no entanto também é considerado um sítio de ativação da hematopoese. Desta forma, é possível que os elevados níveis de CFU-GM no baço não sejam unicamente devido a migração de células da medula óssea, mas também pelo aumento na formação de progenitores pelas células tronco residentes neste órgão. Vários fatores humorais são reportados como responsáveis pela indução tumoral destes desequilíbrios hematológicos. Dentre estes fatores podemos destacar os fatores estimuladores de colônias (CSFs), que agem sinergicamente com citocinas como IL-6 e IL-3, direta ou indiretamente no microambiente hematopoético, estimulando o crescimento e a diferenciação de progenitores hematopoéticos (Degowin et al. 1981; Yamazaki et al. 1973). Neste sentido, Queiroz et al (2004), demonstraram um aumento na atividade estimuladora de colônia do soro de animais portadores de TAE. Estes achados corroboram a literatura que relaciona a hematopoese extramedular ao contínuo aumento nos fatores estimuladores de colônias (Staszewski 1997) e também confirmam nossos resultados que demonstram um aumento da atividade estimuladora de colônias de 100, 138 e 128%, respectivamente no 2º, 9º e 16º dias de evolução tumoral, quando comparado aos animais controle.

Nossos resultados mostram ainda que o tratamento de animais portadores de TAE tanto com NTS1 como com NTS2 elevou em média 51 e 81% respectivamente a CSA em relação aos animais apenas portadores de TAE, nos três períodos avaliados. Desta forma, podemos inferir que o efeito dos compostos nas células progenitoras das linhagens granulocíticas e macrofágicas em camundongos portadores do tumor ocorre

possivelmente por indução da produção de citocinas/fatores estimuladores de colônias, e/ou aumento da responsividade de células progenitoras ao CSF.

Além de afetar diretamente o compartimento granulocítico/macrofágico, diminuindo o número desses progenitores na medula e aumentando de forma progressiva em sítios periféricos como baço, a expansão do TAE está relacionada com outros fatores imunossupressores como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), TGF- β e prostaglandinas (Pahar e Lala, 1988; Betz e Fox, 1991; Hilkens *et al.*, 1995). O aumento de prostaglandinas E₂ (PGE₂), característico da evolução do TAE, está associado a um fraco influxo de células inflamatórias na cavidade peritoneal e a uma inibição da liberação das citocinas IL-2 e IFN- γ pelos linfócitos T (Fecchio *et al.*, 1990). Durante o desenvolvimento do TAE ocorre alterações do fenótipo Th1 para o Th2 através da inibição da liberação de IL-2, IL-1, IFN- γ e TNF- α (Yamamoto *et al.* 2005, Grynberg *et al.* 1999) com conseqüente aumento nos níveis de IL-10.

Os níveis de IL-2, IFN- γ , IL-10 produzidos por células mononucleares esplênicas de animais portadores de TAE observados em nosso trabalho se assemelham aos resultados descritos na literatura, e indicam uma substituição do fenótipo Th1 pelo Th2, no processo de evolução tumoral (Yamamoto *et al.*, 1995; Segura *et al.*, 1997). Detectamos reduções significativas nos níveis de produção de IFN- γ e IL-2 nos estágios mais avançados do TAE (9^o e 16^o dias). Em contrapartida verificamos um aumento progressivo nos níveis de secreção da IL-10, citocina fenótipo Th2, a qual apresenta função inibidora sobre a síntese das citocinas com perfil Th1 e, através de sua ação supressora, promove o crescimento tumoral.

O tratamento com NTS1 reverteu totalmente a redução dos níveis de IL-2 em animais portadores de TAE, que atingiram valores maiores do que os encontrados no grupo controle. Esta citocina foi inicialmente identificada como um fator de crescimento de células T, as quais estão diretamente envolvidas no desenvolvimento e na atividade citotóxica das células NK. Receptores de IL-2 se distribuem não somente em células NK, mas também em monócitos e células progenitoras mielóides (Misawa *et al.*, 2000). Além disso, IL-2 *in vivo* leva à produção de citocinas secundárias, incluindo IL-1, TNF- α , IL-6, GM-CSF, M-CSF e IFN- γ , sendo utilizada no tratamento do câncer por aumentar a atividade celular e citotóxica das células efetoras. Em relação aos níveis de IFN- γ , o tratamento com NTS1 foi capaz de modular positivamente, produzindo a restauração dos

níveis desta citocina durante o crescimento do tumor. Em contrapartida, o tratamento com NTS2 não interferiu na produção destas citocinas. Quanto ao aumento na produção de IL-10 por células mononucleares esplênicas, o tratamento com os dois compostos foi capaz de reduzir os níveis desta citocina no animal portador do tumor, favorecendo a polarização para a resposta imune tipo Th1.

Outro aspecto examinado no trabalho diz respeito à frequência e capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas, pois a modificação na produção e/ou ativação dessas células é outro aspecto importante que ocorre durante o crescimento peritoneal das células do TAE. Neste sentido, observamos que em animais portadores do tumor a quantidade de células mononucleares esplênicas estava significativamente aumentada quando comparada ao grupo controle. E este aumento foi ainda mais expressivo em animais portadores do tumor tratados com NTS1, em que atingiram valores quase duas vezes maiores do que os encontrados nos animais apenas portadores de TAE. Resultados semelhantes ocorreram quando quantificamos, por citometria de fluxo, linfócitos T CD4+. O tratamento de NTS1 em animais inoculados com o tumor produziu aumentos significativos no número destas células no 16º dia após a inoculação do TAE, atingindo valores superiores aos já produzidos pelo tumor. Entretanto, não foi observado efeito do tratamento de NTS2 em células mononucleares esplênicas e em esplenócitos CD4+.

Fecchio et al (1990), demonstraram que no início do desenvolvimento do TAE o número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) é muito menor que o observado na cavidade abdominal de animais normais. No entanto, aproximadamente no décimo dia de desenvolvimento tumoral o número de células sofre um aumento significativo (Santos et al 2004). É possível que o desequilíbrio no balanço Th1/Th2 causado pelo desenvolvimento do TAE ocorra devido tanto a interações celulares como pela produção de fatores solúveis. Neste sentido, poderíamos atribuir estas mudanças do padrão Th1/Th2 ao desequilíbrio na população de células mononucleares esplênicas uma vez que essas células se encontram aumentadas no TAE, porém com deficiência em sua funcionalidade sendo, desta forma, percebida pela produção acentuada de IL-10 e diminuição de IFN- γ e IL-2. Contudo, o tratamento com NTS1 aumentou as células mononucleares esplênicas com conseqüente normalização da função através da reversão do fenótipo Th2 para Th1.

As células do sistema imunológico desempenham muitas de suas funções graças à produção de citocinas. A citocina IL-2 estimula a proliferação de células NK e células T (Misawa et al. 2000), enquanto IFN- γ , uma citocina chave secretada por células NK e Th1 ativadas, está relacionada com o reconhecimento e destruição de células alvo por regulação positiva de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade classe I e também por ação antitumoral direta (Wodnar-Filipowicz et al. 2006). Dados da literatura sugerem que a diminuição na atividade de células NK se deve em parte a regulação negativa da produção de IL-2 (Lala et al. 1985; Parhar & Lala 1985; Parhar & Lala 1988).

As células NK são potentes efetores do sistema imune inato e principalmente pela sua capacidade de produzir IFN- γ possuem um papel primordial na rejeição dos tumores (Tsavaris et al. 2002). Nossos resultados demonstram que em animais portadores de TAE a atividade citotóxica de células NK diminui em média 52%. O tratamento com NTS1 em animais portadores do tumor produziu um aumento significativo na função citotóxica das células NK, atingindo valores superiores aos encontrados em animais controle. Neste sentido, Miller *et al.* (2001) descreveram que em pacientes portadores de câncer a presença de um infiltrado tumoral rico em células NK proporciona uma maior inibição na progressão da doença. Ademais, segundo os autores, o aumento de células NK correlaciona-se com uma diminuição de metástases e com uma menor invasão linfática. Entretanto, atividade citotóxica de células NK não foi afetada em animais portadores do TAE e tratados com NTS2.

Além de afetar células NK e linfócitos T, o desenvolvimento do TAE freqüentemente redireciona a atividade citotóxica de macrófagos em prol do próprio desenvolvimento tumoral (Fecchio et al. 1990; Subiza et al. 1989). A partir disso decidimos purificar macrófagos peritoneais para avaliar os efeitos de NTS1 e NTS2 diretamente neste tipo celular.

Macrófagos são considerados como a primeira linha de defesa da resposta imunológica contra invasores, sendo um dos tipos celulares de maior eficácia do sistema de defesa imune antitumoral do hospedeiro (Chattopadhyay et al. 2002) e um dos mais importantes componentes da imunidade natural envolvidos tanto na inibição do crescimento do tumor quanto na destruição de suas células (Palermo-Neto et al. 2003). Estudos que visam encontrar alternativas para as terapias antitumorais clássicas, sugerem a ação antitumoral de compostos através da ativação direta de receptores

específicos dos macrófagos (Schepetkin & Quinn 2006). A ativação destes receptores desencadeia a cascata intracelular de sinalização, resultando em ativação da transcrição e produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IFN- γ (Schepetkin & Quinn 2006; Mondal et al. 2002).

Estudos mostram que a ativação pelo TNF- α e IFN- γ pode induzir mudanças de células progenitoras mielocíticas secretoras de TGF- β para células monocíticas não supressoras que secretam TNF- α (Young et al. 1997). Tais observações se tornam relevantes uma vez que o tratamento com NTS2 elevou de forma significativa o número de macrófagos Mac3 no peritônio de animais portadores do TAE. Enquanto que NTS1 não elevou significativamente o número desses macrófagos .

Além disso, presença do tumor diminui de forma significativa os níveis de TNF- α e IL-1 enquanto paralelamente aumenta os níveis de IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais. O tratamento com NTS1 não foi capaz de estabilizar os níveis TNF- α e IL-1 liberadas pelos macrófagos. Em contrapartida, animais portadores do TAE e tratados com NTS2 tiveram a produção tanto de TNF- α quanto IL-1 significativamente aumentada elevando os níveis destas citocinas além dos observados nos animais controle. Em relação a IL-10, ambos compostos reverteram de forma significativa o aumento desta citocina causada pela progressão do TAE. A IL-10, por ser uma citocina de padrão Th2, inibe a proliferação e ativação macrofágica. Tem sido sugerido que esta citocina pode agir no mecanismo de *feedback* negativo para prevenir efeitos deletérios da ativação excessiva de macrófagos durante a inflamação (Takata et al. 2005). Porém, quando é liberada durante o desenvolvimento tumoral sua atividade é exclusivamente em benefício do tumor, uma vez que age inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-8, IL-6, IL-1b, IL-12 (Glauser et al. 1991; Fiorentino et al. 1991; De Waal Malefyt et al. 1991; Rahim et al et al. 2005; Butcher et al. 2005). A liberação de TNF- α por macrófagos na cavidade peritoneal desempenha papel fundamental na defesa do hospedeiro, estimulando autocrinamente à ativação de monócitos e macrófagos com atividade citotóxica contra tumores, induzindo a expressão de outros mediadores imunoreguladores e inflamatórios, como citocinas de padrão Th1 (Baugh & Bucala 2001) e liberação de NO e ROIs (Fearon & Richard 1996).

A citotoxicidade dos macrófagos também é resultado da liberação maciça de óxido nítrico (NO) (Stuehr & Nathan 1989; Farias-Eisner et al. 1994) e intermediários de

nitrogênio (como por exemplo NO_2^- e NO_3^-). Macrófagos infiltrados no tecido tumoral produzem NO, que por virtude de suas propriedades difusionais é capaz de induzir apoptose em células tumorais levando a diminuição da viabilidade do tumor (Laurent et al. 1996). A presença do TAE foi capaz de estimular a produção de NO_2^- provocando um aumento nos níveis deste radical em média 3 vezes quando comparado com os animais controle. O tratamento com NTS2 produziu estímulo adicional na produção de NO_2^- no animal portador do tumor, nos três períodos avaliados. A liberação de NO_2^- por macrófagos peritoneais de animais apenas portadores de TAE ocorre pela simples presença do tumor na cavidade peritoneal. Porém o estímulo extra produzido por NTS2 aumenta de forma efetiva a atividade citotóxica dos macrófagos. Este padrão de efeito não foi observado no tratamento com NTS1.

Como podemos observar com os resultados apresentados até então, tanto NTS1 como NTS2 apresentaram atividades antitumorais de fundamental importância. NTS1 induziu pronunciada atividade citotóxica de células NK, aumento de esplenócitos CD4^+ e da proliferação e atividade de células mononucleares esplênicas, além de polarizar a resposta imunológica para o padrão Th1. O tratamento com NTS2 também induziu a reversão do padrão Th1 para Th2 causado pelo TAE, porém através da ativação macrofágica, elevando a produção TNF-alfa e IL-1 por macrófagos peritoneais, além de aumentar o número de macrófagos Mac3 no peritônio de animais inoculados com TAE. Os dois compostos apresentam diferenças estruturais discretas. Enquanto NTS1 apresenta o grupamento nitro na posição orto, NTS2 o apresenta na posição meta. Contudo, trabalhos descrevendo a atividade de outros derivados do nitroestireno (Kaap et al, 2003, Fathi et al. 2000) mostram que pequenas modificações no anel aromático desses compostos são suficientes para provocar alterações biológicas significativas. Deste modo as diferenças em nosso trabalho após o tratamento de NTS1 e NTS2 no modelo do TAE podem estar relacionadas de alguma forma com o posicionamento do grupamento nitro na molécula. No entanto, ambos compostos foram capazes de reverter às alterações hematopoéticas causadas pelo TAE, como a profunda mielosupressão causada pelo tumor, ao elevar o número de progenitores para granulócitos e macrófagos na medula óssea com conseqüente diminuição da hematopoese extra medular. Além de aumentar a atividade estimuladora de colônias no soro de animais normais e inoculados com TAE. Diante disso, decidimos analisar a atividade de NTS1 e NTS2 durante a

proliferação e diferenciação de células tronco hematopoéticas humanas (CD34+) focando no desenvolvimento de granulócitos e macrófagos.

Durante toda vida de um organismo, as células tronco hematopoéticas são requeridas, tanto em processos de auto-renovação como nos relacionados à diferenciação nas diversas linhagens sanguíneas. Portanto o controle apropriado desses processos é de fundamental importância para a manutenção da homeostasia hematopoética. Neste sentido, a indução farmacológica que leva à modulação do sistema hematopoético é uma ferramenta útil que visa, principalmente, aumentar ou restabelecer os mecanismos de defesa próprios do hospedeiro.

Para determinarmos se NTS1 e NTS2 apresentavam atividade de regulação da mielopoese, um sistema de diferenciação *ex vivo* foi utilizado. Células humanas CD34+ isoladas de sangue de cordão umbilical foram cultivadas na presença de G-CSF para induzir a diferenciação mielocítica. As células foram cultivadas na ausência e na presença de NTS1 e NTS2 e diferenças na expansão foram determinadas por contagem em azul-tripán bem como por análise de citometria de fluxo.

Observamos que NTS1 e NTS2 apresentam atividade dose-dependente na proliferação de progenitores CD34+. As células tratadas com a concentração de 0,5 μM de ambos compostos apresentaram aumento significativo na proliferação de precursores hematopoéticos enquanto a concentração de 5 μM apresentou inibição desta atividade com conseqüente aumento no número de células apoptóticas. Através de análise de citometria de fluxo quantificamos as células CD34+ no terceiro e sétimo dia de cultura. O tratamento com os dois compostos na concentração de 0,5 μM foi capaz de aumentar o número de células CD34+ no sétimo dia de cultura. NTS1 foi capaz de aumentar essas células também com a concentração de 5 μM . Este efeito é claramente observado apenas no sétimo dia de cultura indicando que os compostos possuem maior atividade na expansão de progenitores CD34+ do que em reter o fenótipo indiferenciado destas células.

Para analisarmos se os compostos apresentam atividade na população de progenitores mielóides, quantificamos por citometria de fluxo progenitores mielóides comum (PMC) e progenitores para granulócitos e macrófagos (PGM). A concentração de 0,5 μM tanto de NTS1 como de NTS2 foi capaz de aumentar o número de PMC no

terceiro dia de cultura. No sétimo dia de cultura ambos compostos aumentaram o número de PGM mostrando ativação na diferenciação de PMC através de PGM. Estes resultados foram confirmados através da capacidade formadora de colônias de NTS1 e NTS2. Tanto NTS1 como NTS2 nas duas concentrações testadas aumentaram significativamente a formação de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) mostrando a capacidade dos compostos em ativar a diferenciação mielocítica através do compartimento granulocítico/macrofágico, ilustrado pelo aumento tanto de PMC como de PGM.

O desenvolvimento de células tronco hematopoéticas em progenitores hematopoéticos faz com que essas células percam gradualmente sua característica de auto-renovação e seu potencial de diversas linhagens. Por sua vez, a perda desse potencial faz com que as células se comprometam com linhagens celulares, adquirindo desta forma características específicas. Essas características são altamente reguladas por programas genéticos que geram sinais especializados durante o processo de diferenciação (Lai et al, 2008). Durante o desenvolvimento mielocítico, o precursor mielóide comum pode se diferenciar em progenitor para granulócito e macrófago (CFU-GM) o qual da origem tanto para neutrófilos como monócitos. A maturação neutrofílica a partir do estágio de CFU-GM requer a estimulação com o fator G-CSF, enquanto a maturação monocítica requer entre outros a estimulação com M-CSF (Geest et al, 2009).

Efeitos distintos foram observados quando células CD34+ foram testadas com NTS1 e NTS2. Enquanto NTS1 aumentou de forma significativa o número de colônias para granulócitos, NTS2 aumentou significativamente as colônias macrofágicas, sugerindo diferentes atividades dos compostos nos progenitores CD34+.

O processo hematopoético envolve uma série complexa de eventos os quais são precisamente regulados pela conexão entre citocinas e o micro ambiente medular. A IL-3 e o G-CSF são citocinas chaves na regulação da hematopoese. Estudos têm demonstrado que enquanto a IL-3 estimula a proliferação de progenitores mielóides, inibe a diferenciação granulocítica induzida por G-CSF, sugerindo que as ações dessas citocinas são específicas durante os diversos estágios da diferenciação. Esses eventos requerem a expressão coordenada de muitos genes que direta ou indiretamente direcionam o processo de diferenciação, o comprometimento com linhagens específicas e a migração e maturação das células sanguíneas. Fatores transcricionais distintos estão envolvidos na regulação da expressão de diversos genes mielóides, incluindo aqueles

que codificam receptores para os fatores estimuladores de colônias, GM-CSF, G-CSF e M-CSF e proteínas como lactoferrina e gelatinase (Tenen et al, 1997).

Jude et al (2008) relacionam a interrupção de reguladores transcricionais por translocação cromossômica com a etiologia das desordens hematopoéticas. O processo de diferenciação e o comprometimento com linhagens específicas de células multipotentes envolve ativação e silenciamento seletivos de um conjunto de genes os quais são controlados por fatores transcricionais (Kondo et al, 1977, Metcalf, 1998). A produção de células mielóides parece ser orquestrada por um número relativamente pequeno de fatores transcricionais, entre eles estão PU.1, C/EBP α , C/EBP β e C/EBP ϵ . A ativação dos fatores transcricionais específicos nos diferentes estágios de desenvolvimento de células sanguíneas são essenciais para a formação de uma linhagem específica de células (Laslo et al, 2006, Iwasaki et al, 2006, Iwasaki et al, 2003, Dahl et al, 2003). Por exemplo, GATA-1 é altamente expresso em progenitores para megacariócitos/eritrócitos (PME) que dão origem aos megariócitos às células vermelhas do sangue, enquanto que C/EBP α , um fator transcricional essencial no desenvolvimento de granulócitos, está presente em progenitores de granulócitos/macrófagos (PMG). Além disso, estudos em camundongos mostram que a população de progenitores mielóides comum (PMCs) apresentam duas subpopulações distintas. Uma das subpopulações expressa altos níveis de PU.1, um mediador transcricional essencial para o desenvolvimento mielóide (Nutt et al, 2005, Back et al, 2005). Interessantemente, CMPs que expressam PU.1 mostram claro potencial mielóide, enquanto PMCs deficientes em PU.1 exibem potencial eritróide, sugerindo que a expressão de PU.1 determina a decisão do desenvolvimento dos PMCs. Além disso, estudos realizados por Friedman (2007) mostram que a interação entre estes fatores transcricionais podem converter as células de uma linhagem hematopoética para outra. A interação entre CEBP- α e GATA-1 direciona progenitor linfócito comum (PLC) para a produção de PGMs. A expressão de PU.1 está relacionada com a produção de neutrófilos porém a interação entre PU.1 e CEBP- α direciona mais para a produção de monócitos do que de neutrófilos (Dahl et al. 2003).

NTS1 e NTS2 inibiram de forma significativa o número de neutrófilos maduros, porém o composto NTS1 aumentou o número de células no estágio metamielocítico e NTS2 o número de monócitos, comprovando tanto a capacidade clonogênica de NTS1 para unidades formadoras de colônia para granulócitos (CFU-G) como de NTS2 para

unidades formadoras de macrófagos (CFU-M). Além disso, observamos que NTS1 e NTS2 não influenciaram a diferenciação final em neutrófilos, tendo em vista a ausência de células lactoferrina positivas nas culturas.

Enquanto os fatores transcricionais vêm sendo demonstrados como de fundamental importância para direcionar o processo de diferenciação hematopoética, as vias de sinalização responsáveis por regular a atividade desses fatores são menos compreendida. Geest et al. (2009) demonstraram que a via p38MAPK apresenta papel essencial na regulação da diferenciação de progenitores hematopoéticos durante a mielopoése. Os autores mostram ainda que a inibição da atividade da p38MAPK aumenta a diferenciação de neutrófilos, enquanto a sua super ativação bloqueia a maturação neutrofílica. Além disso, foi demonstrado que a atividade de p38MAPK é dependente da regulação do fator transcricional CEBP- α através da fosforilação desse fator no aminoácido serina 21. Concluindo então que o desenvolvimento mielocítico depende da inibição na fosforilação de p38MAPK com conseqüente inibição da fosforilação de CEBP- α .

Diante disso, decidimos avaliar a atividade de NTS1 e NTS2 sobre a via de sinalização p38MAPK e sobre o fator transcricional CEBP- α . Os efeitos fenotípicos na proliferação e na diferenciação observados após o tratamento com NTS1 e NTS2 podem estar relacionados com a via p38MAPK e o fator transcricional CEBP- α já que os compostos nas duas concentrações testadas (0,5 e 5 μ M) foram capazes de inibir a fosforilação de p38 e do fator CEBP- α em células CD34+ no 7^o dia de cultura.

Além de ser ativada por citocinas que promovem proliferação e diferenciação de progenitores hematopoéticos, a via de sinalização p38MPK é também ativada por estímulos celulares que exercem efeitos regulatórios negativos na hematopoese. A p38MAPK é ativada por citocinas mielossupressivas e o tratamento de progenitores hematopoéticos humanos com IFN- α e β TGF- β resulta em inibição dose dependente de colônias mielocíticas em ensaio de metilcelulose para formação de colônias. Além disso, a ativação constitutiva da via MAPK é relacionada com uma variedade de desordens mielocíticas, incluindo leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica e mielodisplasia (Platanias, 2003; Johnson, 2007). Segundo Shahjahan (2008), a via p38MAPK se encontra constitutivamente ativada na medula óssea de pacientes com síndrome mielodisplásica e a inibição da atividade de p38MAPK, aumenta apoptose de

blastos alterados e estimula a formação de colônias de progenitores sugerindo que a super ativação dessa via está relacionada com defeitos no processo de diferenciação. Geest et al (2009) demonstraram que a inibição de p38MAPK em pacientes com neutropenia congênita severa, não responsivos ao estímulo com G-CSF, restabelece totalmente a diferenciação de neutrófilos. Estes autores mostram ainda que a super ativação da p38MAPK pode, por exemplo através da fosforilação de CEBP- α em serina 21, estar envolvido no desenvolvimento específico de desordens da medula óssea.

O fator transcricional CEBP- α tem sido chamado por muitos autores de “fator mielóide” por estar amplamente expresso em progenitores para granulócitos/macrófagos (PGMs). Resultados mostram que a expressão ectópica de CEBP- α é suficiente para restaurar o desenvolvimento neutrofílico de progenitores mielodisplásicos, suportando a hipótese de que a interrupção da granulopoese em pacientes com mielodisplasia é, pelo menos em parte, devido a alteração na expressão ou funcionabilidade de CEBP- α . Interessantemente, o efeito de CEBP- α foi mais pronunciado durante o desenvolvimento de neutrófilos do que no crescimento de CFU-GM, mostrando seu efeito chave durante a diferenciação granulocítica (Geest et al, 2009). Esses resultados confirmam resultados anteriores que mostram que a expressão de CEBP- α é detectada em precursores mielóides e regula o comprometimento de granulócitos, indicando que esse fator pode exercer seus maiores efeitos em fases tardias da granulopoese (Akashi et al, 2000, Radomska et al, 1998).

G-CSF é uma citocina essencial para a proliferação de progenitores mielóides e sua diferenciação em neutrófilos maduros. Estudos demonstraram que CEBP- α apresenta atividade na regulação da expressão de receptores para G-CSF (Zhang et al, 1998, Smith et al, 1996). Além disso, células CD34+ de pacientes mielodisplásicos, tanto de baixo como de alto risco, apresentaram diminuição na expressão do receptor para G-CSF (Sultana et al, 2003). Esses pacientes com baixa expressão do receptor tiveram uma alta propensão para o desenvolvimento de neutropenia e uma baixa ou ausente resposta a administração de G-CSF. Esse fato pode estar relacionado com a regularização de CEBP- α , uma vez que esse fator pode aumentar a expressão de receptores para G-CSF, resultando no desenvolvimento de neutrófilos.

Nossos resultados mostram que os compostos NTS1 e NTS2 apresentam importantes atividades durante o processo hematopoético. Ambos apresentaram

capacidade de expansão de células CD34+ com aumento significativo na porcentagem dessas células no sétimo dia de cultura. Além disso, tanto NTS1 como NTS2 apresentaram capacidade de direcionar a expansão de células CD34+ para o compartimento granulocítico/macrofágico, uma vez que aumentaram o número de progenitor mielóide comum com conseqüente aumento de progenitor para granulócitos e macrófagos. Porém durante o processo de diferenciação de células CD34+ os compostos apresentaram atividades distintas. Em ensaio de unidade formadora de colônia, NTS1 apresentou pronunciada atividade na formação de CFU-G enquanto NTS2 direcionou para o aumento de CFU-M. Essas atividades foram confirmadas pela morfologia de células maduras, onde NTS1 aumentou a porcentagem de metamielócitos (estágio anterior de neutrófilos maduros) enquanto NTS2 aumentou a porcentagem de monócitos maduros. Novamente NTS1 e NTS2 apresentaram diferenças nas atividades biológicas que podem estar relacionadas com as diferenças estruturais presentes nos dois compostos.

Relacionando a atividade de NTS1 e NTS2 no processo de expansão e diferenciação de células CD34+ com a inibição da via de sinalização p38MAPK observamos que ambos compostos direcionam o processo hematopoético para a formação de granulócitos e macrófagos ao mesmo tempo em que inibem a p38MAPK, o que favorece o desenvolvimento mielocítico. O mecanismo molecular na produção de neutrófilos envolve a inibição da via p38MAPK e a forma defosforilada do fator transcricional CEBP- α . Apesar de ambos compostos inibirem a fosforilação de p38MAPK e de CEBP- α em células CD34+, NTS1 e NTS2 direcionam o processo de diferenciação de forma distinta dentro do compartimento granulocítico/macrofágico. O desenvolvimento da linhagem granulocítica pelo composto NTS1 é sustentado pela inibição de p38MAPK e CEBP- α . Porém, autores (Cai et al, 2008) mostram que além de regular o fator de CEBP- α a via p38MAPK também apresenta atividade sob outros fatores como o PU.1 que em associação com CEBP- α favorece a produção de monócitos. Além disso, essa interação ativa o receptor para M-CSF e promotores de IL-1 no favorecimento de monócitos em detrimento de granulócitos. A partir disso, podemos inferir que NTS2 pode apresentar atividade em outro fator transcricional em conjunto com a via p38MAPK e o fator CEBP- α no desenvolvimento mielocítico. Apesar dos mecanismos de ação pelos quais NTS1 e NTS2 exercem suas atividades imunohematopoéticas não estarem completamente esclarecidos, nossos resultados sugerem a possibilidade de utilização desses compostos

em terapias mais específicas para o tratamento de desordens hematológicas e da medula óssea.

6. CONCLUSÕES

A partir dos experimentos realizados podemos concluir neste trabalho que a utilização de:

- ❖ NTS1 e NTS2 prolongam a sobrevivência de animais portadores do TAE;
- ❖ NTS1 e NTS2 revertem a mielosupressão e a estimulação extra-medular (esplênica) induzida pelo desenvolvimento tumoral;
- ❖ NTS1 e NTS2 aumentam a atividade estimuladora de colônias no soro;
- ❖ NTS1 aumenta a atividade de células NK;
- ❖ NTS1 aumenta a proliferação de células mononucleares esplênicas e o número de linfócitos T CD4+;
- ❖ NTS1 aumenta a produção de citocinas com padrão Th1 (IFN-gama e IL-2), paralelamente tanto NTS1 como NTS2 diminuíram a produção de IL-10 (padrão Th2) por células esplênicas;
- ❖ NTS2 aumenta a produção de macrófagos peritoneais (Mac3);
- ❖ NTS2 aumenta a produção de TNF-alfa, IL-1 por macrófagos peritoneais além de aumentar a atividade antitumoral de macrófagos pelo estímulo da produção nitrito;
- ❖ NTS1 e NTS2 produzem efeito concentração dependente na proliferação e viabilidade de células CD34+;
- ❖ NTS1 e NTS2 aumentam células tronco hematopoéticas (CD34+) no sétimo dia de cultura;
- ❖ NTS1 e NTS2 aumentam PMC e PGM no terceiro e sétimo dia de cultura, respectivamente;
- ❖ NTS1 estimula a formação de CFU-G enquanto NTS2 estimula a formação de CFU-M;
- ❖ NTS1 e NTS2 diminuem a porcentagem de neutrófilos maduros, entretanto NTS1 aumenta a porcentagem de metamielócitos e NTS2 a porcentagem de monócitos;
- ❖ NTS1 e NTS2 podem regular a mielopoiese através da inibição da via de sinalização de p38MAPK e do fator transcricional C/EBP-alfa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akashi K, Traver D, Miyamoto T et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineage. *Nature* 2000; 404:193-197.

Back J, Allman D, Chan S, et al. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp. Hematol* 2005; 33: 395-402.

Barreiro EJ, Fraga, CAM. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, Artmed Ed. Ltda: Porto Alegre, 2001.

Batard P, Monier MN, Fortunel N, Ducos K, Sansilvestri-Morel P, Phan T, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. TGF-beta maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci* 2000; 113:383-90.

Baugh JA & Bucala R. Mechanisms for modulating TNF in immune inflammatory disease. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 4 2001; 635-650,.

Betz M & Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not Th2 lymphokines. *J of Immuno.*1991; 146: 108.

Bincoletto C, Eberlin S, Figueiredo CAV, Luengo MB, Queiroz MLS. Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *International Immunopharma.* 2005; 679-688.

Butcher BA, Kim L, Panopoulos AD, Watowich SS, Murray PJ and Denkers EY Cutting Edge: IL-10- Independent STAT3 Activation by *Toxoplasma gondii* Mediates Suppression of IL-12 and TNF- α in Host Macrophages. *J of Immuno* 2005; 174: 3148-3152.

Cai DH, Wang D, Keeper J. C/EBP alpha: AP-1 leucine zipper heterodimers bind novel DNA elements, activate the PU.1 promoter and direct monocyte lineage commitment more potently than C/EBP alpha homodimers or AP-1. *Oncogene* 2008, 27, 2772-2779.

Cemazar M, Auersperg M, Scancar J, Kirbis IS, Pogacnik A, Sersa G. Schedule-dependent interaction between vinblastine and cisplatin in Ehrlich ascites tumors in mice. *Journal of Pharma and ExpeTherapeutics* 2002; 302: 337-343.

Chang L and Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001; 410:37-40.
Chattopadhyay S, Das T, Sa G, Ray P K. Protein A-activated macrophages induce apoptosis in Ehrlich's ascites carcinoma through a nitric oxide-dependent pathway. *Apoptosis* 2002; 7(1): 49-57.

Cheers C, Haigh AM, Kelso A, Metcalf D, Stanley ER, Young M. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect Immun* 1988; 56: 247-51.

Cheers C, Stanley ER. Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. *Infect Immun* 1988; 56: 2972-8.

Clerici E, Schechter I, Sela M. Haemagglutination-inhibition studies of the combining sites of anti-peptide antibodies in mice and rats. *Immuno* 1970; 19(2):267-75.

Dahl R, Walsh JC, Lancki D et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1: CEBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* 2003; 4: 1029-1036.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-252.

De Waal Malefyt, R., Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J of Exp Medicine* 1991; 174: 1209-1220,.

DeGowin, RL, Gibson DP, Knapp SA, Wathen LM. Tumor-induced suppression of marrow stromal colonies. *Exp Hemato* 1981; 9(7): 811-819.

Delmonte L, Liebelt AG, Liebelt RA. Granulopoiesis and thrombopoiesis in mice bearing transplanted mammary cancer. *Cancer Res* 1966; 26(1):149-59.

Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immuno* 2002; 20:55-72.

Eberlin S, Santos LMB, Queiroz MLS. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1235-46.

Ehrlich e Apolant. *Berliner Klin Wochenschrift* 1905; 42: 871–874.

Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage factor. *Immuno* 2005; 114: 313-321.

Engelman JA, Lisanti MP, Scherer PE. Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3t3-l1 adipogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 32111-32121.

Farias-Eisner, R., Shermant M.P., Aeberhard, E. and Chaudhuri, G. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. *Proceed of the Nat Acad of Scie (USA)* 1994; 91: 9407-9411.

Fathi AR, Krautheim A, Kaap S, Eger K, Steinfeldler HJ. Michael adducts of ascorbic acid as inhibitors of protein phosphatase 2A and inducers of apoptosis. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10: 1605–1608.

Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272(5258): 50–53,.

Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation* 1990; 14(1): 125-132.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann Tr, Howard M, O'garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J of Immuno* 1991;147: 3815-3822.

Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2007; 26:6816-6828.

Geest RC, Buitenhuis M, Groot-Koerkamp MJA, et al. Tight control of MEK-ERK activation is essential in regulating proliferation, survival and cytokine production of CD34+ derived neutrophil progenitors. *Blood* 2009; doi:10.1182.

Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 1991; 338(8769), 732-736.

Gordon MY, Riley GP, Watt SM, Greaves MF. Compartmentalization of a hematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglicans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 1978; 326: 403.

Grynberg NF, Echevarria E, Lima JE, Pamplona SS, Pinto AC, Maciel MA. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 1999; 65(8), 687-689.

Gupta M, Mazumder UK, Kumar RS, Sivakumar T, Vamsi ML. Antitumor activity and antioxidante status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *J of Pharma Scie* 2004 94(2), 177-184.

Gupta P, Oegema TR, Brazil JJ, Dudek AZ, Slungaard A, Verfaillie CM. Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks in vitro when interleukin-3 and a single chemokine are combined with O-sulfated heparin sulfates: requirement for optimal binding interaction of heparan sulfate with earlyacting cytokines and matrix proteins. *Blood* 2000; 95: 147.

Hilkens CMU, Vermculen H, Jost-Van-Neerven et al. Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. *Eur J of Immuno* 1995; 25: 59.

INCA. Ministério da Saúde, Brasil, 2005.

Ito K, Hirao A, Arai F et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2006; 12:446-451.

Jang Y, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 2007; 110:2056-3063.

Johnson DE. Src family kinases and the MEK/ERK pathway in the regulation of myeloid differentiation and myeloid leukemogenesis. *Adv Enzyme Regul* 2007;24:123-129.

Jude CD, Gaudet JJ, Speck NA et al. Leukemia and hematopoietic stem cell: balancing proliferation and quiescence. *Cell Cicle* 2008; 7:586-591.

Justo GZ, Durán N, Queiroz MLS. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokine profile in tumor-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. *Immunophar and Immunoto* 2003; 25(3), 305-319.

Kaap S, Quentin I, Tamiru D, Shaheen M, Eger K, Steinfeldt HJ. Structure–activity analysis of the pro-apoptotic, antitumor effect of nitrostyrene adducts and related compounds. *Biochem Pharmacol* 2003; 65, 603–610.

Katsoulidis E, Li Y, Yoon P et al. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase mediates the suppressive effects type I interferons and transforming growth factor-beta on normal hematopoiesis. *J Biol Chem* 2002; 277:7726-7735.

Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C et al. Neutrophil in the innate immune response. *Arch. Immonol Ther Exp* 2005; 53:505-517.

Kondo M, Wagers AJ, Manz MG et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors:implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003;21:759-806.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Nature* 1997; 91:661-672.

Kouides P, Bennet J. Understanding the Myelodysplastic Syndromes. *Oncologist* 1997; 2: 389-401.

Kubinyi, H. *QSAR: Hansch analysis and related approaches*. VCH: New York, 1993.

Kyriakis JM, Avruch L. Mammalian mitogen-activated protein kinases signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001;81:807-869.

Laemmli, UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259): 680-685.

Lala PK, Santer V, Liberson H, Parhar RS. Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. 1. Kinetics and in vivo significance. *Cellu Immuno* 1985; 93(2), 250-264.

Laurent M, Lepoivre M, Tenu JP. Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 1996; 314, 109-113.

Lawal RA, Calvi LM. The niche as a target for hematopoietic manipulation and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17(6):415-22.

Mahmud S, Ghafoor T, Badsha S et al. Bacterial infections in pediatric in paediatric patients with chemotherapy induced neutropenia. *JPak Med Assoc* 2004; 54: 237-243.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immuno Today* 1992; 13(7), 265-270.

Manz MJ, Traver D, Miyamoto T et al. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001; 97:3333-3341.

Marusic M. Immune mechanisms in Ehrlich ascites tumor growth in mice. *Eur J of Cancer* 1979;15(1), 39-45.

Matsuzaki P, Akisue G, Salgado Oloris SC, Gorniak SL, Zaidan Dagli ML. Effect of *Pfaffia paniculada* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. *Life Sciences* 2003; 74(5), 573-579.

Melo A, Justo GZ, Queiroz MLS. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes* infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. Hum Exp Toxicol 2001; 20: 38-45.

Metcalf D. Hematopoietic stem cells: old and new. Biomed Pharmacother 2001; 55: 75-8.

Metcalf D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. Blood 1998; 92: 345-347.

Milharez N, Calheiros R, Marques MPM, Garrido J, Cordeiro MNDS, Rodrigues C, Quintera S, Novais C, Peixe L, Borges F. b-Nitrostyrene derivatives as potential antibacterial agents: a structure–property–activity relationship study. Bioorg Med Chem 2006;14: 4078–4088.

Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. Exp Hematol, 2001; 29: 1.157.

Misawa E, Sakurai T, Yamada M, Hayasawa H, Motoyoshi K. Effects of macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 administration on NK1.1(+) cells in mice. Inter J of Immunopharma 2000; 22(11), 967-977.

Mondal TK, Bhatta D, Biswas S, Pal P. Repeated treatment with *S. aureus* superantigens expands the survival rate of Ehrlich ascites tumor bearing mice. Immunolo Investiga 2002; 31(1), 13-28.

Morooka T, Nishida E. Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in pc12 cells. J Biol Chem 1998; 273: 24285-24288.

Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. Annu. Rev. Cell Biol 1995; 11:35-71.

Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulation subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity 1994; 1: 661-673.

Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L et al. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. Proc. Natl Acad USA 2000; 97:10454-10459.

Nagata Y, Todohoro K. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and inhibition of ERK for apoptosis. Blood 1999, 94: 853-863.

Nutt SL, Metcalf D, D'Amico et al. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. J Exp Med 2005; 201:221-231.

Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. Cell 2008; 132:631-644.

Osawa M, Hanada H et al. Long-term lymphopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cells. Science 1996; 273: 242-245.

Palermo-Neto J, Oliveira Massoco C, Robespierre de Souza W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. Brain Behavior and Immunity 2003; 17(1), 43-54.

Parhar RS & Lala PK. Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. 2. The mechanism of suppression of NK activity. Cell Immunol 1985; 93(2), 265-279.

Parhar RS & Lala PK. Prostaglandin E2-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor bearing host macrophages. J of Leukoc Biol 1988, 44, 474-484.

Pelus LM & Bockman RS. Increased prostaglandin synthesis by macrophages from tumor-bearing mice. J of Immunol 1979; 123, 2118-2125.

Pessina A, Bambrilla P, Villa S, Marocchi A, Mocarelli P. CFU-s and CFU-c proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich ascitic fluid. Oncology 1982(b); 39, 391-395.

Pessina A, Brambilla P, Villa S, Marocchi A, Mocarelli P. Factors produced by macrophages and tumor cells: Influence on the granulocytic precursor cells (CFU-C) in normal and tumor-bearing mice. *J of Can Research and Clin Oncol* 1982(a), 102(3), 235-244.

Platanias LC. Map kinase signaling pathway and hematologic malignancies. *Blood* 2003; 101:4667-4679.

Queiroz ML, Valadares MC, Bincoletto C, Dieamant GC. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. *Immunopharma and Immunotoxicol* 2004; 26(4), 511-525.

Queiroz MLS, Justo GZ, Valadares MC, Pereira-da-Silva FRR. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. *Immunopharma Immunotoxicol* 2001; 23: 367-82.

Queiroz MLS, Rodrigues APO, Bincoletto C, Figueiredo CAV, Malacrida S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 889-900.

Queiroz MLS, Valadares MC, Torello CO, Ramos AL, Oliveira AB, Rocha FD, Arruda VA, Accorci WR. Comparative Studies of the effects of *Tabebuia avellanedae* bark extract and β -lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. *J of Ethnopharma* 2008; 117, 228-235.

Radomska HS, Huettner CS, Zhang P et al. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* 1998; 18:4301-4314.

Rahim SS, Khan N, Boddupalli CS, Hasnain SE, Mukhopadhyay S. Interleukin-10 (IL-10) mediated suppression of IL-12 production in RAW 264.7 cells also involves c-rel transcription connection. *J of Leukocy Biology* 1998; 64, 275-290.

Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007;26:3100-3012.

Ruiz de Morales J, Vélez D, Subiza JL. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. *Expl Hematol* 1999, 27, 1757-1767.

Sakai M, Fonseca ES, Dagli ML, Palermo-Neto J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Life Sci* 2006; 78(16), 1777-1783.

Santos MM, Silva RJ, Silva MG & Fecchio D. Subpopulations of mononuclear leucocytes associated with inhibition of Ehrlich ascites tumor growth by treatment with *Bothrops jararaca* venom. *Mediators of Inflammation* 2004; 13(1), 29-32.

Schaefer HJ and Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 1999; 19:2435-2444.

Schepetkin IA & Quinn MT. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Letters* 1997; 414, 1-6.

Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Letters* 1997; 414, 1-6.

Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunology Letters* 2000; 74, 111-115.

Sheeja K & Kuttan G. Modulation of natural killer cell activity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity by andrographolide in normal and Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Integrative Cancer Ther* 2007; 6, 66-73.

Simone C, Forcales SV, Hill DA et al. P38 pathway target swi-snf chromatin-remodeling complex to muscle specific loci. *Nat Genet* 2004; 36: 738-743.

Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA et al. PU.1 (Spi-1) and C/EBP-alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* 1996; 88:1234-1247.

Souza-Queiroz J de, Torello CO, Palermo-Neto J, Valadares MC, Queiroz MLS. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an *in vivo* challenge with *Listeria monocytogenes*: modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 1056-65.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988, 241: 58-62.

Staszewski H. Hematological paraneoplastic syndromes. *Seminars in Oncology* 1997; 24, 329-332.

Stuehr DJ & Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J of Exp Med* 1989; 169, 1543-1555.

Subiza JL, Vinuela JE, Rodriguez R, Gil J, Figueredo MA, De La Concha EG. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. *I J of Cancer* 1989; 44(2), 307-314.

Sultana TA, Harada H, Ito K et al. Expression and functional analysis of granulocyte colony-stimulating factor receptors on CD34+ cells in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 121:63-75.

Sunila ES & Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 90(2-3), 339-346.

Takata R, Yamamoto R, Yanai T, Konno T, Okubo T. Immunostimulatory effects of a polysaccharide-rich substance with antitumor activity isolated from black currant (*Ribes nigrum* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2005; 69(11), 2042-2050.

Tamura K, Sudo T, Senftleben U et al. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* 2000; 102:221-231.

Teixeira ST, Valadares MC, Goncalves AS, Melo A, Queiroz MLS. Prophylactic administration of *Withania somnifera* extract increases host resistance in *Listeria monocytogenes* infected mice. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1535-42.

Tenen DG, Hromas R, Licht JD et al. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 1997; 90: 489-519.

Traver D, Akashi K, Manz et al. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 2000; 290:2152-2154.

Traver D, Akashi K. Lineage commitment and development plasticity in early lymphoid progenitor subset. *Adv Immunol* 2004; 83:1-54.

Tripodo C, Sangaletti S, Piccaluga PP, Prakash S, Franco G, Borrello I, Orazi A, Colombo MP, Pileri SA. The bone marrow stroma in hematological neoplasm. *J Cell Sci.* 2000; 113:383-90.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76(9), 4350-4354.

Utsumi K, Takai Y, Tada T, Ohzeki S, Fujiwara H, Hamaoka T. Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. *J of Immuno* 1990; 145(1), 397-403.

Valadares CM, Carrucha SG, Accorsi W, Queiroz MLS. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. *Immunopharmacol* 2006 (a); 6, 294-299.

Valadares MC, Klein SI, Guaraldo AMA, Queiroz MLS. Enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumour. Eur J of Pharmaco 2003; 473, 191- 196.

Valadares MC, Klein SI, Queiroz MLS. Titanocene modulation of cytokine imbalance induced by Ehrlich ascites tumour progression. Eur J of Pharmaco 2004; 503, 203-208.

Villar JAFP, Lima FTD, Veber CL, Oliveira ARM, Calgarotto AK, Marangoni S, da Silva SL. Synthesis and evaluation of nitrostyrene derivative compounds, new snake venom phospholipase A2 inhibitors. Toxicon 2008; 15: 51-58.

Vogel, A.I. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (rev. by Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Smith, P.W.G., Tatchell, A.R.), 5th ed. Longman Scientific and Technical 1989.

Wada T, Penninger JM. Mitogen- activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 2004; 23:2838-2849.

Wang W, Bi J, Wu L, Li Z, Wang X, Fu X. Hydrothermal synthesis and performance of a novel nanocrystalline $PB_2SN_2O_6$ photocatalyst. Nanotechnology 2008; 19(50):505-705.

Wang X. Fresh Platinum complexes with promising antitumor activity. Anticancer Agents Med Chem 2010; 10(5): 396-411.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments , and transdifferentiation. Annu RevCell Dev. 2001; 17: 287-403.

WHO. World Health Organization 2008.

Wilson A, Oser GM, Jaworski M et al. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1106:64-75.

Wing EJ, Barczynski LC, Waheed A, Shadduck RK. Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and non immune mice. Infect Immun 1985; 49: 325-8.

Wing EJ, Waheed A, Shaddock RK. Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect Immun* 1984; 45: 180-4.

Winkler IG, Barbier V, Wadley R et al. Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood* 2010; 116(3):375-85.

Wodnar-Filipowicz A, Kalberer CP. Functions of natural killer cells in immune defense against human leukemia. *Swiss Medical Weekly* 2006; 136, 359-364.

Yamamoto N, Zou JP, Li XF, Takenaka H, Noda S, Fujii T, Ono S, Kobayashi Y, Mukaida N, Matsushima K, Fujiwara H, Hamaoka T. Regulatory mechanisms for production of IFN- γ and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state. *The J of Immuno* 1995; 154, 2281-2290.

Yamazaki H, Nitta K, Umezawa H. Immunosuppression induced with cell-free fluid of Ehrlich carcinoma ascites and its fractions. *Gann* 1973; 64(1), 83-92.

Young MR, Wright MA, Pandit R. Myeloid differentiation treatment to diminish the presence of immune-suppressive CD34+ cells within human head and neck squamous cell carcinomas. *The J of Immuno* 1997; 159(2), 990-996.

Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005;15:11-18.

Zhang P, Iwama A, Datta MW et al. Upregulation of interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor receptors by transcription factor CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) is critical for granulopoiesis. *J Exp Med* 1998; 188:1173-1184.

Zhang P, Nelson E, Radomska HS, et al. Induction of granulocytic differentiation by 2 pathways. *Blood* 2002; 99: 4406-4412.

8. ANEXOS



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1754-1, sobre "Avaliação da atividade anti-tumoral de compostos derivados de Nitrostireno em camundongos portadores de tumor acístico de Ehrlich", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz / Andrana Karla Calgarotto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 09 de fevereiro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1754-1, entitled "Evaluation of antitumor activity of Nitrostirene derivatives compounds in Ehrlich ascites tumor bearing mice", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on February 9, 2009.

Campinas, 09 de fevereiro de 2009.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA - Unicamp
Caixa Postal 5109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisa@unicamp.br
<http://www.cb.unicamp.br/ceea/>