

ALINE LISIE RAMOS

Atividade imunomoduladora da alga *Chlorella vulgaris*
em camundongos portadores de tumor ascítico de
Ehrlich



2008

ALINE LISIE RAMOS

**Atividade imunomoduladora da alga *Chlorella vulgaris*
em camundongos portadores de tumor ascítico de
Ehrlich**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação em
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do
título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



Campinas, 2008

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

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

R147a	Ramos, Aline Lisie Atividade imunomoduladora da alga <i>Chlorella vulgaris</i> em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich / Aline Lisie Ramos. Campinas, SP : [s.n.], 2008. Orientador: Mary Luci de Souza Queiroz Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Chlorella. 2. Carcinoma de Ehrlich. 3. Hematopoeese. 4. Células NK. 5. Fator de Necrose Tumoral alfa . 6. Citocinas. 7. Macrófagos. I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês: Immunomodulatory activity of the alga *Chlorella vulgaris* in Ehrlich ascites tumor bearing mice

Keywords: • Chlorella

- Ehrlich ascites tumor
- Hematopoiesis
- Killer Cells, Natural
- Tumor Necrosis Factor-alpha
- Cytokines
- Macrophages

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

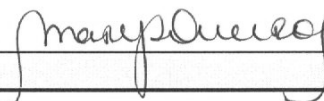
Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
Profa. Dra. Denise Fecchio
Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade
Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos
Profa. Dra. Ivani Aparecida de Souza

Data da defesa: 12 - 12 - 2008

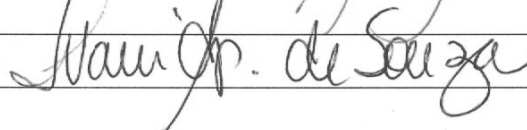
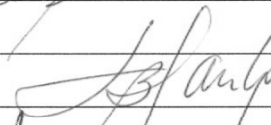
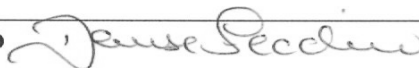
Banca examinadora de Tese de Doutorado

Aline Lisie Ramos

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Mary Luci de Souza Queiroz



Membros:
Professor (a) Doutor (a) Denise Fecchio
Professor (a) Doutor (a) Claudia Bincoletto Trindade
Professor (a) Doutor (a) Leonilda Maria Barbosa dos Santos
Professor (a) Doutor (a) Ivani Aparecida de Souza



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

Data: 12/12/2008

*Dedico este trabalho aos meus pais e irmão,
pela realização de um sonho.*

Agradecimentos

À Deus por mais esta conquista e por sempre iluminar minha caminhada.

Aos meus queridos pais, Daniel e Neide, pelo incentivo, dedicação, amor e apoio incondicional. Vocês ainda hão de sentir muito mais orgulho desta “Fiota” aqui!!! Mãezinha, onde quer que você esteja, saiba que valeu à pena todo o sacrifício!!!

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

Ao meu irmão Daniel, pelo carinho e amizade.

À minha querida tia e madrinha Luzia pela dedicação, apoio, conselhos, carinho e oração.

À minha segunda família (Maschietto), Hermes, Cleide, Maurício, Murilo e minha grande e eterna amiga Mariana (Milka), pela compreensão, apoio e carinho.

Ao meu vovozinho Deusdet pelo incentivo e apoio. Vô, finalmente eu sô “Dotora”!!!

À minha vovozinha Amélia por todo o amor e carinho.

Aos meus avós, Ofélia e Francisco, pelo incentivo e apoio.

Aos meus tios Nilson, Cleuza, Hélia, Vilma e Teresa pelo incentivo, apoio e carinho.

À toda a família Lucena e à família Ramos.

Às grandes amigas, Ana Paula, Cristina, Vanessa, Daniela e Luciene (Roska) pela amizade, pelo apoio e ajuda incondicional. Ah, e pelas risadas, baladas, concentrações, por enxugarem minhas lágrimas, enfim, valeu gurias!!!

Às eternas e queridas amigas, Camila e Samara, pela amizade, paciência, apoio e ajuda incondicional. Eita mulhé que eu nem sô mais aquela “lerdeza”!!!

À querida amiga, Cris Okuda, pela amizade, paciência e ajuda incondicional. Ah, e por sempre “quebrar os meus galhos”, puxar minha orelha quando necessário, pelos conselhos, enfim . Eita japonesinha sabida!!!

Às não menos importante amigas, Marianinha, Michele, Mirian e Andrana, pela amizade, apoio e ajuda.

Aos amigos, Sueli e Raphael, pela amizade, paciência, e ajuda. Estes 5 anos não foram fáceis, mas passaram quase tão rápido quanto eu falo, né?!!!

À nova razão da minha vida e provavelmente amor eterno, Pablo Patrón Barrera, por todos os momentos ao seu lado, pelo amor, carinho, dedicação e apoio. Ai, ai, ai!!!!!!!... amor!!!

À Dra. Rita Perlingeiro, pelos ensinamentos, oportunidades e amizade;

A todos que compõem o laboratório de CFU e Imunotoxicologia.

Ao departamento de Farmacologia e Hemocentro.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Alga <i>Chlorella vulgaris</i> (CV).....	18
1.2. Tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	21
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Alga <i>Chlorella vulgaris</i>	27
3.2. Animais.....	27
3.3. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	27
3.4. Realização das curvas de sobrevida.....	28
3.5. Tratamento dos animais.....	29
3.6. Cultura de longa duração da medula óssea (Long-Term Bone Marrow Culture - LTBMC).....	30
3.7. Avaliação da atividade estimuladora de colônias (CSA).....	31
3.7.1. Cultura clonal de precursores hematopoéticos.....	31
3.8. Avaliação da atividade citotóxica de células “Natural Killer” (NK).....	32
3.8.1. Manutenção e preparo das células alvos.....	32
3.8.2. Células efetoras esplênicas.....	32
3.8.3. Ensaio de liberação de ⁵¹ Cr.....	33
3.9. Preparação de células mononucleares esplênicas.....	33
3.10. Preparação de macrófagos esplênicos.....	34
3.11. Preparação de macrófagos peritoneais.....	35
3.11.1. Obtenção do sobrenadante de cultura para dosagem de citocinas.....	35
3.11.2. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	35
3.11.3. Produção de nitrito (NO ₂ ⁻).....	36
3.12. Quantificação de citocinas.....	36
3.13. Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Análise da sobrevida.....	39
4.2. Cultura de longa duração da medula óssea (LTBMC).....	42
4.2.1. Formação de estroma medular em LTBMC.....	42
4.2.2. Viabilidade de células não-aderentes.....	43

4.2.3. Viabilidade de células aderentes.....	44
4.2.4. Número total de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na suspensão de células não-aderentes da LTBM.....	45
4.2.5. Produção de citocinas no sobrenadante de LTBM.....	47
4.2.5.1. Produção de IL-6.....	47
4.2.5.2. Produção de IL-1 α	49
4.3. Atividade estimuladora de colônia (CSA).....	50
4.4. Atividade citotóxica de células Natural Killer.....	51
4.5. Capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas.....	52
4.6. Produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10 por células esplênicas.....	54
4.6.1. TNF- α	54
4.6.2. IFN- γ	55
4.6.3. IL-2.....	56
4.6.4. IL-10.....	57
4.7. Produção de TNF- α , IFN- γ e IL-10 por macrófagos esplênicos e peritoneais.....	58
4.7.1. TNF- α	58
4.7.2. IFN- γ	60
4.7.3. IL-10.....	62
4.8. Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos peritoneais.....	64
4.9. Produção de NO ₂ ⁻ por macrófagos peritoneais.....	66
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

Lista de Figuras

Figura 1: A) Alga <i>Chlorella vulgaris</i> in natura; B) Pó da alga; C) Célula da alga.....	21
Figura 2: A) Camundongo portador de TAE; B) Esfregaço do líquido ascítico de camundongo portador de TAE corado com Giemsa; C) Células de TAE coradas com PAS.....	21
Figura 3: Protocolo experimental para avaliação do efeito dos tratamentos Terapêutico e Profilático/Terapêutico de diferentes doses da alga <i>Chlorella vulgaris</i> (25, 50, 100 e 500 mg/Kg) na sobrevida de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich.....	28
Figura 4: Protocolo experimental para avaliação da atividade imunomoduladora da dose de 50 mg/Kg de CV na manutenção da hematopoese pelo microambiente medular, atividade estimuladora de colônias de células hematopoéticas no soro, atividade de células NK, capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas, bem como a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10 por estas células e atividade de macrófagos através da determinação dos níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-10, H ₂ O ₂ e NO ₂ ⁻ em modelo experimental in vivo de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich.....	29
Figura 5: Efeito do tratamento Terapêutico com diferentes concentrações de CV (25, 50, 100 e 500 mg/Kg), na sobrevida de camundongos BALB/c portadores de TAE.....	40
Figura 6: Efeito do tratamento Profilático/Terapêutico com diferentes concentrações de CV (25, 50, 100 e 500 mg/Kg), na sobrevida de camundongos BALB/c portadores de TAE.....	41
Figura 7: Aspecto microscópico da LT BMC.....	42
Figura 8: Número total de progenitores CFU-GM na suspensão de células não-aderentes de LT BMC de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	46
Figura 9: Produção de IL-6 (pg/ml) no sobrenadante de LT BMC de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	48
Figura 10: Produção de IL-1 α (pg/ml) no sobrenadante de LT BMC de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	49
Figura 11: Atividade estimuladora de colônias (unidades de CSF/mL) no soro de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	50
Figura 12: Atividade das células NK de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	51

Figura 13: Atividade proliferativa de células esplênicas de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	53
Figura 14: Produção de TNF- α (pg/ml) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	54
Figura 15: Produção de IFN- γ (pg/ml) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	55
Figura 16: Produção de IL-2 (pg/ml) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	56
Figura 17: Produção de IL-10 (pg/ml) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	57
Figura 18: Produção de TNF- α (pg/ml) por macrófagos peritoneais e esplênicos de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	59
Figura 19: Produção de IFN- γ (pg/ml) por macrófagos peritoneais e esplênicos de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	61
Figura 20: Produção de IL-10 (pg/ml) por macrófagos peritoneais e esplênicos de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	63
Figura 21: Produção de H ₂ O ₂ (nM) por 1x10 ⁵ macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	65
Figura 22: Produção de NO ₂ ⁻ (μ mol) por 1x10 ⁵ macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	67
Figura 23: Esquema das alterações induzidas pelo desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich e possíveis locais de ação da CV.....	81

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1:</i> Número de células não aderentes viáveis coletadas semanalmente do sobrenadante de LTBMC de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	43
<i>Tabela 2:</i> Número de células aderentes viáveis coletadas após 9 semanas de incubação de LTBMC de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV.....	44

Resumo

RESUMO

A *Chlorella vulgaris* (CV) é uma alga microscópica bastante rica em nutrientes. Além de alto valor nutritivo, a *Chlorella* tem demonstrado possuir importantes atividades terapêuticas. Vários trabalhos do nosso laboratório e outros demonstram os efeitos protetores desta alga contra infecções virais e bacterianas, tumores, entre outros. No presente trabalho avaliamos os efeitos do tratamento profilático/terapêutico com a dose de 50mg/Kg/dia de CV sobre a resposta imunohematopoética de animais normais e portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

O estudo dos mecanismos envolvidos na proteção produzida pela alga frente às alterações induzidas pelo TAE no sistema imuno-hematopoético, demonstrou aumentos significativos na atividade de células NK, na produção de citocinas com padrão Th₁ (IL-2 e INF- γ) e na liberação de TNF- α por células esplênicas, paralelamente a uma diminuição na produção de IL-10 (padrão Th₂). Além disso, o tratamento com CV protegeu o hospedeiro da mielossupressão provocada pelo desenvolvimento tumoral, seja agindo diretamente na formação e manutenção do estroma medular, estimulando a atividade das células estromais, ou ainda estimulando a produção de citocinas reguladoras da hematopoese como a IL-6 e a IL-1 α . Constatamos ainda que o tratamento com CV aumenta a atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro de animais portadores de tumor e a capacidade proliferativa de células esplênicas. Outros resultados que merecem destaque são aqueles relacionados à ativação macrofágica. Nossos resultados demonstram que, em animais normais, o tratamento com CV promove aumento significativo nos níveis de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais e esplênicos sem alterar a produção de IFN- γ e IL-10. Além disso, o restabelecimento da produção normal de TNF- α , IFN- γ e IL-10 por macrófagos peritoneais de animais portadores de TAE e reversão parcial dos efeitos produzidos pela presença do tumor na atividade dos macrófagos esplênicos, também foram observados. Outro efeito do CV sobre macrófagos peritoneais de animais portadores de TAE foi o estímulo da produção de H₂O₂ e NO₂⁻.

Analizando nossos resultados podemos dizer que a CV além de possuir alto valor nutritivo, capacidade antioxidante e atividade anti-viral e antibacteriana, apresenta importante atividade imunomoduladora frente ao desenvolvimento tumoral, já que na presença do tumor o hospedeiro que vem recebendo *Chlorella* é capaz de reagir mais prontamente e com maior vigor na indução de mecanismos essenciais de defesa imunológica. Neste sentido, sugerimos que a alga *Chlorella vulgaris* pode ser um candidato a agente preventivo e complementar no tratamento do câncer.

Abstract

ABSTRACT

Chlorella vulgaris (CV) is a microscopic alga rich in nutrients. Besides the high nutritive value, this alga has shown important therapeutic properties. Many studies from our laboratory and others have shown the protective effects of CV against viral and bacterial infections, tumors, among others. In this work we evaluated the effects of the prophylactic/therapeutic treatment with a dose of 50 mg/Kg/day in normal and Ehrlich ascites tumor (EAT)-bearing mice.

The study of the mechanisms involved in the protection produced by the CV against the EAT, induced alterations in the immune-hematopoietic system; demonstrating significant improvements in the NK cells activity, Th₁ (IL-2 and INF- γ) and TNF- α cytokines production by mononuclear spleen cells, concomitantly with the decrease of IL-10 (Th₂) production. Moreover, treatment with CV protected the host of myelosuppression caused by tumor development, it is acting directly in the formation and maintenance of bone marrow stroma, by stimulating the activity of stromal cells, or stimulating the production of important hematopoiesis regulatory cytokines like IL-6 and IL-1 α . We are also certain that the treatment with CV increases the colony-stimulating activity (CSA) in the serum of tumor bearing mice and the proliferative capacity of spleen cells. Other results that deserve attention are those related to macrophage activation. Our results show that in normal mice, treatment with CV, promotes significant increase in the TNF- α levels in supernatants of the cultures of peritoneal and spleen macrophages without altering the production of IFN- γ and IL-10. Moreover, restoration of the normal production of TNF- α , IFN- γ and IL-10 by peritoneal macrophages from animal carriers of EAT and partial reversal of the effects produced by the presence of tumor in the splenic macrophages activity were also observed. Another effect of CV on peritoneal macrophages of tumor bearing mice was the stimulation in the production of NO₂⁻ and H₂O₂.

Looking at our results we can say that the alga *Chlorella vulgaris* in addition to its high nutritional value, antioxidant capacity and antiviral and antibacterial activities, it also presents important immunomodulatory activity against tumor development, since that in the presence of the tumor, the host that has received *Chlorella* is able to react more promptly and with greater force in the induction of essential mechanisms of immune defense. Accordingly, we suggest that the alga *Chlorella vulgaris* can be a candidate for the preventive and complementary treatment of cancer by strengthening the immune system.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alga *Chlorella vulgaris* (CV)

A utilização de terapias complementares por pacientes com câncer é cada vez mais comum. Tais terapias consistem em um vasto e diversificado conjunto de diagnóstico e modalidades terapêuticas que são usados pelos pacientes com a intenção de curar, reduzir os sintomas do câncer, minimizar efeitos colaterais dos tratamentos convencionais e promover suporte emocional e psicológico. Cada vez mais, terapias complementares são utilizadas com base na crença de que elas podem prevenir a ocorrência do câncer, sendo que os mecanismos de ação propostos incluem efeitos diretos contra o câncer, fortalecimento do sistema imunológico, eliminação de toxinas e melhora dos mecanismos de auto-defesa do organismo (Verhoef et al. 1999; Ernest and Cassileth 1999). Nos últimos anos têm crescido muito o mercado e o interesse por terapias alternativas que utilizam produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas. Aproximadamente 25% das drogas prescritas mundialmente são de origem vegetal e 121 princípios ativos de tais plantas são de uso corrente. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais para a Organização Mundial da Saúde, 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo de drogas sintéticas é obtido de precursores naturais (Rates et al. 2001). Estima-se que 60% das drogas antitumorais e antiinflamatórias, já no mercado ou em triagem clínica, são de origem natural (Shu et al. 1998).

A *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*, descrita por M.W. Beijernick, 1890) é uma alga verde unicelular da família Oocystaceae, bastante rica em nutrientes (Figura 1). Em sua composição básica apresenta 44% de proteínas, 40% de carboidratos e 16% de aminoácidos (Tanaka et al. 1986). Quanto às vitaminas, a *Chlorella* contém grande quantidade de beta caroteno, vitaminas C, E, K, B₁, B₂, B₆, B₁₂, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina, inositol, ácido para-aminobenzóico (PABA). Na sua composição mineral encontramos quantidades consideráveis de cálcio, magnésio, zinco, cobre, manganês, ferro, enxofre, iodo, fósforo, potássio, cobalto, selênio, entre outros (Baianova e Trubachev 1981).

Além de alto valor nutritivo, a *Chlorella* tem demonstrado possuir importantes atividades terapêuticas. Vários trabalhos demonstram os efeitos protetores desta alga contra infecções virais (Ibusuki & Minamishima 1990) e bacterianas (Souza-Queiroz et al. 2004, 2008, Dantas & Queiroz 1999), tumores (Hasegawa et al. 2002, Noda et al. 2002, Wu et al. 2005, Cha et al. 2008) e úlcera péptica (Tanaka et al. 1997). Também são atribuídos à *Chlorella* propriedades anti-estresse (Souza-

Queiroz et al. 2004, 2008), antioxidante (Miranda et al. 2001, Vijayavel et al. 2007) e grande potencial restaurador da resposta imunológica em animais neutropênicos (Hasegawa et al. 1990, Konishi et al. 1990).

Um importante aspecto demonstrado pelo nosso grupo é o importante efeito da alga na restauração da mielossupressão, avaliada através da metodologia para estudo *in vitro* do crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos da medula óssea comprometidos com a formação de granulócitos e macrófagos (CFU-GM). A inibição desses progenitores hematopoéticos representa um efeito agudo decorrente do rápido crescimento de certos tumores, sendo também observada em condições menos invasivas (Dantas & Queiroz 1999, Souza-Queiroz et al. 2004, Queiroz et al. 2003). A reversão da mielossupressão é uma constante que vem sendo observada paralelamente ao aumento no tempo ou na taxa de sobrevida, com extratos de plantas ou outros produtos naturais, os quais apresentam diferentes propriedades biológicas, incluindo atividades antibacteriana e antitumoral, como é o caso da alga *Chlorella vulgaris* (Dantas & Queiroz 1999, Dantas et al. 1999).

Estudos demonstram que a *Chlorella* aumenta não apenas a quantidade, mas também a atividade funcional de fagócitos, principalmente os neutrófilos, em camundongos neutropênicos pela exposição a quimioterápicos (Konishi et al. 1990, 1996). Portanto, um mecanismo plausível para o aumento da taxa ou duração da sobrevida produzida pela ingestão da alga em animais portadores de infecção ou tumor pode ser o maior acúmulo de granulócitos e macrófagos no local de crescimento do agente agressor, em decorrência da maior geração de fagócitos pelos órgãos hematopoéticos, e possivelmente pela ativação funcional destas células.

Hasegawa et al (1990) observaram, após a administração oral de *Chlorella*, aumento na expressão gênica de citocinas ativas no sistema hematopoético, como a interleucina-12 (IL-12), interleucina-1 α (IL-1 α), INF- γ , fator estimulador do crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Não se conhece ao certo o mecanismo pelo qual as citocinas agem, sozinhas ou de forma sinérgica, para desencadear o tráfego de fagócitos da medula óssea. É bem aceito o fato de que tanto GM-CSF quanto IL-12 e IL-1 α constituem fatores chaves na promoção da mielopoese e no recrutamento de fagócitos para a periferia (Metcalf 1985, Wang et al. 1987). Mobilização diferencial de células progenitoras hematopoéticas da medula óssea, onde as células progenitoras mais maduras (CFU-GM) são as primeiras a migrar para a periferia, foi demonstrada em presença de IL-12.

Estudos com o modelo de infecção por *L. monocytogenes* demonstraram que a administração oral de *Chlorella* ativa a resposta imunológica inata do hospedeiro, estimulando preferencialmente os linfócitos Th₁, através do aumento na produção de IL-2 e INF- γ (Queiroz et al. 2002). Os interferons consistem numa grande família de proteínas endógenas secretoras, que não apenas partilham atividade antiviral, mas também têm a capacidade de modular a resposta imunológica, principalmente através da estimulação de macrófagos e mobilização de células NK, e de inibir a proliferação e promover a diferenciação de células no organismo. A ação do interferon endógeno é local e sua liberação se dá em pequenas concentrações. O uso terapêutico de interferon recombinante em pacientes com infecções virais ou portadores de doenças malignas sistêmicas é prejudicado pela difícil escolha da melhor via de administração e do regime de tratamento mais adequado. Por estas razões, a administração de INF- γ recombinante em pacientes é acompanhada de ampla gama de efeitos adversos. Neste sentido, a capacidade da *Chlorella* de induzir uma resposta farmacológica apropriada através do estímulo da produção endógena de INF- γ , entre outras citocinas, é uma ferramenta útil que visa, principalmente, aumentar ou restabelecer os mecanismos de defesa próprios do organismo para agir contra agentes nocivos. Estudos realizados em camundongos C57BL/6 knockout para o gene de INF- γ confirmaram a importância desta interleucina na proteção de animais infectados com *Listeria monocytogenes*. Os resultados mostraram que, enquanto 100% dos animais controle, íntegros para o gene de INF- γ sobrevivem à infecção, animais knockout são rapidamente eliminados. Da mesma forma, observamos ausência de proteção nos animais knockout para INF- γ infectados e tratados com *Chlorella*, corroborando dados da literatura sobre a importância desta citocina na proteção conferida pela alga (Queiroz et al. 2003).

A inibição do crescimento tumoral e o concomitante aumento da resistência contra o tumor têm sido observados após tratamento com CV em animais portadores de tumor Meth A (Tanaka et al. 1990). Carotenóides presentes no extrato etanólico da alga aumentam a apoptose e inibem o crescimento de linhagem celular de câncer de cólon humano - HCT-116 (Cha et al. 2008), já o extrato fenólico diminui a proliferação de linhagem celular de hepatoma humano - HepG2/C3A (Wu et al, 2005). Glicoproteínas isoladas da *C. vulgaris* não possuem apenas atividade antimetastática (Tanaka et al. 1998), mas também protegem o hospedeiro contra mielossupressão induzida por 5-fluorouracil (Konishi et al, 1996) e inibem a progressão tumoral (Morimoto et al. 1995). Neste sentido, em pacientes com glioma maligno submetidos a quimioterapia, a administração da alga produziu uma

significante recuperação de componentes celulares e funções do sistema imune, reduzindo a reincidência do glioma depois de 2 anos de estudo (Merchant et al. 1990).

Apesar dos importantes efeitos demonstrados pela *Chlorella* como agente quelante, antioxidante, antiviral e antibacteriano, os mecanismos imunológicos responsáveis pela atividade protetora frente a neoplasias ainda não estão bem esclarecidos na literatura.

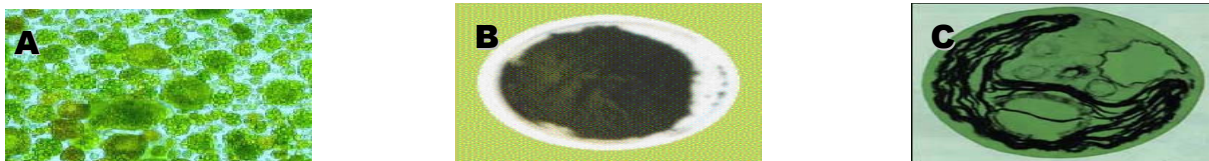


Figura 1: A) Alga *Chlorella vulgaris* in natura; B) Pó da alga; C) Célula da alga.

1.2. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

Desde sua descrição como um adenocarcinoma mamário murino em 1905, o TAE (Figura 2) tem sido amplamente utilizado em estudos fisiopatológicos associados aos efeitos sistêmicos da evolução temporal do tumor, devido ao seu rápido crescimento e comportamento agressivo (Sakai et al. 2006). O TAE oferece inúmeras vantagens como modelo tumoral experimental para a avaliação das atividades e mecanismos antitumorais de diferentes compostos. Tais vantagens incluem, basicamente, 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 espécie de camundongos, podendo induzir tumores sólidos ou ascíticos que levam o hospedeiro à morte, mesmo quando administradas em doses extremamente baixas.

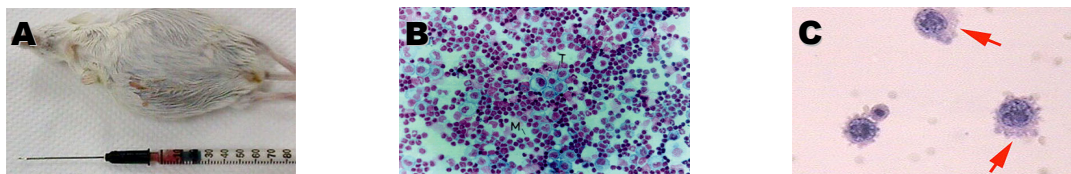


Figura 2: A) Camundongo portador de TAE; B) Esfregaço do líquido ascítico de camundongo portador de TAE corado com Giemsa. Células mononucleares (M) e células tumorais (T); C) Células de TAE coradas com PAS.

Como muitos outros tumores experimentais, o tumor de Ehrlich produz alterações severas no sistema hematopoético do hospedeiro (Pessina et al. 1982a, b, Morales et al, 1999). 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 (1982b), verificaram que o pré-tratamento in vivo de células de medula óssea normal com fluido ascítico de Ehrlich produz redução severa no número de colônias de células hematopoéticas, formadas a partir de células precursoras da medula óssea e de células pluripotentes, sendo que o compartimento granulocítico-macrofágico foi mais sensível aos efeitos provocados pelo crescimento tumoral. 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 consequência 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 migração 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.

A polarização da resposta Th₁ para Th₂ que ocorre no TAE suprime a resposta imunológica celular, através da liberação de citocinas supressoras, como a IL-10, que reduzem a produção, migração e ativação de macrófagos, neutrófilos, células NK e linfócitos T, exacerbando a resposta inflamatória e levando o animal à morte (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 com o emprego do TAE no estudo da atividade antitumoral e imunoreguladora de diversos compostos (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 avaliados consiste na reversão da mielossupressão e do aumento na hematopoese esplênica induzidos pelo tumor (Valadares et al. 2006b, Queiroz et al. 2008). Tais resultados, juntamente com trabalhos da literatura corroboraram para o emprego do tumor de Ehrlich como modelo tumoral experimental e também sua utilização em estudos da atividade imunomoduladora de diferentes compostos.

Neste sentido, no presente estudo avaliamos os efeitos do tratamento profilático/terapêutico com a alga *Chlorella vulgaris* sobre a resposta imunoematopoética de animais normais e portadores de tumor ascítico de Ehrlich.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Diante do exposto e observando a escassez de trabalhos que avaliam a atividade desta alga frente a tumores, nosso trabalho teve como objetivo estudar a atividade imunomoduladora da alga *Chlorella vulgaris* em camundongos portadores de TAE. Para tanto, avaliamos a ação da *Chlorella vulgaris* (CV):

- ◆ na sobrevida de animais portadores de TAE;
- ◆ na manutenção da hematopoese pelo microambiente medular por meio de cultura de longa duração da medula óssea (Long Term Bone Marrow Culture - LTBM), assim como a produção das citocinas IL-6 e IL-1 α no sobrenadante da cultura;
- ◆ na atividade estimuladora de colônias (Colony stimulating activity – CSA) de células hematopoéticas no soro dos animais;
- ◆ na atividade de células NK;
- ◆ na capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas, bem como a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10 por estas células;
- ◆ na atividade de macrófagos através da determinação dos níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-10, peróxido de hidrogênio e nitrito.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Alga *Chlorella vulgaris* (CV)

A alga *Chlorella vulgaris* seca, foi gentilmente cedida pelo Dr. Hasegawa (Research Laboratories, *Chlorella* Industry Co. Ltd., Fukuoka, Japan). Análises químicas realizadas por Tanaka et al. (1986) revelaram que CV contém 44.4g de proteína, 39.5g de carboidrato e 15.4g de ácido nucléico em cada 100g (peso seco) do material total. Não foram detectados lipídeos. Para o tratamento dos animais, 50 mg/Kg de CV foi ressuspenso em água destilada à 40°C e administrado por via oral, durante 10 dias antes da inoculação do tumor e até a data de sacrifício dos animais (3º, 8º ou 13º dias após a inoculação do tumor).

3.2. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos BALB/c com idade aproximada de 6 a 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, forradas com maravalha estéril e tampadas com grades inoxidadas, em sala climatizada com temperatura constante de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclos de claro-escuro de 12 h. Ração e água estéreis foram fornecidas aos animais *ad libitum*. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com os protocolos da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) – IB – UNICAMP (Certificado de Aprovação do Projeto de Pesquisa - protocolo nº 662-1).

3.3. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

A linhagem tumoral de Ehrlich é mantida nas dependências do 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 (ip) com 0,2 mL de uma suspensão de células tumorais contendo 3×10^7 células/mL (6×10^6 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 Profilático/Terapêutica e Terapêutica da alga *Chlorella vulgaris* 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 e 3 a) animais portadores de TAE, tratados com CV 25 mg/Kg;
- 2 e 3 b) animais portadores de TAE, tratados com CV 50 mg/Kg;
- 2 e 3 c) animais portadores de TAE, tratados com CV 100 mg/Kg;
- 2 e 3 d) animais portadores de TAE, tratados com CV 500 mg/Kg.

Todos os animais foram inoculados intraperitonealmente com 0,2 ml de uma suspensão de células tumorais contendo 3×10^7 células/ml (6×10^6 células/animal). A administração de CV foi realizada por gavagem nas doses de 25, 50, 100 e 500 mg/Kg, utilizando-se água destilada estéril como veículo de administração, por período de dez dias consecutivos prévios à administração das células tumorais e oito dias consecutivos após a inoculação destas células (Tratamento Profilático/Terapêutico – grupo 2) e por período de oito dias consecutivos após a inoculação das células tumorais (Tratamento Terapêutico – grupo 3). Os animais controle receberam somente o veículo acima mencionado, durante os dias de tratamento. Observamos os animais por um período de 30 dias.

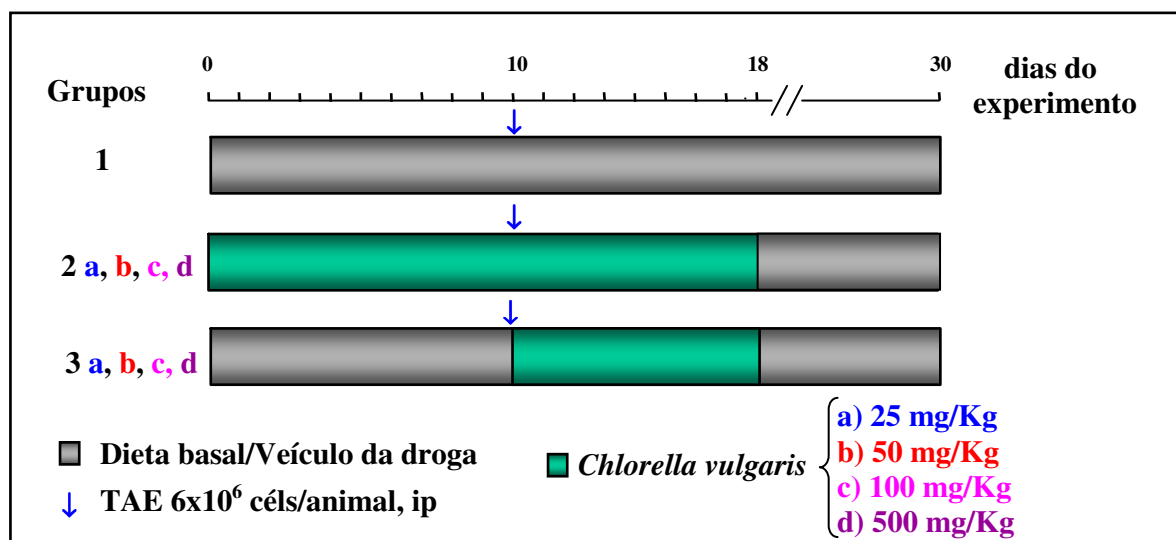


Figura 3: Protocolo experimental para avaliação do efeito dos tratamentos Terapêutico e Profilático/Terapêutico de diferentes doses da alga *Chlorella vulgaris* (25, 50, 100 e 500 mg/Kg) na sobrevida de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich.

3.5. Tratamento dos animais

Com a finalidade de avaliar os efeitos da administração Profilático/Terapêutica da alga *Chlorella vulgaris* na manutenção da hematopoese pelo microambiente medular, atividade estimuladora de colônias de células hematopoéticas no soro, atividade de células NK, capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas, bem como a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10 por estas células e atividade de macrófagos através da determinação dos níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-10, peróxido de hidrogênio 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 extrato de CV (**CV+TAE**);
- 4) animais tratados com CV, não portadores de TAE (**CV**).

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

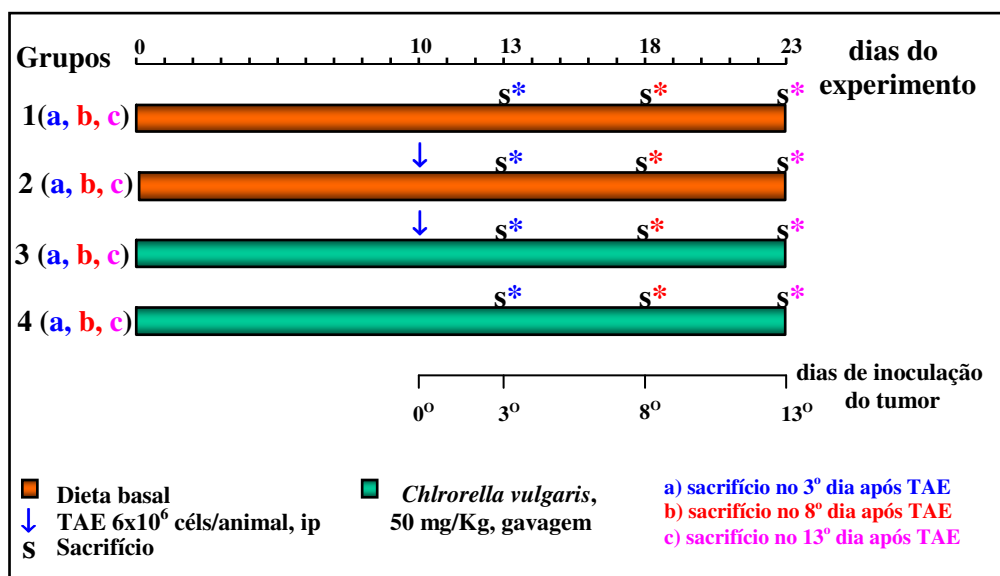


Figura 4: Protocolo experimental para avaliação da atividade imunomoduladora da dose de 50 mg/Kg de CV na manutenção da hematopoese pelo microambiente medular, atividade estimuladora de colônias de células hematopoéticas no soro, atividade de células NK, capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas, bem como a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10 por estas células e atividade de macrófagos através da determinação dos níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-10, H₂O₂ e NO₂⁻ em modelo experimental *in vivo* de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich.

3.6. Cultura de longa duração da medula óssea (LTBMC)

Com o objetivo de avaliar os efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre o estroma medular e sobre a diferenciação de progenitores para granulócitos e macrófagos gerados em sistema de LTBMC, os fêmures dos animais submetidos aos referidos tratamentos (rever item 3.5.) foram coletados assepticamente e as células hematopoéticas e estromais (aproximadamente 10^7 células/mL) foram removidas e transferidas com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) completo suplementado com 20 % de soro Equino (Sigma) e 1% de uma solução de hidrocortisona (10^{-4} M). Esta suspensão de células foi transferida para garrafas de cultura T25 (10 mL/garrafa, n=6), e estas foram mantidas por 4 semanas a 37 °C na presença de 5% de CO₂. Uma vez por semana estas células foram alimentadas através da remoção de 50% do meio saturado e adição do mesmo volume de meio RPMI completo e suplementado. Semanalmente foi realizada a contagem em câmara hemocitométrica das células não aderentes presentes no sobrenadante das culturas.

Após a quarta semana (tempo necessário para confluência das células do estroma), ao fazer a troca do meio as culturas foram repovoadas com células de medula óssea (aproximadamente 10^7 células/mL) de animais dos respectivos grupos (rever item 3.5). Este repovoamento celular é necessário para que as células hematopoéticas mais imaturas possam agora se alojar na capa de células aderentes e iniciar a hematopoese *in vitro*.

A partir da quinta semana iniciaram-se os ensaios de CFU-GM. A cada sete dias, foram coletados 5 mL do meio de cultura de cada garrafa e centrifugado por 10 min a 1200 rpm. O sobrenadante foi separado e congelado a -20°C para posterior dosagem das citocinas IL-6 e IL-1 α conforme o protocolo de quantificação de citocinas (item 3.12). O “pellet” foi ressuspense em 1 mL de meio RPMI, contado em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em azul-tripán 0,2 %. Preparamos o meio mais ágar que consiste de: 30% de meio DMEM 2X concentrado; 20% de soro bovino fetal e 50% de ágar. A seguir, adicionamos o volume apropriado de células (1×10^5 células/mL) quando o meio mais ágar estava a 37°C. Ressuspendemos as células e distribuímos volumes de 2,0 mL em cada placa de Petri (35 mm), as quais já continham 100 μ L de recombinante GM-CSF (0,5 ng/mL) (Sigma, Cód. G0282). Distribuímos o conteúdo por toda a superfície da placa de Petri e deixamos geleificar. Incubamos por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ e a seguir contamos o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40X. Para o estudo

morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/Leishman.

Adicionalmente, no final do experimento (9ª semana) as células aderentes das culturas foram tripsinizadas (tripsina a 0,25%) e quantificadas em câmara hemocitométrica.

As garrafas foram fotografadas na quarta e na nona semanas da cultura.

3.7. 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 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.

3.7.1. Cultura clonal de precursores hematopoéticos

Após sacrificarmos o animal por deslocamento cervical, limpamos a pele com álcool iodado ou 70%. Após a exposição do fêmur, removemos a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortamos o osso na junção superior. A medula óssea foi transferida com auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI-1640. 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 %. Preparamos o meio mais ágar que consiste de: 30% de meio DMEM 2X concentrado; 20% de soro bovino fetal e 50% de ágar. A seguir, adicionamos o volume apropriado de células da medula (1×10^5 células/ml) quando o meio mais ágar estava a 37°C. Ressuspendemos as células e distribuimos volumes de 2,0 ml em cada placa de Petri, as quais já continham 100 µL do soro dos animais tratados. Distribuimos o conteúdo por toda a superfície da placa de Petri e deixamos geleificar. Concomitantemente, foram incubadas células de animal normal com 100 µL de recombinante GM-CSF (0,5 ng/mL) (Sigma, Cód. G0282) para controle da reação. 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.

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

3.8.1. 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.

Em relação ao ensaio de citotoxicidade, 5×10^6 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 Na₂ ⁵¹CrO₄ por um período de 90 minutos a 37°C sob agitação periódica. Novamente, lavou-se e ressuspendeu-se as células em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF e ajustou-se a concentração celular para 1×10^5 células/mL.

3.8.2. Células efetoras esplênicas

Três, oito e treze dias após a inoculação do TAE, baços de camundongos submetidos aos referidos tratamentos (rever item 3.5), foram coletados assepticamente e homogeneizados utilizando-se meio RPMI-1640. 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 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 5×10^6 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.

3.8.3. Ensaio de liberação de ^{51}Cr

Em microplacas de cultura (Corning – 96 wells) foram adicionados 100µL da suspensão de células efetoras, em triplicata e com reserva de três orifícios 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 ^{51}Cr foram distribuídos nos pocinhos 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% CO_2 . 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 e os resultados expressos em porcentagem de lise específica.

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

3.9. Preparação de células mononucleares esplênicas

Baços de camundongos submetidos aos referidos tratamentos (rever 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 (NH_4Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após 3 lavagens com meio RPMI, as células foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Cultilab) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina (100 µg), Hepes 25 mM, 2-mercaptoetanol (1:100) e glutamina (216 mg/mL).

Com a finalidade de avaliar a capacidade proliferativa das células mononucleares esplênicas, em cada well da placa de microcultura (Corning – 96 wells) foram adicionados 200 µL da suspensão celular em presença de solução de Concanavalina 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 CO_2 . Após este período, a solução de MTT (Sigma) foi adicionada e a placa de cultura incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionou-se etanol (Merck) para a solubilização dos cristais de *formazam* precipitados e efetuou-se a leitura em ELISA a 570 nm.

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

3.10. Preparação de macrófagos esplênicos

Para tal, baços de camundongos submetidos aos referidos tratamentos (rever item 3.5), foram coletados assepticamente, macerados e homogeneizados em meio RPMI-1640 (Cultilab). Células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise ao botão celular previamente concentrado. Após lavagem em tampão [PBS 0,1 M + 2% de soro fetal bovino (HyClone) +0,1% Azida Sódica (Merck)], ajustamos a concentração celular para 1 x 10⁶ células/mL. A população de macrófagos nas diferentes amostras, foi quantificadas através de Citometria de Fluxo utilizando-se o anticorpo específico FITC anti-mouse Mac-3 - 100 μ g (eBioscience – cod. 11-5989-82), e seguindo o protocolo indicado pelo respectivo fabricante. As amostras foram lidas em Citômetro de Fluxo FACScalibur (Becton DickinsonTM, San José, CA).

Em cada well de placa de cultura de 24 wells (Corning), adicionamos 800 μ L de meio RPMI enriquecido com 5% de SBF e em seguida, 200 μ L de suspensão celular (1x10⁵ macrófagos/well). 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 enriquecido com 5% de SBF em cada well e, em seguida, solução de LPS (1 μ g/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 CO₂. Após 24h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada orifício e congelado a -20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de citocina conforme item 3.12.

3.11. Preparação de macrófagos peritoneais

Para tal, os macrófagos foram assepticamente coletados dos camundongos submetidos aos referidos tratamentos (rever item 3.5.), através de lavagem peritoneal com 10mL de meio RPMI-1640 (Cultilab) 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 Trypan blue (0,2%), em câmara de hemocitométrica, considerando adequado no mínimo 95% de viabilidade. Os macrófagos foram identificados morfológicamente, já que eles são menores que as células do tumor de Ehrlich.

3.11.1. Obtenção de sobrenadante de cultura para dosagem de citocinas

Os macrófagos foram transferidos (1×10^5 macrófagos/well) 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 enriquecido com 5% de SBF em cada well e, em seguida, solução de LPS (1µg/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 CO₂. Após 24h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada orifício e congelado a -20°C para posteriormente ser submetido ao protocolo de quantificação de citocina conforme item 3.12.

3.11.2. Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Os macrófagos foram transferidos (1×10^5 macrófagos/well) para micro placas de cultura (Corning – 96 wells)). 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. Segundo o método descrito por Pick & Keisare (1980) e modificada por Russo *et al* (1989) alíquotas de 100 µL de solução tampão de vermelho fenol com peroxidase foram transferidas para cada well das microplacas de cultura, em seguida, solução de PMA (2µg/mL) (Sigma). Simultaneamente, incubamos células de cada amostra sem PMA para controle. As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂ por uma hora. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 10 µL de NaOH 1N. A absorbância foi determinada em microleitor de ELISA, com filtro de 620nm, contra um branco constituído de solução de vermelho fenol. Os resultados foram

expressos em nmols de H_2O_2 por 1×10^5 células, comparando-se a D.O. com uma curva padrão em concentrações conhecidas de H_2O_2 .

3.11.3. Produção de nitrito (NO_2^-)

Os macrófagos foram transferidos (1×10^5 macrófagos/well) para micro placa de cultura (Corning – 96 wells). 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 (Cultilab) suplementado com 10% de SBF foram transferidos para cada well 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. Decorrido o tempo de incubação, segundo o método colorimétrico baseado na reação de Griess descrito por Green et al (1981), 100 μL dos sobrenadantes foram transferidos para micro placa de cultura (Corning – 96 wells) e 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^- .

3.12. Quantificação de citocinas

As citocinas foram quantificadas conforme descrito abaixo:

- Sobrenadante de LTBMCM $\rightarrow$ IL-1 α e IL-6;
- Sobrenadante de culturas de células mononucleares esplênicas $\rightarrow$ TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10;
- Sobrenadante de cultura de macrófagos peritôneais e esplênicos $\rightarrow$ TNF- α , IFN- γ , 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-6 (Cat. DY406), IL-1 α /IL-1F1 (Cat. DY400), TNF- α /TNFSF1A (Cat. DY410), IFN- γ (Cat. DY485), IL-2 (Cat. DY402) e IL-10 (Cat. DY417)].

A quantificação foi realizada em placa de microcultura para ELISA (“maxi sorp” 96 wells), seguindo a indicação do fabricante para utilização de cada Kit. A leitura foi realizada em leitor de ELISA ($\lambda = 450$ nm) e os resultados expressos em pg/mL.

3.13. 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 $P < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Análise da sobrevida

A eficácia dos tratamentos Terapêutico e Profilático/Terapêutico com CV em camundongos portadores de TAE está representada nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Como podemos observar na Figura 5, o tratamento apenas Terapêutico não foi eficiente na proteção dos animais contra os danos causados pelo tumor, isso, pois 100% dos animais morreram até o 20º dia após a inoculação das células tumorais, independentemente da dose de CV administrada.

Quanto ao tratamento Profilático/Terapêutico, todos os camundongos apenas portadores de TAE morreram até o 20º dia após a inoculação do tumor. Resultados semelhantes foram observados com os animais portadores de tumor tratados com a dose de 25 mg/Kg de CV. Por outro lado, o tratamento com as doses de 50, 100 e 500 mg/Kg de CV prolongou em cerca de 25% a sobrevida de animais portadores de TAE, comparado com os animais apenas portadores de TAE ($P<0,05$). Como nenhuma diferença significativa foi observada na eficácia destas três doses de CV, a dose de 50 mg/Kg (menor dose efetiva), foi escolhida para ser usada em nossos experimentos.

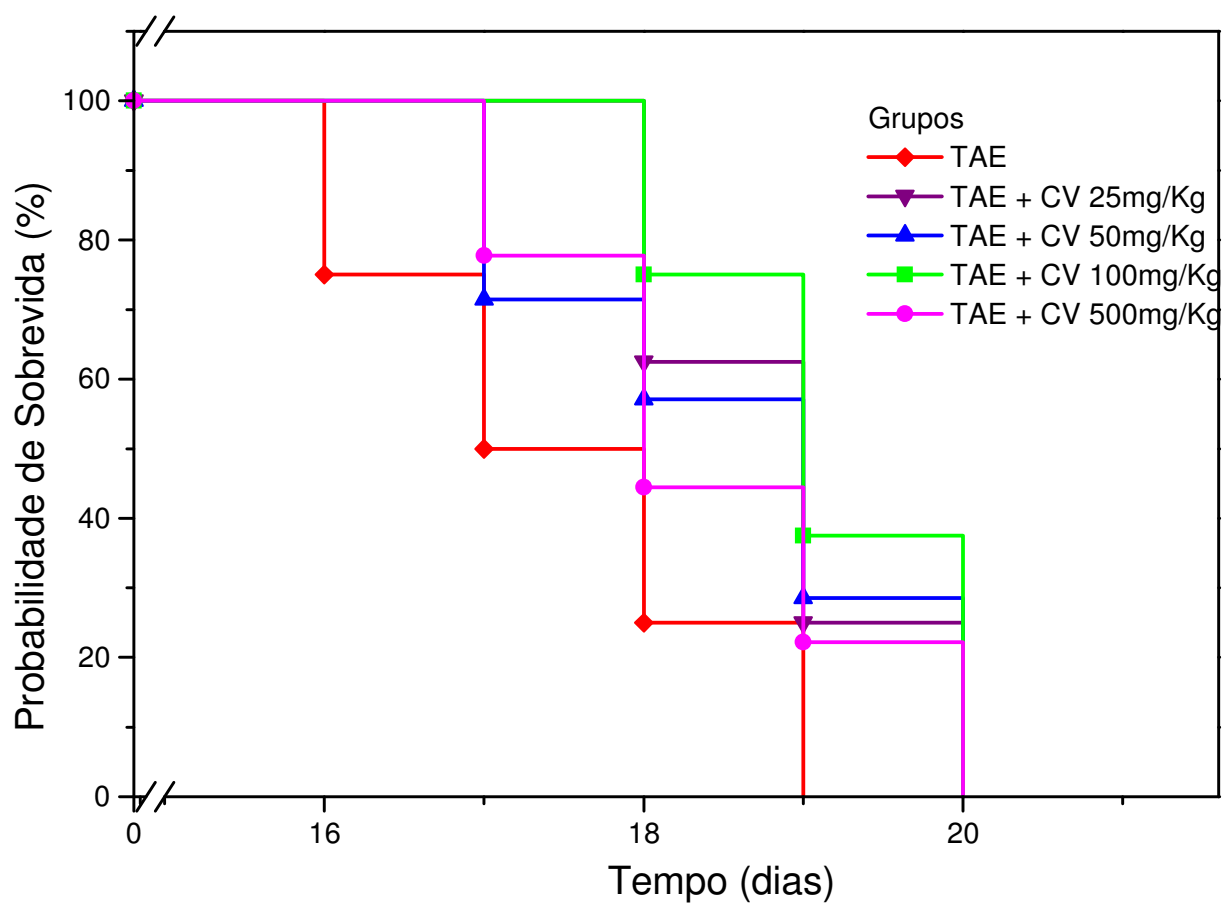


Figura 5: Efeito do tratamento Terapêutico com diferentes concentrações de CV (25, 50, 100 e 500 mg/Kg), na sobrevivência de camundongos BALB/c portadores de TAE. O tratamento foi iniciado no dia da inoculação i.p. das células do tumor (6×10^6 células/animal) e mantido até o 8º dia após a inoculação. Grupos de 10 animais foram observados diariamente para a avaliação da sobrevivência. Kaplan-Meier; Teste Long-Rank.

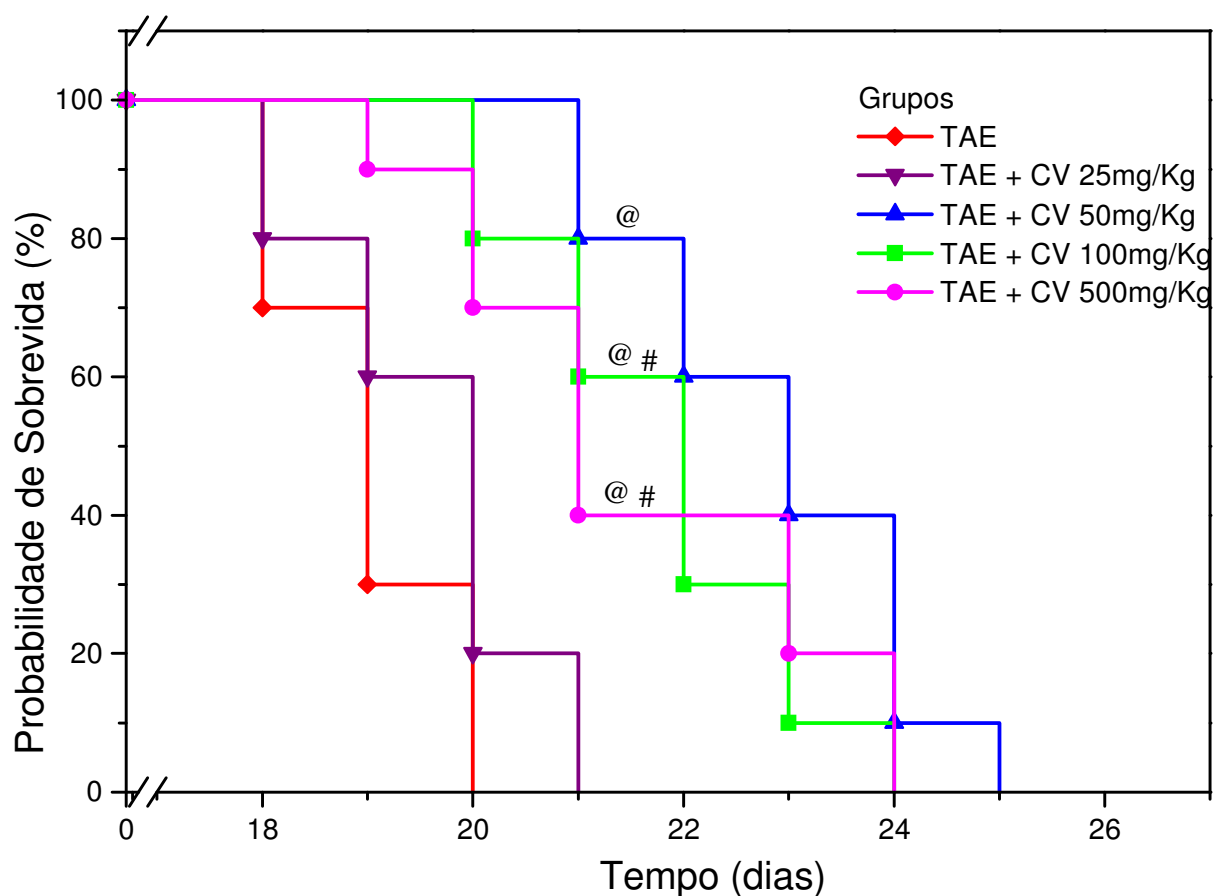


Figura 6: Efeito do tratamento Profilático/Terapêutico com diferentes concentrações de CV (25, 50, 100 e 500 mg/Kg), na sobrevivência de camundongos BALB/c portadores de TAE. O tratamento foi iniciado 10 dias antes da inoculação i.p. das células do tumor (6×10^6 células/animal) e mantido até o 8º dia após a inoculação. Grupos de 10 animais foram observados diariamente para a avaliação da sobrevivência. @ $P < 0,05$ comparado ao TAE; # $P > 0,05$ comparado à dose de 50 mg/Kg. Kaplan-Meier; Teste Long-Rank.

4.2. Cultura de longa duração da medula óssea (Long-Term Bone Marrow Culture - LT BMC)

4.2.1. Formação de estroma medular em LT BMC.

A Figura 7 demonstra o aspecto morfológico da LT BMC de cada grupo experimental na 4^a e 9^a semanas de cultura.

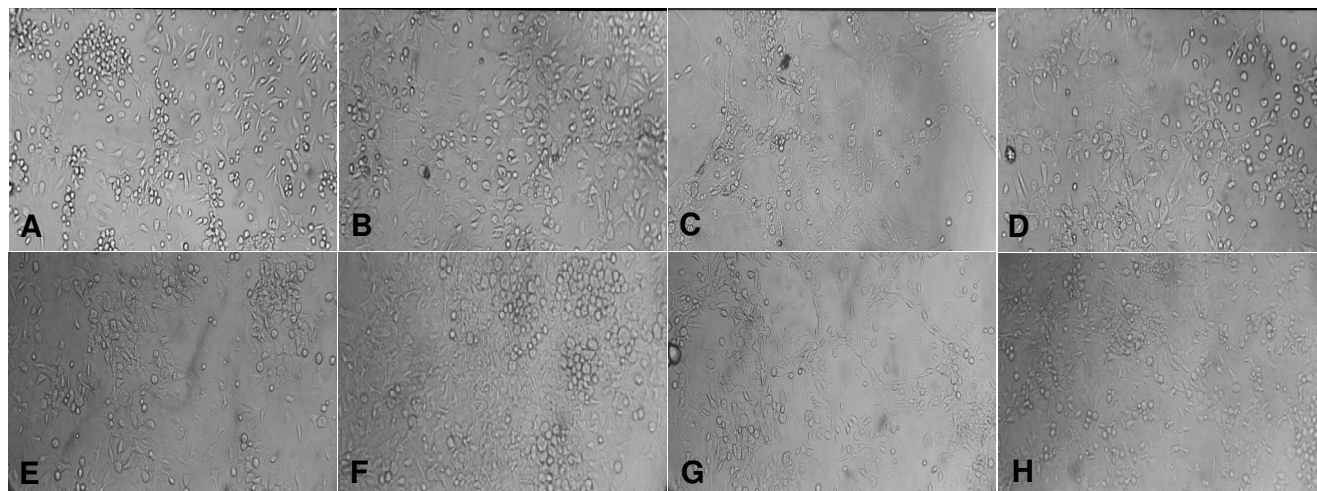


Figura 7: Aspecto microscópico da LT BMC de cada grupo experimental. A (grupo CTRL), B (grupo CV), C (grupo TAE) e D (grupo CV+TAE) na 4^a semana de cultura. E (grupo CTRL), F (grupo CV), G (grupo TAE) e H (grupo CV+TAE) na 9^a semana de cultura. Aumento de 20x.

4.2.2. Viabilidade de células não-aderentes

Os efeitos do tratamento com CV no número total de células não aderentes no sobrenadante de LTBMCM estão apresentados na Tabela 1. Desde a 1ª até a 4ª semana, um declínio progressivo no número de células no sobrenadante das culturas foi observado em todos os grupos. Como esperado, após a repopulação, na 5ª semana de cultura notamos o aumento deste número de células como consequência da repopulação. E novamente, após a 5ª e até a 9ª semana um declínio progressivo foi observado em todos os grupos. Contudo, no grupo de camundongos não tratados e portadores de TAE, uma redução de cerca de 30% foi observada nas 9 semanas de cultura quando comparado ao grupo controle ($P<0,05$). O tratamento com CV manteve estes números semelhantes aos do grupo controle. Estes resultados também estão ilustrados na Figura 7.

Tabela 1: Viabilidade de células não-aderentes (células viáveis $\times 10^5$ /mL) ^a

Semanas	CTRL	CV	CV+TAE (3º)	TAE (3º)	CV+TAE (8º)	TAE (8º)	CV+TAE (13º)	TAE (13º)
1	50±2	47±2,7	52±1,1 ⁺	45±2,3*	49±1,1 [#]	43±2,1*	50±1,1 ^{&}	40±1,1*
2	39±1,7	32±1,5	37±2,2 ⁺	29±1,9*	33±2,2 [#]	27±1,6*	36±1,9 ^{&}	27±1,1*
3	18±1,9	17±1,6	15±2,3 ⁺	11±1,1*	13±0,7 [#]	10±1*	14±1,1 ^{&}	8±1,7*
4	10±1,3	9±1,5	12±1,1 ⁺	7±0,7*	13±0,8 [#]	8±1,6*	12±1,5 ^{&}	7±0,8*
5	47±1,1	45±0,8	44±0,8 ⁺	41±1,5*	44±1,6 [#]	40±1,1*	45±0,8 ^{&}	39±1,1*
6	17±1,6	18±1,6	17±1,5 ⁺	10±0,8*	18±1,1 [#]	11±0,7*	19±1,2 ^{&}	12±1,5*
7	15±0,5	12±0,7	15±0,8 ⁺	8±1,2*	14±1,5 [#]	9±1,6*	16±1,4 ^{&}	9±1,1*
8	12±0,8	11±0,8	13±0,7 ⁺	8±1,1*	14±1,4 [#]	7±0,8*	15±0,7 ^{&}	8±0,8*
9	9±1,1	8±1,1	10±1,5 ⁺	6±0,8*	11±0,8 [#]	7±1,1*	12±2,3 ^{&}	6±1,1*

^aNúmero de células não aderentes viáveis coletadas semanalmente do sobrenadante de LTBMCM de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 5 frascos de cultura/grupo. ANOVA; Teste de Tukey. * $P<0,05$ comparado ao grupo CTRL; ⁺ $P<0,05$ comparado ao grupo TAE 3º; [#] $P<0,05$ comparado ao grupo TAE 8º; [&] $P<0,05$ comparado ao grupo TAE 13º.

4.2.3. Viabilidade de células aderentes

Conforme apresentado na Tabela 2, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o número de células aderentes dos diferentes grupos estudados. Isto sugere que o número reduzido de CFU-GM *in vitro* demonstrado abaixo (item 4.2.4), pode estar relacionado a alguma alteração na capacidade funcional das células do estroma de suportar o crescimento e diferenciação destes precursores hematopoéticos.

Tabela 2: Viabilidade de células aderentes (células viáveis x $10^5/\text{mL}$)^a

Frasco	C	CV	CV+TAE (3°)	TAE (3°)	CV+TAE (8°)	TAE (8°)	CV+TAE (13°)	TAE (13°)
1	2	5	4	3	3	2	4	3
2	4	3	4	3	4	3	2	2
3	5	4	2	2	4	3	3	3
4	2	3	3	2	2	2	3	3
5	4	3	3	1	3	3	4	2
Média	3,4	3,6	3,2	2,2	3,2	2,6	3,2	2,6
DP	1,342	0,894	0,837	0,837	0,837	0,548	0,837	0,548

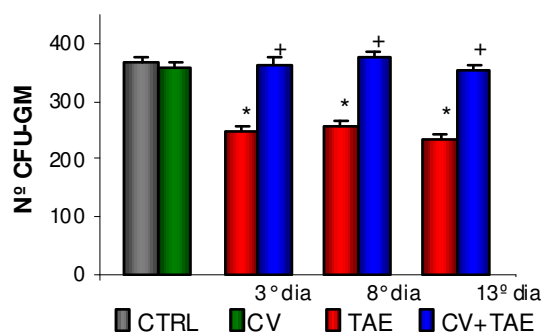
^aNúmero de células aderentes viáveis coletadas após 9 semanas de incubação de LTBM de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3°, 8° e 13° após TAE). Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 5 frascos de cultura/grupo. ANOVA; Teste de Tukey.

4.2.4. Número total de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na suspensão de células não-aderentes da LT BMC

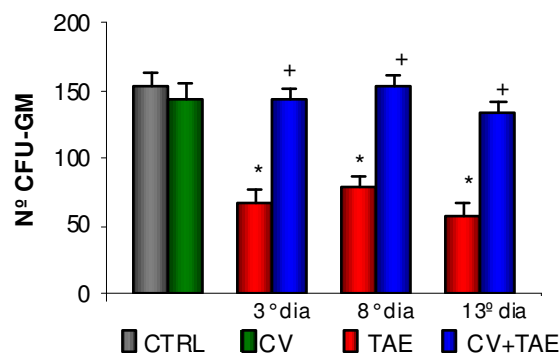
O número de CFU-GM no sobrenadante de LT BMC de camundongos normais e portadores de TAE tratados com CV foi avaliado semanalmente desde a 5ª até a 9ª semana de incubação. Na 5ª semana um pico no número de CFU-GM foi produzido como consequência da repopulação. O tratamento com CV não alterou a produção de progenitores comprometidos com as linhagens granulocítica e macrofágica nos animais normais. Por outro lado, na LT BMC de camundongos apenas portadores de TAE, a característica fundamental observada foi o dano à capacidade de suportar o crescimento e diferenciação destes progenitores em todos os intervalos avaliados após a inoculação do tumor (3, 8 e 13 dias), chegando o número de CFU-GM a ser 4 vezes menor que o do grupo controle ($P<0,001$), (Figura 8). Entretanto, quando estes animais foram tratados com 50 mg/Kg de CV os números de CFU-GM foram mantidos nos mesmos níveis do grupo controle em todos os intervalos estudados.

Desde a 5ª semana de incubação até a 9ª semana observamos um declínio progressivo no número de células viáveis no sobrenadante das culturas, assim como no número de progenitores de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), obtidos da suspensão de células não aderentes das LT BMCs, corroborando resultados da literatura (Spoocher et al. 1993).

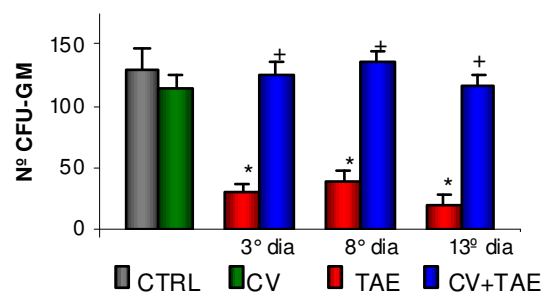
A) 5ª Semana



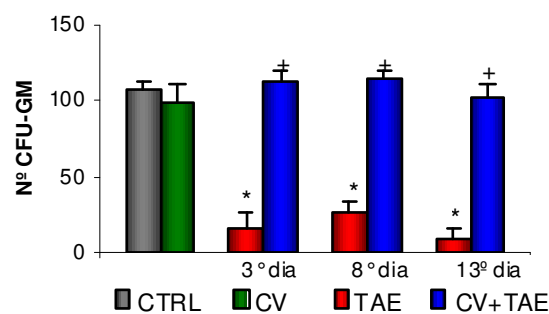
B) 6ª Semana



C) 7ª semana



D) 8ª Semana



E) 9ª Semana

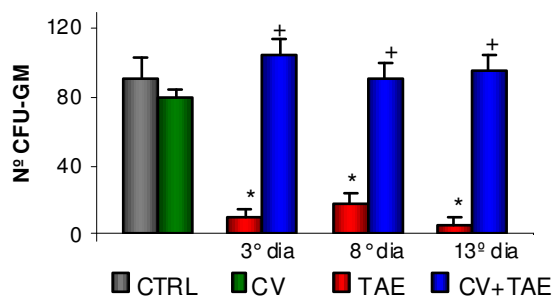


Figura 8: Número total de progenitores CFU-GM na suspensão de células não-aderentes de LTBM de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). Os valores representam a média $\pm$ D.P. da triplicata e representam o número de precursores no “pool” de células da suspensão coletada de 5 frascos de cultura. * $P < 0,001$ comparado ao controle; $^+P < 0,001$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.2.5. Produção de citocinas no sobrenadante de LT BMC

4.2.5.1. Produção de IL-6

Os níveis de IL-6 nos sobrenadantes das LT BMCs coletados semanalmente a partir da 4ª semana de incubação estão representados na Figura 9.

Em todas as semanas de incubação podemos observar que o tratamento de animais normais com CV produziu um aumento significativo de aproximadamente 15% nos níveis de IL-6 no sobrenadante das culturas, quando comparado aos animais controle ($P < 0,05$). Neste sentido, o tratamento de animais portadores de TAE com CV, evitou que ocorresse uma redução de cerca de 25% nos níveis desta citocina, como observado nos animais apenas portadores de TAE ($P < 0,05$ em relação ao controle), mantendo seus níveis semelhantes aos do controle.

Na quinta semana de incubação (uma semana após a repopulação das culturas), houve um aumento significativo ($P < 0,05$) nos níveis de IL-6, seguido de um decréscimo gradativo em todos os grupos avaliados. Este padrão de resposta coincide tanto com o padrão observado na contagem semanal de células viáveis não-aderentes presentes no sobrenadante das culturas, quanto com os números de CFU-GMs obtidos da suspensão de células não-aderentes da LT BMC, onde também notamos um declínio gradativo no decorrer das semanas.

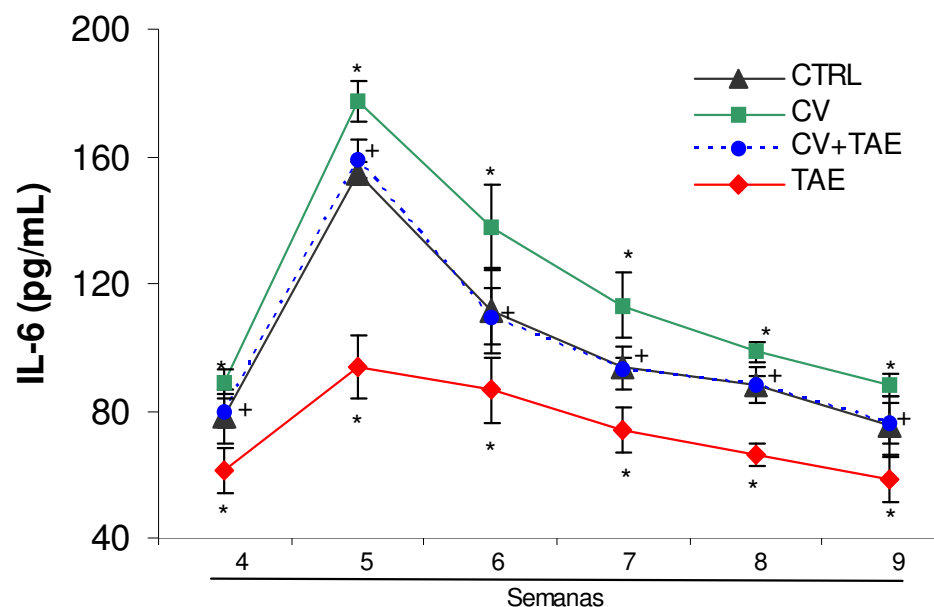


Figura 9: Produção de IL-6 (pg/ml) no sobrenadante de LTBM de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3^o, 8^o e 13^o após TAE). Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 5 frascos de cultura. * $P < 0,05$ comparado ao controle; + $P < 0,05$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.2.5.2. Produção de IL-1 α

Os resultados obtidos na avaliação dos níveis de IL-1 α no sobrenadante de LTBMCo coletado semanalmente da 4^a a 9^a semanas de incubação estão representados na Figura 10.

Podemos observar que o tratamento de animais normais com CV produziu um aumento significativo em média de 18% na produção desta citocina em relação aos animais controle ($P<0,05$). Em animais portadores de TAE, notamos uma diminuição significativa em média de 33% nos níveis de IL-1 α quando comparados ao controle ($P<0,05$). O tratamento destes animais com CV impediu a supressão induzida pelo tumor, mantendo a produção de IL-1 α semelhante a dos animais controles.

Desde a 4^a semana de incubação, podemos observar um decréscimo gradativo nos níveis desta citocina, em todos os grupos avaliados.

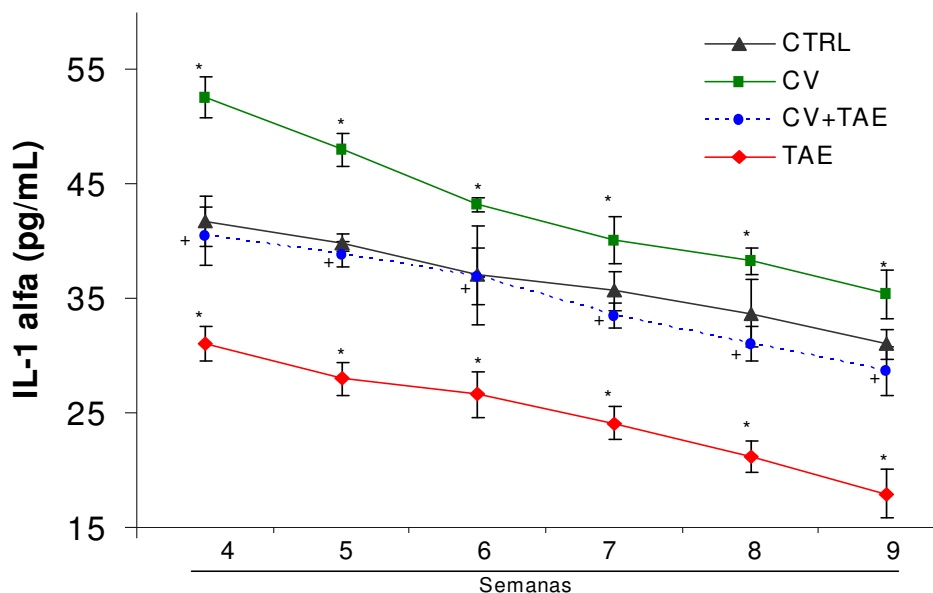


Figura 10: Produção de IL-1 α (pg/ml) no sobrenadante de LTBMCo de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3°, 8° e 13° após TAE). Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 5 frascos de cultura. * $P<0,05$ comparado ao controle; + $P<0,05$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.3. Atividade estimuladora de colônia (CSA)

Os efeitos da CV na atividade estimuladora de colônias estão demonstrados na Figura 11. Podemos observar que o tratamento de animais normais com 50 mg/Kg de CV dobrou a CSA quando comparado aos animais controle ($P<0,05$) nos três períodos estudados, corroborando estudos prévios (Souza-Queiroz et al. 2008; Dantas and Queiroz 1999; Konishi et al. 1996). A presença do tumor induziu um aumento progressivo da CSA de 148, 258 e 343%, respectivamente no 3º, 8º e 13º dias de evolução tumoral, quando comparado aos animais controle ($P<0,05$). O tratamento prévio destes animais com CV produziu um aumento na CSA equivalente a em média de 37%, nos três períodos avaliados, quando comparado aos animais apenas portadores de TAE ($P<0,05$).

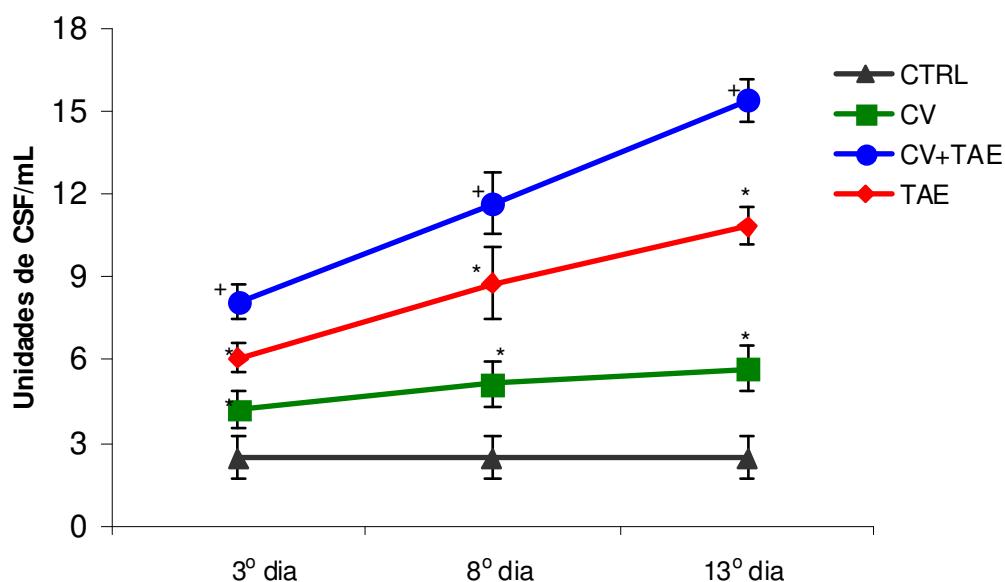


Figura 11: Atividade estimuladora de colônias (unidades de CSF/mL) no soro de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 6 animais por grupo. * $P<0,05$ comparado ao controle; + $P<0,05$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.4. 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 12, a atividade citotóxica de células NK aumentou em média 59% no grupo tratado com CV quando comparado ao grupo controle ($P<0,05$), em todos os períodos avaliados. Por outro lado, o grupo apenas portador de TAE mostra uma diminuição em média de 70% ($P<0,05$ comparado ao grupo controle) desta atividade. O tratamento destes animais com CV aumentou 130% a citotoxicidade das células NK ($P<0,05$) comparado ao grupo apenas portador de TAE.

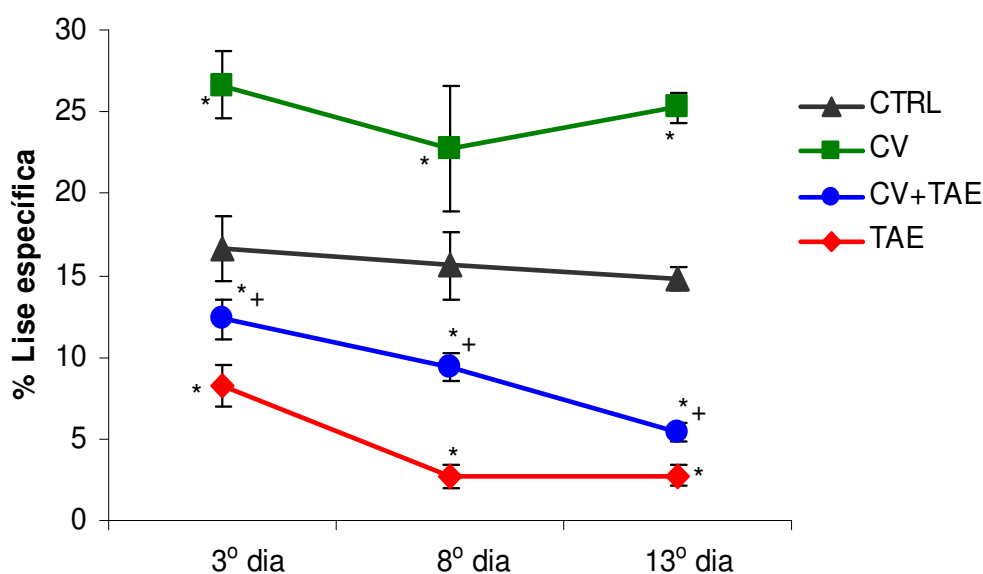


Figura 12: Atividade das células NK de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) e até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 6 animais por grupo. * $P<0,05$ comparado ao controle; + $P<0,05$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.5. Capacidade proliferativa de células mononucleares esplênicas

A Figura 13 demonstra que a resposta proliferativa de células mononucleares esplênicas de camundongos portadores de TAE a (Con A) foi em média duas vezes maior que o grupo controle ($P<0,01$) nos três períodos avaliados. Neste sentido, o tratamento destes animais com CV aumentou a taxa de proliferação celular ($P<0,01$) no 3º, 8º e 13º dias após a inoculação do tumor, respectivamente, 3, 4 e 2,5 vezes comparado ao grupo controle, e 1,5, 1,3, e 1,2 vezes comparado ao grupo apenas portador de TAE. Por outro lado, nenhuma mudança na resposta proliferativa foi produzida pelo tratamento de animais normais com CV.

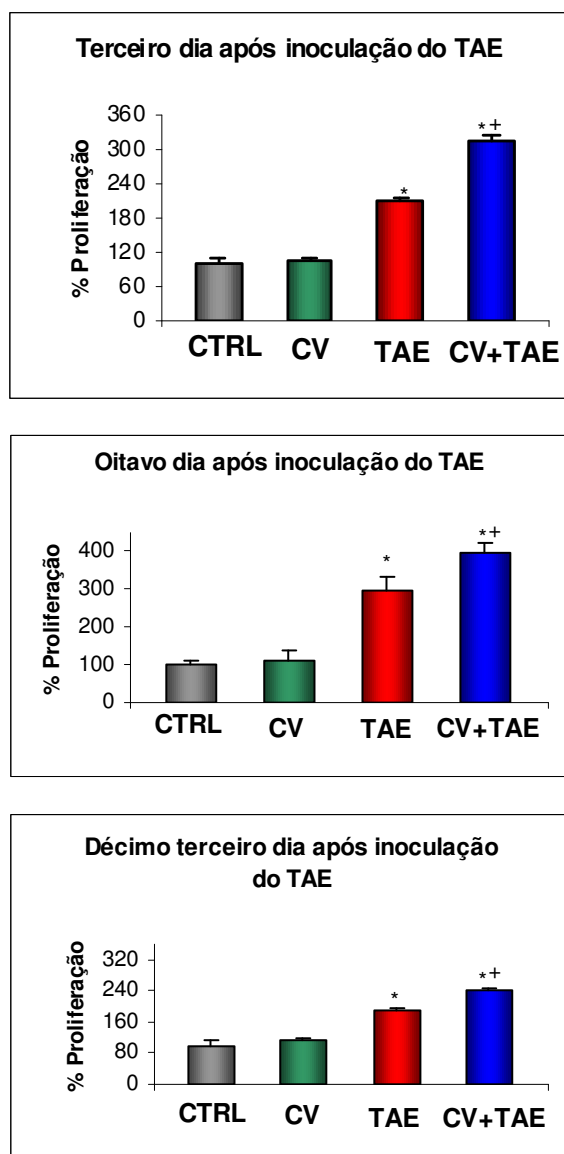


Figura 13: Atividade proliferativa de células esplênicas de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3^o, 8^o e 13^o após TAE). Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 6 animais por grupo. * $P < 0,01$ comparado ao controle; + $P < 0,01$ comparado ao TAE. ANOVA; Teste de Tukey.

4.6. Produção de $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, $IL-2$ e $IL-10$ por células esplênicas

4.6.1. $TNF-\alpha$

Os efeitos da CV na produção de $TNF-\alpha$ estão representados na Figura 14. Podemos observar que o tratamento de animais normais com CV produziu um aumento de 14,5% na produção desta citocina em relação aos animais controle ($P < 0,001$). Já em animais portadores de TAE, notamos uma diminuição progressiva de 12, 24 e 36% em relação ao controle ($P < 0,001$), respectivamente no 3º, 8º e 13º dias de desenvolvimento do tumor. O tratamento destes animais com CV impediu o efeito supressor induzido pelo tumor mantendo os níveis de $TNF-\alpha$ constantes e semelhantes aos produzidos pelo tratamento de animais normais com a alga, nos três períodos avaliados.

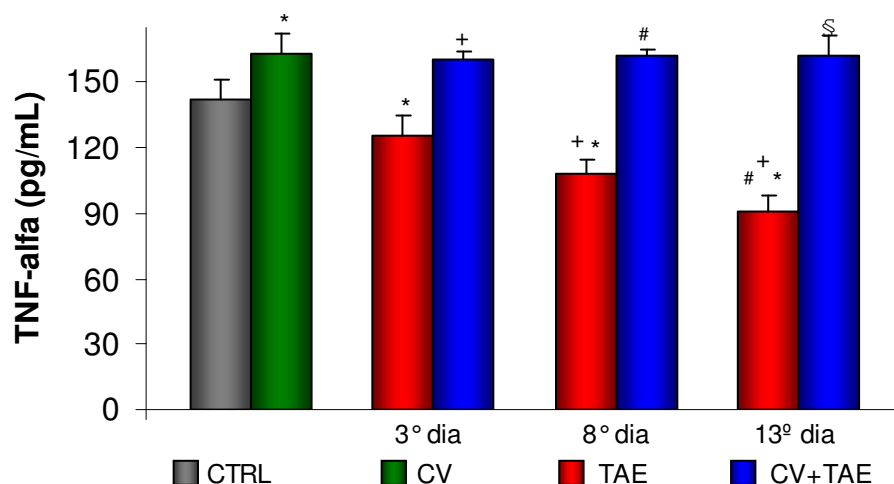


Figura 14: Produção de $TNF-\alpha$ (pg/mL) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). A citocina foi quantificada por ELISA. 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 3º dia após a inoculação do tumor; # $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 8º dia após a inoculação do tumor; § $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 13º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

4.6.2. IFN- γ

A Figura 15 demonstra que o tratamento de animais normais com da CV aumenta em 22% a produção de IFN- γ quando comparado aos animais controle ($P<0,001$). Quando analisamos os animais apenas portadores de TAE, notamos um dramático aumento de 137% nos níveis desta citocina no início do desenvolvimento tumoral, quando comparado ao controle ($P<0,001$). Este aumento é seguido de reduções de 35% e 46% observadas respectivamente no 8º e 13º dias de progressão tumoral. Por outro lado, o tratamento destes animais com CV restaurou os níveis de IFN- γ , produzindo níveis semelhantes ao controle tratado a partir do 8º dia após a inoculação tumoral.

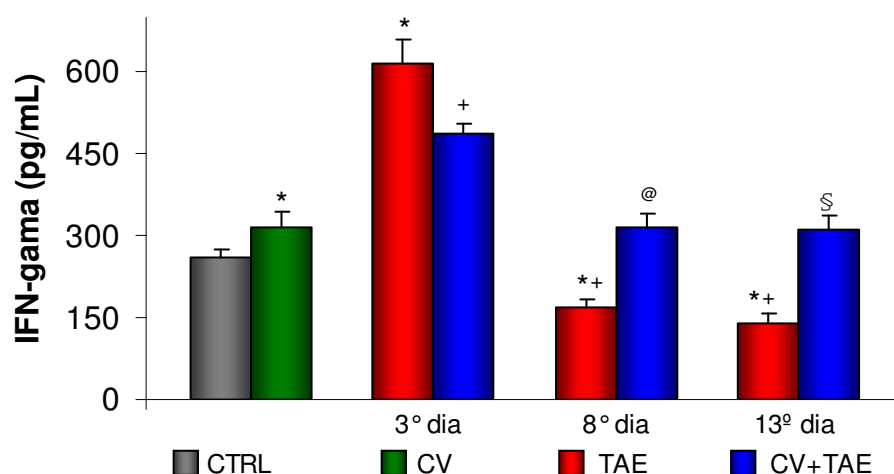


Figura 15: Produção de IFN- γ (pg/mL) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). A citocina foi quantificada por ELISA. Os valores 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 3º dia após a inoculação do tumor; @ $P<0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 8º dia após a inoculação do tumor; \$ $P<0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 13º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

4.6.3. IL-2

Os efeitos da CV na produção de IL-2 estão representados na Figura 16. Em animais normais o tratamento com CV provocou um aumento significativo de 32% na produção de IL-2, quando comparados aos animais controle ($P<0,001$). Por outro lado, em animais portadores de TAE, observamos uma diminuição de 22, 40 e 42% nos níveis desta citocina, respectivamente no 3º, 8º e 13º dias da progressão tumoral quando comparado ao grupo controle ($P<0,001$). No entanto, quando estes animais foram tratados com CV, os níveis de IL-2 se mantiveram semelhantes aos níveis dos animais normais tratados com a alga, nos três períodos da evolução temporal do tumor avaliados.

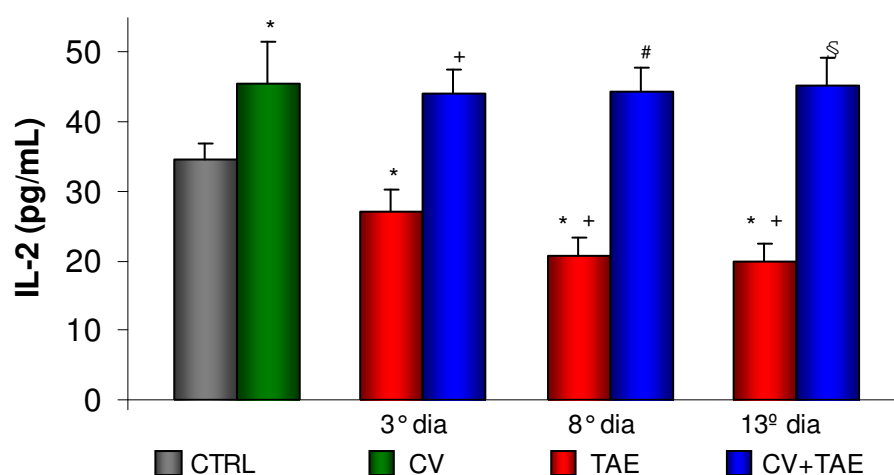


Figura 16: Produção de IL-2 (pg/mL) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). A citocina foi quantificada por ELISA. Os valores 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 3º dia após a inoculação do tumor; # $P<0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 8º dia após a inoculação do tumor; § $P<0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 13º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

4.6.4. IL-10

Os efeitos da CV na produção de IL-10 estão representados na Figura 17. Verificamos que nos 3 primeiros dias do desenvolvimento tumoral, os níveis de IL-10 nos grupos controle, controle tratado, tumor e tumor tratado mantiveram-se semelhantes. Por outro lado, nos animais apenas portadores de TAE aumentos significativos de 44 e 39% nos níveis desta citocina foram detectados no 8° e 13° dias de evolução tumoral, quando comparado ao controle ($P<0,001$). O tratamento destes animais com a alga foi capaz de proteger os animais, uma vez que a produção de IL-10 manteve-se semelhante aos níveis do controle.

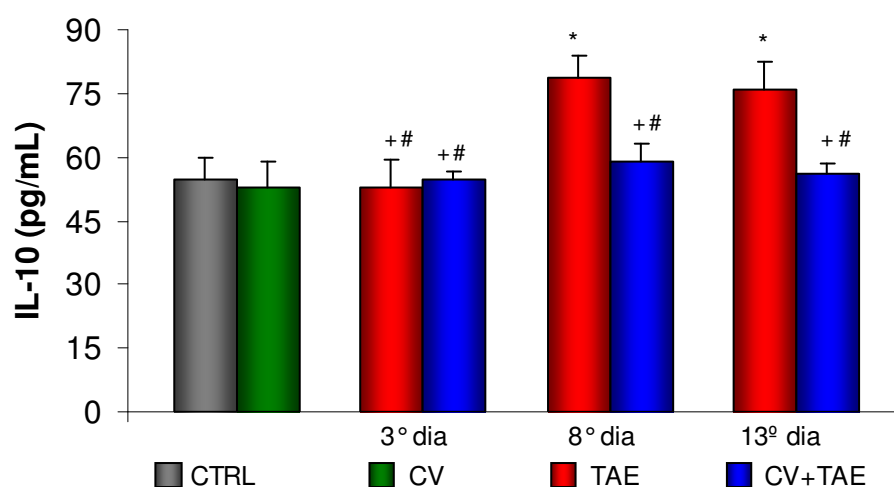


Figura 17: Produção de IL-10 (pg/mL) por células de baço de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3°, 8° e 13° após TAE). A citocina foi quantificada por ELISA. Os valores 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 8° dia após a inoculação do tumor; # $P<0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 13° dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

4.7. Produção de *TNF- α* , *IFN- γ* e *IL-10* por macrófagos esplênicos e peritoneais

4.7.1. *TNF- α*

Os efeitos do tratamento com CV sobre produção de *TNF- α* por macrófagos peritoneais e esplênicos de animais normais e portadores de TAE estão representados na figura 18A e B. Podemos observar que o tratamento de animais normais com CV produziu um aumento de aproximadamente 1,4 vezes na produção desta citocina nas duas populações macrofágicas, quando comparado ao grupo controle ($P<0,001$). 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 13º dia de evolução tumoral, por valores 1,5 vezes menores que o controle ($P<0,001$). O tratamento destes animais com CV impediu a supressão induzida pelo tumor e produziu níveis de *TNF- α* semelhantes aos produzidos no grupo controle. Por outro lado, no sobrenadante de cultura de macrófagos esplênicos observamos um aumento dramático na produção de *TNF- α* , o qual foi observado em todos os períodos da progressão tumoral avaliados e representado por valores 2 vezes maiores do que os observados no grupo controle ($P<0,001$). Nestes animais, o tratamento com CV produziu uma diminuição significativa ($P<0,001$), nos níveis desta citocina, a qual foi representada por valores equivalentes aos observados no animal controle tratado com CV.

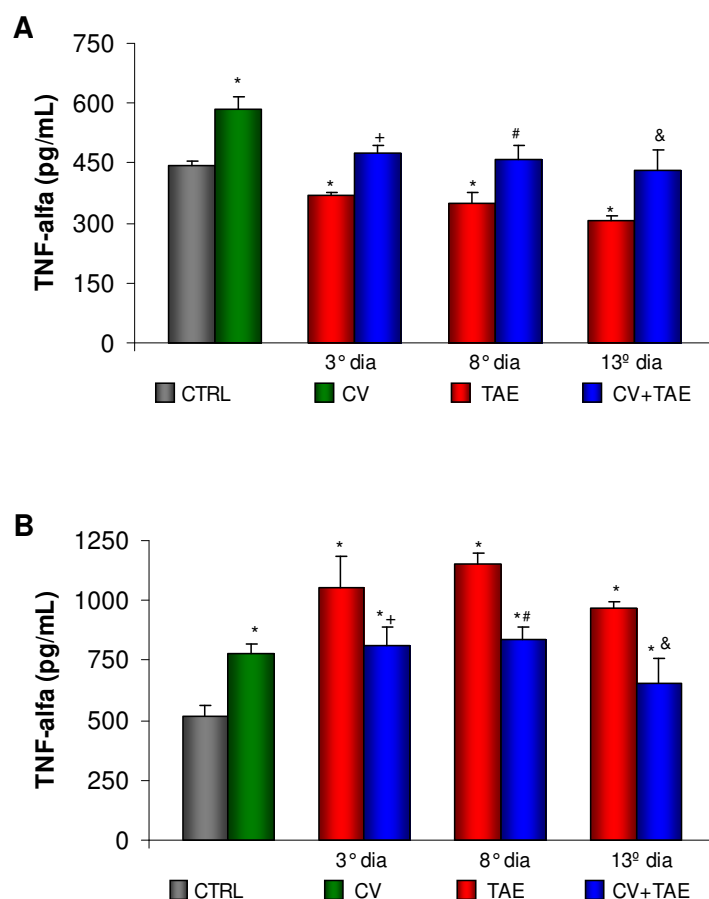


Figura 18: Produção de TNF- α (pg/mL) por macrófagos peritoneais (A) e esplênicos (B) de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). A citocina foi quantificada por ELISA. 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 3º dia após a inoculação do tumor; [#] $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 8º dia após a inoculação do tumor; [&] $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 13º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

4.7.2. IFN- γ

A Figura 19A e B representam os efeitos do tratamento com CV sobre produção de IFN- γ por macrófagos peritoneais e esplênicos de animais normais e portadores de TAE. Em animais portadores de TAE, podemos observar uma diminuição brusca nos níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais, a qual foi representada por valores 1,6 vezes menores do que os observados no controle ($P<0,001$). Esta diminuição foi ainda mais dramática no sobrenadante de cultura de macrófagos esplênicos onde observamos uma redução de 2,8 vezes, a qual se manteve constante nos três períodos de desenvolvimento tumoral analisados. O tratamento destes animais com CV restabeleceu os níveis normais de IFN- γ no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais e reverteu de forma parcial no sobrenadante de cultura de macrófagos esplênicos, dobrando os níveis desta citocina em relação ao grupo portador de TAE ($P<0,01$). Já em animais normais o tratamento com CV não alterou a produção de IFN- γ .

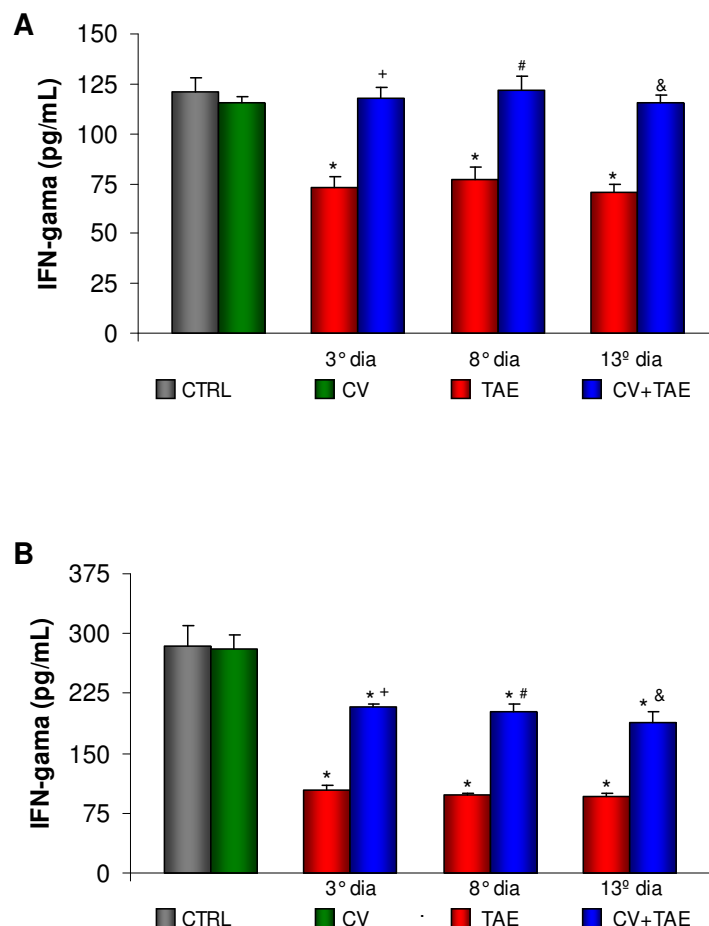


Figura 19: Produção de IFN- γ (pg/mL) por macrófagos peritoneais (A) e esplênicos (B) de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). A citocina foi quantificada por ELISA. 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 3º dia após a inoculação do tumor; [#] $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 8º dia após a inoculação do tumor; [&] $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 13º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

4.7.3. IL-10

Os efeitos do tratamento com CV sobre produção de IL-10 por macrófagos peritoneais e esplênicos de animais normais e portadores de TAE estão representados na Figura 20A e B. O tratamento de animais normais com CV não alterou a produção de IL-10 em animais normais. Por outro lado, aumentos significativos na produção de IL-10 foram observados tanto no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais quanto no de animais portadores de tumor. Macrófagos peritoneais apresentaram um aumento progressivo na produção desta citocina até o 8º dia após a inoculação tumoral, atingindo níveis 2,6 vezes maiores do que os observados no grupo controle ($P<0,001$), sendo que no 13º dia após a inoculação tumoral estes níveis foram reduzidos para apenas 1,6 vezes maiores que o grupo controle ($P<0,001$). Por outro lado, os macrófagos esplênicos apresentaram um aumento dramático na produção de IL-10, representado por valores 2,5 vezes maiores que os observados no grupo controle, o qual se manteve constante durante todo o período avaliado ($P<0,001$). O tratamento destes animais com CV restaurou para níveis semelhantes aos do controle o aumento de IL-10 observado no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais, enquanto que uma redução parcial, mas significativa ($P<0,001$), foi produzida pela alga nos níveis aumentados desta citocina observados no , a qual foi representada por valores 1,4 vezes menores do que os observados no animal portador de TAE.

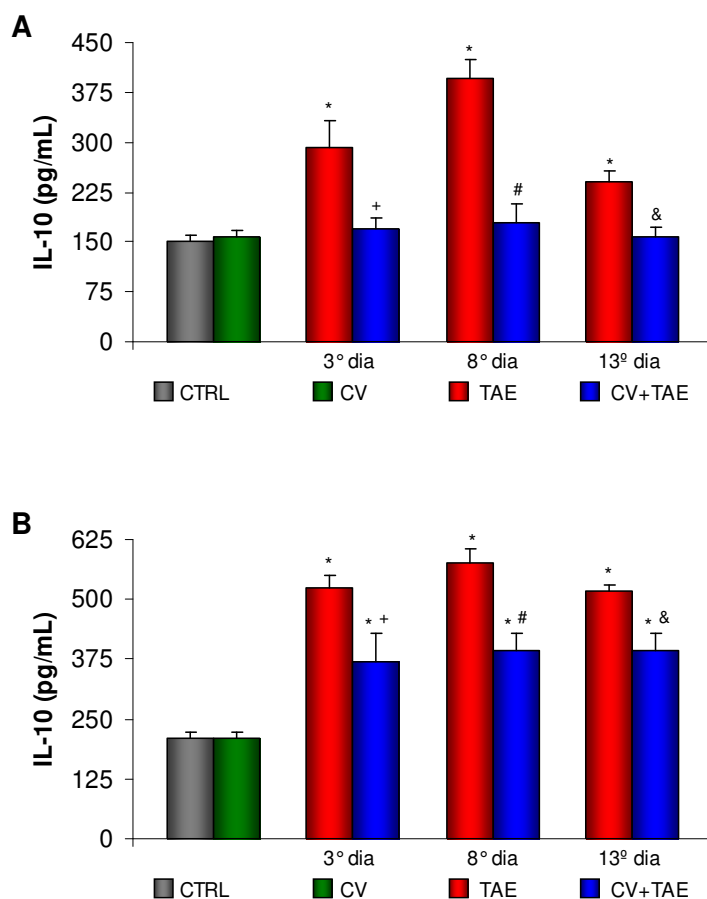


Figura 20: Produção de IL-10 (pg/mL) por macrófagos peritoneais (A) e esplênicos (B) de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o dia do sacrifício (3º, 8º e 13º após TAE). A citocina foi quantificada por ELISA. 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 3º dia após a inoculação do tumor; [#] $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 8º dia após a inoculação do tumor; [&] $P < 0,001$ comparado ao animal portador de TAE e sacrificado no 13º dia após a inoculação do tumor. ANOVA; Teste de Tukey.

4.8. Produção de H_2O_2 por macrófagos peritoneais

Os resultados obtidos na avaliação da produção de H_2O_2 estão representados na Figura 21. Podemos observar que o tratamento de animais normais com o CV não alterou, nos três períodos avaliados, a produção de peróxido de hidrogênio seja na presença ou ausência de estímulo (PMA). Já a presença do TAE aumentou significativamente ($P<0,001$) os níveis deste intermediário reativo de oxigênio (ROI) no 3º (182% sem PMA e 67% com PMA em relação ao controle) e no 8º (270% sem PMA e 76% com PMA em relação ao controle) dias de progressão tumoral, sendo que no 13º dia observamos a diminuição da produção, chegando aos níveis do controle. O tratamento com CV produziu aumentos adicionais ($P<0,001$) na produção de H_2O_2 do animal portador do tumor, tanto na presença de estímulo (35, 38 e 100%, respectivamente no 3º, 8º e 13º dias após inoculação do TAE) quanto na ausência (33, 28 e 65%, respectivamente no 3º, 8º e 13º dias após inoculação do TAE).

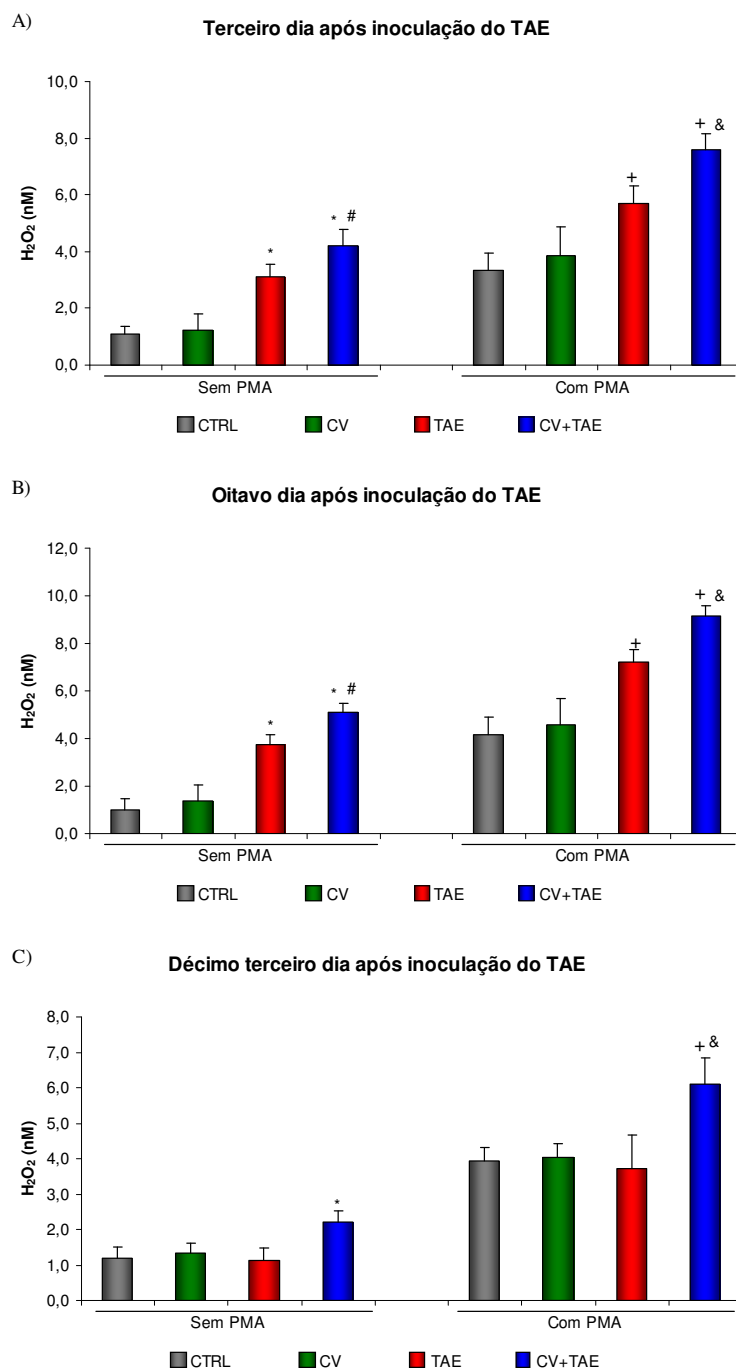


Figura 21: Produção de H_2O_2 (nM) por 1×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o 3º (A), 8º (B) e 13º (C) dia após o TAE. A concentração de H_2O_2 foi quantificada no sobrenadante de cultura de macrófagos pelo método de ELISA. Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 6 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparado ao controle sem PMA; # $P < 0,001$ comparado ao TAE sem PMA; + $P < 0,001$ comparado ao controle com PMA; & $P < 0,001$ comparado ao TAE com PMA. ANOVA; Teste de Tukey.

4.9. Produção de NO_2^- por macrófagos peritoneais

Nossos resultados em relação à avaliação da produção de NO_2^- estão representados na Figura 22. A produção de NO_2^- não foi alterada pelo tratamento de animais normais com CV seja na presença ou ausência de LPS, em nenhum dos três períodos avaliados. Em animais portadores do tumor observamos um aumento acentuado na produção deste radical ($P < 0,001$) em relação ao controle, de 726, 608 e 259 % sem LPS e de 475, 352 e 129% com LPS, respectivamente no 3º, 8º e 13º dias após inoculação do TAE. O tratamento de animais portadores de TAE com CV produziu ativação adicional ($P < 0,001$) na atividade dos macrófagos, levando a produção de nitrito para níveis superiores aos animais apenas portadores de TAE, sendo este aumento de 30, 23 e 146% na presença de estímulo e de 28, 31 e 56% na ausência, respectivamente no 3º, 8º e 13º dias após inoculação do TAE.

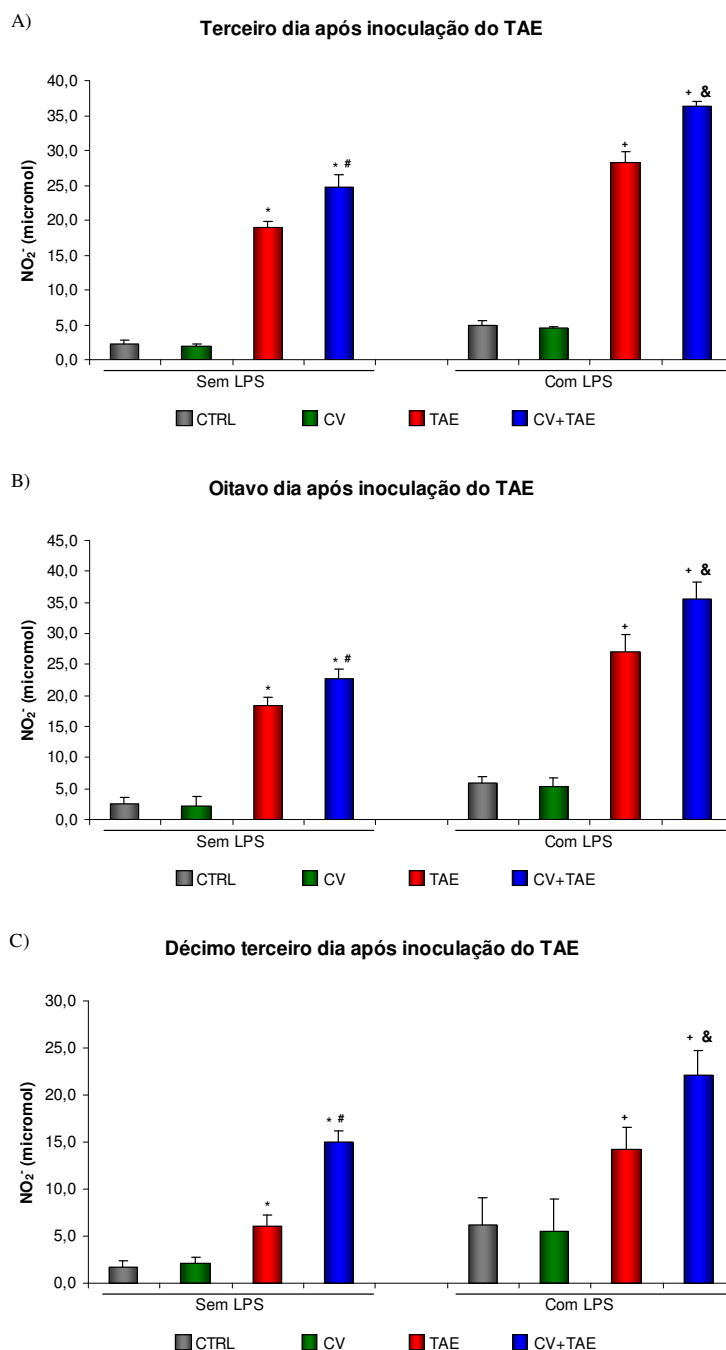


Figura 22: Produção de NO_2^- (μmol) por 1×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c portadores de TAE, tratados com 50 mg/Kg de CV por 10 dias antes da inoculação i.p. de células do tumor (6×10^6 células/animal) até o 3º (A), 8º (B) e 13º (C) dia após o TAE. A concentração de NO_2^- foi quantificada no sobrenadante de cultura de macrófagos pelo método de ELISA. Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 6 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparado ao controle sem LPS; # $P < 0,001$ comparado ao TAE sem LPS; + $P < 0,001$ comparado ao controle com LPS; & $P < 0,001$ comparado ao TAE com LPS. ANOVA; Teste de Tukey.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho investigamos os efeitos da *Chlorella vulgaris* sobre a resposta imunohematopoética de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich.

A avaliação da eficácia dos tratamentos Terapêutico e Profilático/Terapêutico com CV, realizada através da curva de sobrevida, demonstrou que o tratamento apenas Terapêutico não é efetivo na proteção dos animais contra os danos causados pelo desenvolvimento tumoral, uma vez que 100% dos animais tratados morreram junto com os animais apenas portadores de TAE até o 20º dia após a inoculação das células tumorais, independente da dose de CV administrada.

Já o tratamento Profilático/Terapêutico com as doses de 50, 100 e 500 mg/Kg/dia de CV, produziu aumento significativo na sobrevida dos animais ($P < 0,05$), o qual não foi observado com a dose de 25 mg/Kg/dia. Não observamos diferenças significativas na eficácia produzida por essas três doses, o que corrobora resultados anteriores do nosso laboratório (Dantas & Queiroz 1999; Justo et al. 2001).

Diante desses resultados optamos pelo tratamento Profilático/Terapêutico com a dose de 50 mg/Kg de CV para a realização do estudo dos parâmetros imunológicos e hematopoéticos propostos, já que esta foi a menor dose com eficácia terapêutica.

O sistema hematopoético é sensível a uma variedade de estímulos e modula a hematopoese de acordo com a demanda e necessidade do organismo. Dessa forma, a avaliação funcional da medula óssea é de especial importância uma vez que reflete possíveis alterações celulares que ocorrem como consequência da evolução temporal de doenças. Portanto, a utilização da LTBMCM permite a reprodução *in vitro* da maioria dos componentes envolvidos na hematopoese medular (Spooncer et al. 1993). A principal característica destas culturas é que a hematopoese é sustentada sem a adição de fatores de crescimento, sendo totalmente dependente do estabelecimento de camadas aderentes de células estromais derivadas da medula óssea (Dexter 1990). As células estromais mantêm a hematopoese através da formação de um microambiente apropriado para promover a sobrevivência, auto-renovação, proliferação e diferenciação das células tronco-hematopoéticas. Esta função é provavelmente a combinação de: a) moléculas de adesão que permitem a ligação de células tronco-hematopoéticas e de sua progênie e elementos específicos das células estromais; b) comunicação intercelular entre diferentes tipos de células estromais e entre células estromais e hematopoéticas; c) síntese, secreção e apresentação pelas células estromais de concentrações apropriadas de fatores estimuladores e inibidores de crescimento que são responsáveis pela regulação da proliferação e

desenvolvimento de células progenitoras hematopoéticas; d) síntese de moléculas da matriz extracelular pelas células estromais, que desempenham uma variedade de papéis na manutenção da integridade do microambiente hematopoético e também na apresentação de fatores de crescimento para o desenvolvimento de células hematopoéticas (Spooncer et al. 1993).

A formação da camada estromal ocorre entre a 2^a e 4^a semana de cultura. Na seqüência, as células mais primitivas migram para esta camada e em íntima associação com o microambiente, estabelece a hematopoese *in vitro*. As células mais imaturas permanecem no estroma e a medida que as células sofrem divisão e maturação, sua progênie é lançada no sobrenadante. A suspensão de células é predominantemente de neutrófilos maduros, além de células primitivas e progenitores comprometidos os quais podem ser identificados por ensaios de cultura clonal, como o CFU-C (Spooncer et al. 1993). O ensaio de LT BMC nos permite estudar vários parâmetros hematopoéticos, tais como, fatores de crescimento, mecanismos de ação hematopoéticos e a interferência de drogas tóxicas para o estroma medular (Guest & Uetrech 2000). Neste sentido, para verificar a ação da CV no compartimento hematopoético de animais normais e portadores de TAE, avaliamos os efeitos desta alga sobre a manutenção do estroma medular, a capacidade de suportar o crescimento e diferenciação de progenitores para granulócitos e macrófagos e a produção das citocinas IL-6 e IL-1 α no sobrenadante de LT BMC.

Poucos estudos na literatura tratam dos efeitos exercidos pelo desenvolvimento temporal do Tumor Ascítico de Erhlich sobre o microambiente medular. Queiroz e colaboradores (2004) demonstraram que ocorre uma diminuição dramática no número total de CFU-GM na suspensão de células não aderentes das LT BMCs de camundongos portadores de TAE quando comparados a animais normais. Também observaram diferenças bruscas em relação às camadas de células aderentes desde as primeiras semanas de incubação. As culturas derivadas de células de medula óssea de camundongos portadores de TAE apresentaram camadas aderentes com celularidade menor quando comparadas às culturas derivadas de animais normais. Nossos resultados corroboram com os da literatura uma vez que não foram observados nas culturas correspondentes às células de animais portadores de TAE os mesmos estromas densos e confluentes, observados nas culturas correspondentes aos animais controle. Além disso, a característica fundamental observada foi o dano à capacidade de suportar o crescimento e diferenciação de progenitores para granulócitos e macrófagos em todos os intervalos avaliados após a inoculação do tumor (3, 8 e 13 dias), chegando o número de CFU-GM a ser 4 vezes menor e o número de células viáveis no sobrenadante da LT BMC ser em média 1,3 vezes menor quando comparados ao

controle. Esta diminuição é observada já na 5ª semana de incubação e se mantém até a 9ª semana, quando um declínio acentuado no número de células viáveis do sobrenadante foi observado, corroborando resultados da literatura (Spooncer et al. 1993).

A falta de um estroma confluyente, que promova o contato entre células hematopoéticas e as camadas aderentes, tem como consequência a diminuição da capacidade de proliferação e diferenciação das células progenitoras da medula óssea observadas na LT BMC. Está bem estabelecido na literatura a importância da interação entre as células do estroma medular e os precursores hematopoéticos para a manutenção das célula-tronco hematopoética (HSC) e de suas características (Spooncer et al. 1993; Dexter 1990). Dessa forma, sugerimos que o desenvolvimento temporal do tumor interfere diretamente neste contato físico que é estritamente necessário para a manutenção da hematopoese, visto que ao final de cada semana de cultura os animais portadores de TAE apresentam uma diminuição significativa dos precursores para granulócitos e macrófagos em relação ao grupo controle. É importante mencionar que receptores de membrana restritos à macrófagos e ligantes clássicos do ácido siálico, chamados sialoadesinas, são expressos por todos os macrófagos da medula óssea e por um subconjunto de macrófagos tissulares e são responsáveis pela interação entre os macrófagos medulares e as células hematopoéticas em desenvolvimento (Allen et al. 1984; Gallangher et al. 1983; Crocker et al. 1995; Kusmartsev et al. 1999). Neste sentido, as células de TAE têm mostrado secretar grandes quantidades de sialomucinas (Vinuela et al. 1991; Medina et al. 1999), substâncias capazes de se ligar a macrófagos através dos mesmos receptores das sialoadesinas (Crocker et al. 1995; Ruiz de Morales et al. 1999; Subiza et al. 1992). O ponto de particular interesse nestes achados é que, em adição a outros fatores, aumentos nas quantidades circulantes de tais carboidratos de origem tumoral podem resultar no bloqueio destes receptores em macrófagos do estroma medular, desta forma inibindo sua adesão sialoadesina-dependente com as células progenitoras hematopoéticas (Crocker et al. 1995; Subiza et al. 1992) e, portanto, prejudicando o desenvolvimento de camadas aderentes.

Por outro lado, o tratamento de animais portadores de TAE com CV foi capaz de reverter este efeito em relação à formação do estroma medular, ao número de células viáveis no sobrenadante da LT BMC e em relação ao número total de CFU-GM na suspensão de células não-aderentes das LT BMCs. Estes achados confirmam a capacidade do CV de modular a mielopoese, estimulando o crescimento e diferenciação de células precursoras hematopoéticas e também atuando sobre o

microambiente hematopoético envolvido na regulação da maturação das células-tronco (VACEK et al. 1990).

Além das interações célula-célula existentes entre os precursores hematopoéticos e o estroma medular, inúmeras glicoproteínas solúveis controlam a mitose e a diferenciação de células hematopoéticas (Anjos et al. 2000). Dentre os vários fatores envolvidos no controle da hematopoese, a IL-6 possui uma função crítica na geração e manutenção da mielopoese em culturas líquidas de longa duração de células da medula óssea (Hauser et al. 1997). Além disso, evidências da literatura sugerem que a IL-6 em associação com os fatores estimuladores de colônias e as citocinas IL-1 e IL-3 são fundamentais na regulação da atividade funcional das células hematopoéticas primitivas (Muench et al. 1992), sendo a IL-6 considerada um fator de sobrevivência para as células progenitoras mais jovens (células-tronco) (Bernad et al. 1994). A IL-1 tem como característica principal o aumento na produção de CSFs (Dinarelli 1996). É interessante ressaltar que tanto a IL-6 quanto a IL-1 vem sendo alvo de vários trabalhos que buscam alternativas para a mielossupressão causada pelas diversas terapias antineoplásicas. O tratamento de animais expostos a Ciclofosfamida, Carboplatina e Nimustina Hidroclorida (drogas que causam acentuada mielossupressão), com IL-1 e G-CSF produziu significativa recuperação das taxas de hemoglobina e da contagem de leucócitos em sangue periférico (Mizushima et al. 1992). A combinação de IL-6 e G-CSF, também foi estudada e demonstrou ser capaz de acelerar a recuperação da aplasia causada por radioterapia em camundongos B6D2F1 (Patchen et al. 1993). Kovacs et al (1997), foram além e demonstraram que a IL-1 sozinha é capaz de acelerar tanto a recuperação granulopoética quanto trombopoética de camundongos mielossuprimidos por 5-fluorouracil. A associação desta citocina ao GM-CSF, IL-3 e/ou IL-6 se mostrou ainda mais eficaz na recuperação da mielossupressão. Nossos resultados sobre a produção de IL-6 e IL-1 α demonstraram uma diminuição, respectivamente de 25% e 33%, nos níveis destas citocinas no sobrenadante de LTBMCS de camundongos portadores de TAE. Por outro lado, o tratamento com CV não só aumentou os níveis de IL-6 (15%) e IL-1 α (18%) em animais normais, como também evitou a queda dos níveis destas citocinas em animais portadores de TAE, mantendo os níveis semelhantes ao do controle.

Nossos resultados sobre a viabilidade celular no sobrenadante, a contagem de células aderentes da LTBMCS, o número de CFU-GM e os níveis de IL-6 e IL-1 α , indicam que o CV além de não apresentar toxicidade sobre o estroma medular, parece não ter ação direta sobre a proliferação celular, mas sim sobre a atividade das células estromais, uma vez que em sobrenadante de LTBMCS de animais

portadores de TAE não há alterações no número de células aderentes, no entanto ocorre uma modulação positiva do número de células viáveis, do número de CFU-GM e dos níveis de IL-6 e IL-1 α .

O desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich é acompanhado de imunossupressão e alterações severas no sistema imunohematopoético do hospedeiro (Bincoletto et al. 2005). Resultados anteriores do nosso laboratório (Queiroz et al. 2004) demonstraram que a esplenomegalia e o aumento no número de CFU-GM no baço, associados à acentuada diminuição no número de CFU-GM da medula óssea de camundongos portadores de TAE, culminam com a morte do animal em aproximadamente 18 dias. Este fato tem sido atribuído à migração de células progenitoras da medula óssea para o baço. De qualquer modo, o baço é um órgão ativo não apenas no aumento da celularidade, mas também como sítio de ativação da hematopoese. Desta forma, é possível que os elevados níveis de CFU-GM no baço não sejam unicamente devidos 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 direta ou indiretamente no microambiente hematopoético, estimulando o crescimento e a diferenciação tanto de células do padrão Th₁ quanto do Th₂ (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 aproximadamente 148, 259 e 343 %, respectivamente no 3^o, 8^o e 13^o dias de desenvolvimento tumoral, em relação aos animais normais.

Os fatores estimuladores de colônias pertencem a um grupo de glicoproteínas que controlam o crescimento e diferenciação de progenitores pluripotenciais da medula óssea (CFCs – células formadoras de colônias) que podem dar origem a qualquer célula sanguínea dependendo do estímulo recebido, pois regulam sua produção, maturação e função (Metcalf et al. 1986). Estudos do nosso laboratório (Justo et al. 2001) demonstram que o tratamento com CV, embora não apresente efeito sobre o número de CFU-GM da medula óssea de camundongos normais, aumenta de forma significativa à atividade estimuladora de colônia no soro nestes animais. Confirmando estes resultados demonstramos que o tratamento com o CV foi capaz de dobrar a CSA em animais normais. Este

estímulo na produção de CSA pode estar relacionado à presença de uma glicoproteína antitumoral solúvel em água, que foi purificada da *Chlorella vulgaris*, e têm sido reportada como estimuladora da hematopoese e da recuperação após quimioterapia por aumentar os níveis de CSF e a migração de células progenitoras para o baço, seguida pela expansão de CFU-GM neste órgão (Konishi et al. 1996).

Experimentos recentes têm demonstrado que fatores de crescimento, como GM-CSF, G-CSF e M-CSF liberados pelas células tumorais e/ou células T reativas, não são os únicos fatores envolvidos na hematopoese extramedular (Ruiz de Morales et al. 1999). Estes autores sugerem que outros fatores de origem tumoral devem contribuir para o aumento no número de CFU-GM esplênico neste modelo tumoral. Deste modo, é razoável admitir que os efeitos do CV nas células progenitoras das linhagens granulocíticas e macrofágicas em camundongos portadores do tumor ocorrem possivelmente pela modulação na produção de citocinas/fatores estimuladores de colônias, e/ou da responsividade de células progenitoras ao CSF. Nossos resultados confirmam esta hipótese uma vez que demonstramos que o tratamento de animais portadores de TAE com CV elevou em média 37% a CSA em relação aos animais apenas portadores de TAE, nos três períodos da evolução temporal avaliados.

Diversos trabalhos têm demonstrado que além da ação direta sobre o microambiente medular e a produção de fatores de crescimento, o desenvolvimento do TAE ainda induz supressão da resposta imunológica do tipo celular mediada especialmente 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).

A resposta imune mediada por células é uma das principais ferramentas na eliminação de tumores (Liu et al. 2003). Isto pois desenvolve a imunidade através da geração de várias células imunes efetoras como linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, células natural killer e macrófagos (Goldsby et al. 2002). A diminuição da função ou a disfunção de linfócitos T citotóxicos e células NK, são os principais responsáveis pela reduzida imunidade de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia e radioterapia (Tsavaris et al. 2002). Desta forma, a ativação da resposta imune nestes pacientes é um passo fundamental na luta contra a ameaça imposta pelas terapias convencionais, bem como pelo tumor em si.

As células NK são potentes efetores do sistema imune inato e também estão envolvidas na vigilância e na lise de uma variedade de linhagens celulares tumorais e em modelos tumorais murinos (Hallett et al. 2006; Wodnar-Filipowicz et al. 2006). Nossos resultados demonstram, que em animais portadores de TAE a atividade citotóxica de células NK diminui em média 70%. Por outro lado, o

tratamento com CV foi efetivo tanto para aumentar a ativação destas células em animais normais (59%) quanto em animais portadores de TAE (130%). A CV também mostrou ser eficaz para aumentar a atividade de células NK em animais infectados com citomegalovírus (Ibusuki & Minamishima 1990) ou *Listeria monocytogenes* (Dantas et al. 1999).

Um outro aspecto importante que deve ser considerado sobre o efeito antitumoral da CV é a ação desta alga sobre a ativação e/ou proliferação de células mononucleares esplênicas. Nesse sentido, demonstramos que a presença do tumor dobra a taxa de proliferação de células esplênicas. Quando estes animais são tratados com CV este aumento chega a ser 3, 4 e 2,5 vezes maior em relação aos animais normais e 1,5, 1,3 e 1,2 vezes maior em relação aos animais apenas portadores de TAE, respectivamente no 3º, 8º e 13º dias após a inoculação das células do tumor.

O balanço das populações celulares esplênicas é claramente modificado pelo crescimento peritoneal das células tumorais. Segundo Segura et al (2000), no 7º dia de desenvolvimento tumoral ocorre um aumento de aproximadamente 65% no número total de células esplênicas. 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 muito provável que desequilíbrio no balanço Th_1/Th_2 causado pelo desenvolvimento do TAE, seja devido tanto pelas interações celulares como pela produção de fatores solúveis. Neste sentido, poderíamos atribuir estas mudanças do padrão $Th_1 \rightarrow Th_2$ a produção de IL-10 e a diminuição de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Nossos resultados demonstram que em animais normais, o tratamento com CV foi capaz de promover aumentos de 14,5% na produção de TNF- α , 22% na produção de IFN- γ e 32% na produção de IL-2. A presença do tumor levou a uma redução significativa nos níveis destas três citocinas. Em relação ao TNF- α , observamos uma redução progressiva que atingiu níveis de 12%, 24% e 36%, observados respectivamente, nos dias 3, 8 e 13 da evolução tumoral. Concomitantemente, verificamos uma diminuição na produção de IL-2, sendo esta diminuição de 22% no 3º dia e em média 41% no 8º e 13º dias. Já em relação à produção de IFN- γ , um aumento foi observado no 3º dia após a inoculação tumoral, atingindo níveis 137% superiores ao observado no controle. No entanto, com a evolução tumoral observamos a redução dos níveis desta citocina no 8º e 13º dias, atingindo, respectivamente, níveis 35% e 46% menores quando comparados ao grupo controle. Em relação aos

níveis da citocina IL-10, não observamos mudança nos 3 primeiros dias de desenvolvimento tumoral, no entanto um aumento de cerca de 41% é observado no 8º dia, mantendo-se até o 13º dia. O tratamento destes animais com CV foi capaz de manter os níveis de IL-10 semelhantes aos do controle.

Analisando os resultados obtidos na produção de IL-10 e confrontando-os com a redução observada nos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-2, fica clara a imunossupressão progressiva induzida pelo desenvolvimento tumoral e a migração do padrão Th₁ para Th₂. No entanto, em animais que receberam tratamento com o CV, este quadro de imunossupressão progressiva provocada pelo desenvolvimento temporal do TAE não foi observado em relação a nenhum dos fatores analisados. Tanto a produção de TNF- α , quanto de IL-2 e IL-10 mantiveram-se semelhantes aos níveis produzidos pelos animais controle apenas tratados com a alga. Em relação ao IFN- γ , uma diminuição de 20% (em relação aos animais portadores de TAE) foi observada no 3º dia da inoculação tumoral, sendo que, no 8º e 13º dias, os níveis desta citocina atingiram valores semelhantes ao observado no grupo controle apenas tratado com CV.

As células do sistema imunológico desempenham muitas de suas funções graças à produção de citocinas. A interleucina 2 estimula a proliferação de células NK e células T (Misawa et al. 2000), enquanto IFN- γ , uma citocina chave secretada por células NK 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). Está bem estabelecido que IFNs ou indutores de IFN potencializam a reatividade de células NK assim como a função de macrófagos (Djeu et al. 1979; Kuribayashi et al. 1981; Malkovsky et al. 1987; Pace et al. 1983; Yamamoto et al. 1995). Vários estudos demonstram que a citocina IL-2, sozinha ou em combinação com IFNs, também aumenta a atividade lítica de células NK (Kuribayashi et al. 1981; Hefeneider et al. 1983; Henney et al. 1981; Misawa et al. 2000; Sayers et al. 1989; Young et al. 1987), as quais produzem e secretam uma variedade de moléculas imunoreguladoras que atuam sinergicamente com IFNs, com a própria IL-2, ou com citocinas induzidas por IL-2, para ativação de respostas antitumorais (Allavena et al. 1985; Svedersky et al. 1985). A IL-2 foi inicialmente identificada como fator de crescimento de células T (Ehrhardt et al. 1997; Taniguchi et al. 1983). 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). Desta forma, quando analisamos nossos resultados verificamos que o tratamento com CV aumenta a

produção de IL-2, o que influencia a atividade de células do sistema imune, induzindo sua proliferação e modulando suas habilidades para produzir citocinas, como IFN- γ e TNF- α . Isto se deve, em parte, a estimulação da citotoxicidade mediada por células NK. Neste ponto, é importante comentar a habilidade das células tumorais de inibir a resposta de células T mediadas por IFN- γ (Gosh et al. 1995; Handel-Fernandez et al. 1997; Huang et al. 1995; Segura et al. 1997; Elexpuru et al. 1997; Stefanski et al. 1996; Tada et al. 1991). Células tumorais também têm a habilidade de suprimir a produção de TNF- α . Muitas tentativas têm sido feitas para explicar o sinergismo entre TNF e IFN- γ . Está bem estabelecido que IFN- γ regula positivamente a expressão de receptores de TNF (Tsujimoto et al. 1986; Aggarwal and Eessalu 1987). Todavia, é evidente que IFN- γ sozinho induz a inibição do crescimento de certas células tumorais (Sugarman et al. 1985) e produz esta potente inibição pelo sinergismo com TNF. Independentemente do mecanismo responsável pela sinergia entre TNF e IFN- γ , estas citocinas têm sido consideradas importantes citocinas antitumorais. Desta forma, acreditamos que dentre todos os fatores solúveis cuja produção é estimulada pelo CV, destacam-se o TNF- α e o IFN- γ , os quais, sozinhos ou em combinação, atuam na regulação da ativação de macrófagos contribuindo para a resposta antitumoral do hospedeiro (Yamamoto et al. 1995).

Em relação à produção de IL-10, demonstramos que células esplênicas de camundongos portadores de TAE, estimuladas *in vitro* com Con A produzem mais IL-10 do que células de animais controle. Por outro lado, quando estes animais foram tratados com CV a produção de IL-10 foi significativamente reduzida. A IL-10 foi inicialmente descrita como uma citocina imunoreguladora, que é produzida tardiamente após estimulação por células T e macrófagos (Yssel et al. 1992). No entanto, distintas vias de sinalização que levam à produção de IL-10 por várias outras células, incluindo as células B, mastócitos e células NK, também foram mostrados (Howard et al. 1992; Mehrotra et al. 1998). Curiosamente, IL-10 foi mencionada por prejudicar a capacidade dos macrófagos de fornecer sinais de co-estimulação para a proliferação de células T, efeito este principalmente mediado pela inibição da produção de IL-2 (Parhar & Lala 1988).

Levando em consideração estes resultados sobre o efeito de CV sobre a proliferação e produção de citocinas por células mononucleares esplênicas de animais normais e portadores de TAE e o fato de que células neoplásicas malignas freqüentemente redirecionam a atividade citotóxica de macrófagos em prol do próprio desenvolvimento tumoral (Fecchio et al. 1990; Subiza et al. 1989), decidimos purificar macrófagos esplênicos e peritoneais para avaliar os efeitos do CV diretamente nestes tipos celulares.

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 que um grande número de constituintes derivados de plantas estimulam a ação imunomoduladora e antitumoral através da ativação direta de receptores específicos dos macrófagos (Schepetkin & Quinn 2006). A ativação destes receptores desencadeia a cascata intracelular de sinalizações, 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). A cooperação entre o IFN- γ e o TNF- α é demonstrada por Young et al (1997), cujos estudos concluem que a associação IFN- γ /TNF- α pode induzir mudanças de células progenitoras mielocíticas secretoras de TGF- β para células monocíticas não supressoras que secretam TNF- α . Tais observações se tornam muito relevantes quando focamos a habilidade do TNF- α em inibir o crescimento de células de TAE *in vitro* e *in vivo* (Kurland et al. 1977; Schultz et al. 1978).

O estudo dos efeitos do tratamento com CV sobre a atividade de macrófagos isolados do peritônio e baço de animais normais e portadores de TAE, demonstra que, em animais normais, o tratamento com CV promove aumento de 1,4 vezes nos níveis de TNF- α nos sobrenadantes das culturas das duas populações macrofágicas estudadas, sem alterar a produção de IFN- γ e IL-10. A presença do tumor aumentou em até 2 vezes a produção de TNF- α pelos macrófagos do baço, comparado ao controle não-tratado, ao mesmo tempo em que reduziu em aproximadamente 1,5 vezes a produção desta citocina pelos macrófagos do peritônio. Reduções significativas na produção de IFN- γ , paralelamente a aumentos significativos na produção de IL-10 foram observados nos dois sistemas de cultura, caracterizando assim a predominância do padrão Th₂ produzido pela evolução tumoral. Interessante observar que, em todas as situações estudadas, resposta mais dramática foi observada em culturas de macrófagos esplênicos. Tratamento com CV restabeleceu a produção normal das três citocinas por macrófagos peritoneais, enquanto que uma reversão parcial, mas significativa foi observada nos efeitos produzidos pela presença do TAE na atividade dos macrófagos esplênicos.

Trabalhos do nosso grupo têm demonstrado que durante o desenvolvimento do TAE ocorre profundas alterações hematopoéticas, resultando em declínio no número de células progenitoras,

particularmente da linhagem macrofágica e granulocítica (CFU-GM), seguido de aumento hematopoese extramedular (Pessina et al. 1982; Queiroz et al. 2004). A diminuição das células progenitoras na medula óssea é associada a uma migração, via corrente sangüínea, levando a uma acumulação no baço (Valadares et al 2006a). Akev et al 2007a, b, demonstraram que em animais portadores de TAE, análise histológica do baço mostra presença de hiperemia e dilatação devido a infiltração de células inflamatórias, especialmente leucócitos, com predominância de macrófagos supressores (Parhar & Lala 1988; Mantovani et al.1992; Yamamoto et al. 1995; Elgert et al. 1998; Utsumi et al. 1990; Watson et al. 1991; Palermo-Neto et al. 2003). Neste contexto, um possível mecanismo responsável pela evolução tumoral seria o aumento na produção de TNF- α por macrófagos supressores esplênicos, os quais seriam produtos da hematopoese esplênica induzida pelo desenvolvimento tumoral. Além disso, TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória fundamental para o processo de angiogênese, condição indispensável para o aumento da vascularização e conseqüente desenvolvimento tumoral (Teixeira et al. 2006). Por outro lado, TNF- α liberado por macrófagos na cavidade peritoneal desempenha papel fundamental na defesa do hospedeiro, estimulando autocrinamente a 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).

Um outro fator essencial para a defesa do hospedeiro é a produção de IFN- γ , que além de promover a ativação de células NK e a diferenciação de células no organismo, induz a ativação de macrófagos (Furusawa et al. 2003; Kodama et al. 2002). A ativação de macrófagos pelo IFN- γ , tem sido um marcador de resposta imune contra patógenos intracelulares, células tumorais, bem como certas reações auto-imunes. IFN- γ ativa macrófagos a produzirem citocinas que desempenham mecanismos antimicrobianos e tumorícidias, e ativam APCs (Farrar et al. 1993; Murray et al. 1994). A interleucina 10, por outro lado, 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 (Tanaka 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-1 β , 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), diminuindo drasticamente a proliferação de células T,

suprimindo a atividade de macrófagos e células natural killer (Huang et al. 1995), ou ainda inibindo a capacidade de apresentação de antígeno, incluindo a maturação de APCs (Buelens et al. 1997), a expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias (Fiorentino et al. 1991; De Waal Malefyt et al. 1991).

É bem estabelecido que a atividade tumoricida dos macrófagos está relacionada não apenas a produção de citocinas inflamatórias, mas em grande parte à liberação de dois grupos de compostos inorgânicos com alto grau de reatividade: os intermediários reativos de oxigênio (ROI) como superóxido e peróxido de hidrogênio, e os intermediários reativos de nitrogênio (RNI) incluindo nitrito e óxidos altamente reativos como óxido nítrico e dióxido de nitrogênio (Cotton & Wilkinson 1980). ROIs são produzidos pelo *burst* respiratório de monócitos e macrófagos em resposta a interações ligante-receptor e estão envolvidos na atividade citotóxica anticorpo-dependente (Lewis & McGee 1992) e anticorpo-independente (Martin & Edwards 1993). 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^-) (Bhaumik et al 2000; Ding et al. 1988) e tem sido associada à indução de apoptose em células alvo (Brune et al. 1999). 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). Nishikawa et al (2004), demonstraram que a inibição do transporte de elétrons mitocondriais por formação endógena de NO efetivamente induz apoptose de células tumorais ascíticas. Assim, o NO exerce papel crítico na defesa do hospedeiro contra células tumorais pela inibição do metabolismo energético e/ou por um mecanismo apoptótico, particularmente através da diminuição da tensão de oxigênio na cavidade peritoneal.

O tratamento de animais normais com CV não alterou, nos três períodos avaliados, a produção de peróxido de hidrogênio ou de nitrito seja na presença ou ausência de estímulo. A presença do TAE foi capaz de duplicar os níveis de H_2O_2 no 3º e no 8º dias de progressão tumoral. No entanto no 13º dia observamos a diminuição desta produção, chegando aos níveis do controle. O tumor também estimulou a produção de NO_2^- provocando um aumento acentuado nos níveis deste radical de até 7 vezes no 3º e no 8º dias, e de 2 vezes no 13º dia, quando notamos uma tendência à diminuição. O tratamento com CV produziu estímulo adicional na produção de H_2O_2 no animal portador do tumor, nos três períodos avaliados. Um padrão semelhante de efeito foi observado quanto à produção de NO_2^- .

Em animais portadores de TAE, a liberação de H_2O_2 e NO_2^- por macrófagos peritoneais é estimulada pela simples presença das células tumorais na cavidade peritoneal do animal. No entanto, quando o tumor se desenvolve em animais tratados com CV, verificamos que a ativação macrofágica é mais efetiva, produzindo níveis maiores de peróxido de hidrogênio e nitrito, até mesmo no 13º dia de evolução do tumor quando ocorre diminuição da atividade de macrófagos visto que o animal já se encontra no estágio terminal do desenvolvimento do tumor.

O mecanismo de ação pelo qual a *Chlorella vulgaris* exerce sua atividade imunomoduladora ainda não está completamente esclarecido. No entanto, os mecanismos descritos neste trabalho como a regulação hematopoética, aumento da atividade citotóxica de células NK, o aumento da proliferação e atividade de células mononucleares esplênicas, a ativação macrofágica e a polarização da resposta imunológica para Th_1 são de fundamental importância na ação antitumoral da CV.

A Figura 23, em suma, ilustra as alterações induzidas pelo desenvolvimento do TAE e onde, possivelmente, a *Chlorella vulgaris* age através do estímulo aos mecanismos imunomoduladores.

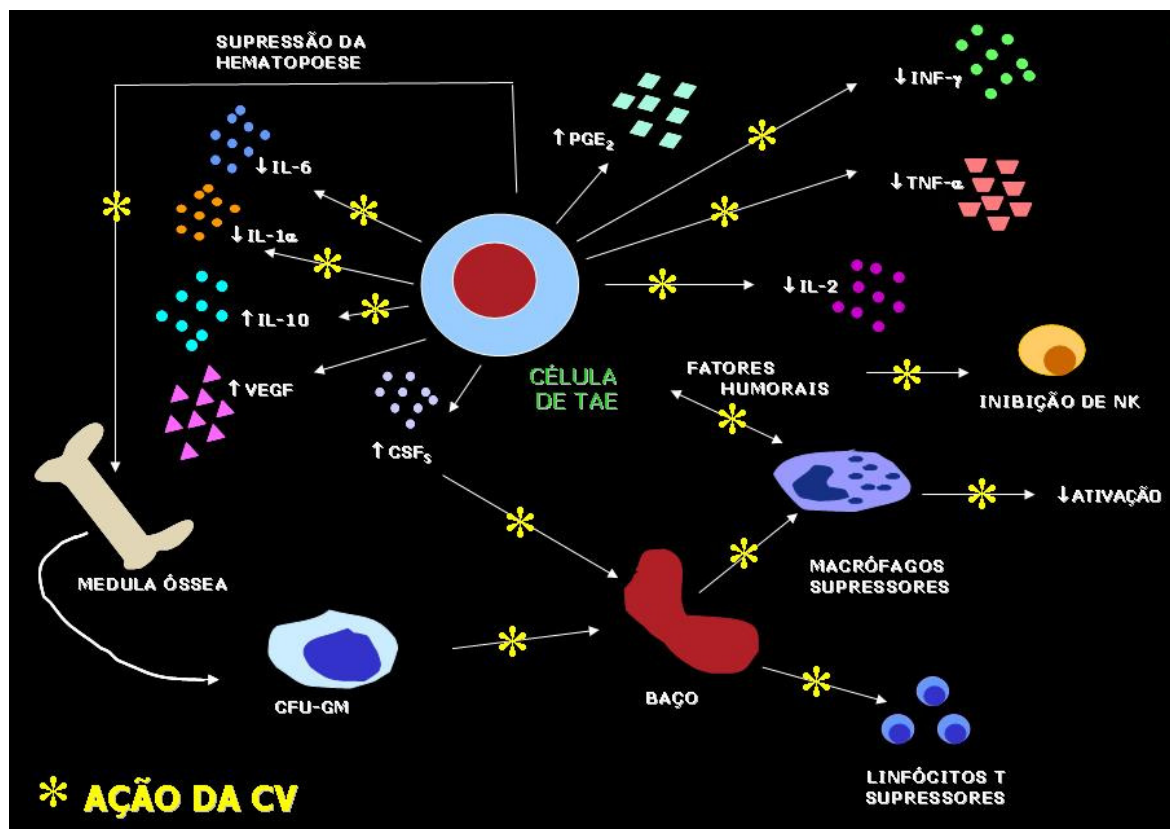


Figura 23: Esquema das alterações induzidas pelo desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich e possíveis locais de ação da CV (*).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A partir dos experimentos realizados podemos concluir neste trabalho que o tratamento profilático/terapêutico de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich com a dose de 50mg/Kg/dia da alga *Chlorella vulgaris*:

- ◆ Prolonga a sobrevida;
- ◆ Protege o hospedeiro da mielossupressão induzida pelo desenvolvimento tumoral por agir tanto na formação e manutenção do estroma medular, quanto no estímulo da atividade das células estromais induzindo a liberação de citocinas reguladoras da hematopoese como a IL-6 e a IL-1 α ;
- ◆ Aumenta a atividade estimuladora de colônias no soro;
- ◆ Aumenta a atividade de células NK;
- ◆ Aumenta a proliferação de células mononucleares esplênicas;
- ◆ Aumenta a produção de citocinas com padrão Th₁ (IL-2 e INF- γ) e a liberação de TNF- α por células mononucleares esplênicas, paralelamente diminui a produção de IL-10 (padrão Th₂);
- ◆ Restabelece a produção normal de TNF- α , IFN- γ e IL-10 por macrófagos peritoneais e reverte parcialmente os efeitos supressores do tumor na atividade dos macrófagos esplênicos;
- ◆ Aumenta a atividade antitumoral de macrófagos pelo estímulo da produção de H₂O₂ e nitrito.

Analisando todos os nossos resultados e levando em consideração o fato de que substâncias com potencial imunomodulador, visam aumentar ou restabelecer os mecanismos de defesa naturais dos pacientes para agirem contra as células tumorais, sem contudo, apresentar os efeitos colaterais graves dos quimioterápicos (Ernst & Cassileth 1999; Verhoef et al. 1999), podemos dizer que a alga *Chlorella vulgaris* além de possuir alto valor nutritivo (Baianova & Trubachev 1981), capacidade antioxidante (Vijayavel et al. 2007) e atividade anti-viral e antibacteriana (Ibusuki & Minamishima 1990; Souza-Queiroz et al 2004, 2008; Dantas & Queiroz 1999), apresenta importante atividade imunomoduladora frente ao desenvolvimento do TAE, já que na presença do tumor o hospedeiro que vem recebendo *Chlorella* é capaz de reagir mais prontamente e com maior vigor na indução de mecanismos essenciais de defesa imunológica. Neste sentido, sugerimos que a alga *Chlorella vulgaris* pode ser um candidato a agente preventivo e complementar no tratamento do câncer.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal BB, Eessalu TE. Induction of receptors for tumor necrosis factor- α by interferons is not a major mechanism for their synergistic cytotoxic response. *The Journal of Biological Chemistry* 262(21), 10000-10007, 1987.
- Akev N, Turkay G, Can A, Gurel A, Yildiz F, Yardibi H, Ekiz EE, Uzun H. . Effect of *Aloe vera* leaf pulp extract on *Ehrlich ascites* tumours in mice. *European Journal of Cancer Prevention* 16(2), 151-157, 2007 (b).
- Akev N, Turkay G, Can A, Gurel A, Yildiz F, Yardibi H, Ekiz EE, Uzun H. Tumour preventive effect of *Aloe vera* leaf pulp lectin (Aloctin I) on *Ehrlich ascites* tumours in mice. *Phytotherapy Research* 21, 1070-10075, 2007 (a).
- Allavena P, Scala G, Djeu JY, Procopio AD, Oppenheim JS, Herberman RB, Ortaldo JR. Production of multiple cytokines by clones of human large granular lymphocytes. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 19, 121-126, 1985.
- Allen, TD, Dexter, TM. The essential cells of the haemopoietic microenvironment. *Experimental Hematology* 12, 517-521, 1984.
- Anjos, AR, Alvares-Silva, M, Borelli, P. Matriz Extracelular e Leucemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 22(3), 404-412, 2000.
- Baianova, I & Trubachev, I.N. Comparative evaluation of vitamin composition of unicellular algae and higher plants Brown under artificial conditions. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya* 17(3), 400-407, 1981.
- Baugh JA & Bucala R. Mechanisms for modulating TNF in immune inflammatory disease. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 4, 635-650, 2001.
- Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity* 1(9), 725-731, 1994.
- Bhaumik S, Jyothi MD, Khar A. Differential modulation of nitric oxide production by curcumin in host macrophages and NK cells. *FEBS Letters* 483, 78-82, 2000.
- 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 Immunopharmacology* 5, 679-688, 2005.

Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 6, 969-975, 1999.

Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F: Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony- stimulating factor. *European Journal of Immunology* 27, 756–762, 1997.

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. *Journal of Immunology* 174, 3148-3152, 2005.

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 Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302, 337-343, 2002.

Cha KH, Koo SY, Lee DU. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(22), 10521-10526, 2008.

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* 7(1), 49-57, 2002.

Collet, D. Modeling survival data in medical research. In: Texts in statistical science. London, Chapman & Hall, 1, 1994.

Cotton FA & Wilkinson G. Advanced inorganic chemistry, a comprehensive text. 4th edition. Wiley-Interscience, New York, 1980, pp 422-430.

Crocker PR, Freeman S, Gordon S, Kelm S. Sialoadhesin binds preferentially to cells of the granulocytic lineage. *Journal of Clinical Investigation* 95, 635-643, 1995.

Dantas DCM & Queiroz MLS. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Immunopharmacology* 21, 499-508, 1999.

Dantas DCM, Kaneno R, Queiroz MLS. The effects of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of natural killer cells. *Immunotoxicology and Immunopharmacology* 21(3), 609-619, 1999.

- 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. *Journal of Experimental Medicine* 174, 1209-1220, 1991.
- DeGowin, RL, Gibson DP, Knapp SA, Wathen LM. Tumor-induced suppression of marrow stromal colonies. *Experimental Hematology* 9(7), 811-819, 1981.
- Dexter, M. Hematopoietic Growth Factors: Review of biology and clinical potential, Gardiner-Cadwell Communication, United Kingdom, 1990.
- Dinarelli CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87(6), 2095-2147, 1996.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology* 150, 2407-2412, 1993.
- Djeu JY, Heinbaugh JA, Holden HT, Herberman RB. Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *The Journal of Immunology* 122, 175-181, 1979.
- Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, Neurath M, Strober W. Induction and prevention of chronic inflammation in IL-2-deficient mice. *The Journal of Immunology* 158(2), 566-573, 1997.
- Elxepuru A, Martin-Nieto J, Jimenez A, Gomez C, Villalobo A. Ehrlich ascites tumor cells produce a transforming growth factor-beta (TGF- β)-like activity but lack receptors with TGF- β -binding capacity. *Molecular and Cellular Biochemistry* 170(1-2), 153-162, 1997.
- Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *Journal of Leukocyte Biology* 64, 275-290, 1998.
- Ernst E, Cassileth BR. How useful are unconventional cancer treatments? *European Journal of Cancer* 35, 1608-1613, 1999.
- Farias-Eisner, R., Shermant M.P., Aeberhard, E. and Chaudhuri, G. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 91, 9407-9411, 1994.
- Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual Review in Immunology* 11, 571-611, 1993.
- Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272(5258), 50-53, 1996.

Fecchio D, Russo M, Sirois P, Braquet P, Jancar S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF-antagonists. *International Journal of Immunopharmacology* 12, 57-65, 1990.

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

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

Furusawa E, Hirazumi A, Story S, Jensen J. Antitumour potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma 180 ascites tumour in mice. *Phytotherapy Research* 17, 1158-1164, 2003.

Gallagher JT, Spooncer E, Dexter TM. Role of the cellular matrix in haemopoiesis. I. Synthesis of glycosaminoglycans by mouse bone marrow cell cultures. *Journal of Cell Science* 6, 155-171, 1983.

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

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology* 5th ed. New York, NY: W. H. Freeman, 2002.

Gosh P, Komschlies KL, Cippitelli M, Longo DL, Subleski J, Ye J, Sica A, Young HA, Wilttrout RH, Ochoa AC. Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *Journal of the National Cancer Institute* 87(19), 1478-1483, 1995.

Green LC, Luzuriaga KR, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young RV, Tannenbaum SR Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 78(12), 7764-7768, 1981.

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* 65(8), 687-689, 1999.

Guest I, & Uetrech J, Drugs toxic to the bone marrow that target the stromal cells.

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. *Journal of Pharmacological Sciences* 94(2), 177-184, 2004.

Hallett WHD, Murphy W. Positive and negative regulation of natural killer cells: therapeutic implications. *Seminars in Cancer Biology* 16, 367-382, 2006.

Handel-Fernandez ME, Cheng X, Herbert LM, Lopez DM. Down-regulation of IL-12, not a shift from a T helper-1 to a T helper-2 phenotype, is responsible for impaired IFN- γ production in mammary tumor-bearing mice. *The Journal of Immunology* 158, 280-286, 1997.

Hasegawa T, Matsuguchi T, Noda K, Tanaka K, Kumamoto S, Shoyama Y, Yoshikai Y. Toll-like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *International Immunopharmacology* 2(4), 579-589, 2002.

Hasegawa T, Yoshikai Y, Okuda M, Nomoto K. Accelerated restoration of the leukocyte number and augmented resistance against *Escherichia coli* in cyclophosphamide-treated rats orally administered with a hot water extract of *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Immunopharmacology* 12(8), 883-891, 1990.

Hauser SP, Kajkenova O, Lipschitz DA. The Pivotal Role of Interleukin 6 in Formation and Function of Hematopoietically Active Murine Long-Term Bone Marrow Cultures Stem Cells 15, 125-132, 1997.

Hefeneider SH, Conlon PJ, Henney CS, Gillis S. In vivo interleukin 2 administration augments the generation of alloreactive cytolytic T lymphocytes and resident natural killer cells. *The Journal of Immunology* 130, 222-227, 1983.

Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 291, 335-338, 1981.

Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunology Today* 13(6), 198-200, 1992.

Huang M, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhanced peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *The Journal of Immunology* 157(12), 5512-5520, 1995.

Ibusuki K & Minamishima Y. Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infections. *Natural Immunity and Cell Growth Regulation* 9, 121-128, 1990.

Immunopharmacology 46 (2), 103-112, 2000.

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*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 25(3), 305-319, 2003.

- Kodama N, Harada N, Nanba H. A Polysaccharide, Extract From *Grifola frondosa*, Induces Th-1 Dominant Responses in Carcinoma-Bearing BALB/c Mice. Japanese Journal of Pharmacology 90, 357-360, 2002.
- Konishi F, Mitsuyama M, Okuda M, Tanaka K, Hasegawa T, Nomoto K. Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* against myelosuppression by 5-fluorouracil. Cancer Immunology, Immunotherapy 42, 268-274, 1996.
- Konishi F, Tanaka K, Kumamoto S, Hasegawa T, Okuda M, Yano I, Yoshikai Y, Nomoto K. Enhanced resistance against Escherichia coli infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice. Cancer Immunology, Immunotherapy 32(1), 1-7, 1990.
- Kovacs CJ, Evans MJ, Daly BM, Thomas-Patterson D, Johnke RM, Powell DS. Secondary cytokines interact in sequence with interleukin-1alpha (IL-1alpha) with or without macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) to further accelerate granulopoietic recovery in myelosuppressed animals. Journal of Interferon and Cytokine Research 17(8), 453-460, 1997.
- Kuribayashi K, Gillis S, Kern DE, Henney CS. Murine NK cell cultures: effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. The Journal of Immunology 126, 2321-2327, 1981.
- Kurland JL, Kincade PW & Moore MA. Regulation of B-lymphocyte clonal proliferation by stimulatory and inhibitory macrophage-derived factors. Journal of Experimental Medicine 146(5), 1420-1435, 1977.
- Kusmartsev S, Ruiz de Morales JMG, Rullas J, Danilets MG, Subiza JL. Sialoadhesin expression by bone marrow macrophages derived from Ehrlich-tumor-bearing mice. Cancer Immunology, Immunotherapy 48(9), 493-498, 1999.
- 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. Cellular Immunology 93(2), 250-264 1985.
- Laurent M, Lepoivre M, Tenu JP. Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. Biochemical Journal 314, 109-113, 1996.
- Lewis CE & McGee JO'D. The Macrophage. Oxford University Press, Oxford, U.K. 1992.
- Liu Y, Ka-yun Ng, Lillehei KO. Cell-mediated immunotherapy: a new approach to the treatment of malignant glioma. Câncer Control 10, 138-146, 2003.

- Malkovsky M, Loveland M, North M, Asherson G, Gao L, Ward, P, Fiers W. Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 325, 262-265, 1987.
- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today* 13(7), 265-270, 1992.
- Martin JHJ & Edwards SW. Changes in mechanisms of monocyte/macrophage-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. *Journal of Immunology* 150(8), 3478-3486, 1993.
- Marusic M. Immune mechanisms in Ehrlich ascites tumor growth in mice. *European Journal of Cancer* 15(1), 39-45, 1979.
- 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* 74(5), 573-579, 2003.
- Medina M, Velez D, Asenjo JA, Egea G, Real FX, Gil J, Subiza JL. Human Colon Adenocarcinomas Express a MUC1-associated Novel Carbohydrate epitope on core mucin glycans defined by a monoclonal antibody (A10) raised against murine ehrlich tumor cells. *Cancer Research* 59, 1061-1070, 1999.
- Mehrotra T, Donnelly RP, Wong S, Kanegane H, Geremew A, Mostowski HS, Furuke K, Siegel JP, Bloom ET. Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *The Journal of Immunology* 160, 2637-2644, 1998.
- Merchant RE, Rice CD, Young HF. Dietary *Chlorella pyrenoidosa* for patients with malignant glioma: effects on immunocompetence, quality of life, and survival. *Phytotherapy Research* 4, 220-231, 1990.
- Metcalf, D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science*, 229(4708), 16-22, 1985.
- Metcalf, D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 67(2), 257-267, 1986.
- Miranda MS, Sato S, Mancini-Filho J. Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* on special conditions. *Bollettino Chimico Farmaceutico* 140(3), 165-168, 2001.
- 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. *International Journal of Immunopharmacology* 22(11), 967-977, 2000.

Mizushima Y, Kashii T, Nakagawa K, Monno S, Yano S. Effects of granulocyte colony-stimulating factor, interleukin-1 alpha, and interleukin-6 on prolonged myelosuppression induced by nimustine hydrochloride in rats. *Journal of Immunotherapy* 12(2), 98-104, 1992.

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

Morimoto T, Nagatsu A, Murakami N, Sakakibara J, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A. Anti-tumor-promoting glyceroglycolipids from the green algae, *Chlorella vulgaris*. *Phytochemistry* 40, 1433-1437, 1995.

Muench MO, Schneider JG, Moore MA. Interactions among colony-stimulating factors, IL-1 beta, IL-6, and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells. *Experimental Hematology* 20(3), 339-349, 1992.

Murray HW. Interferon-gamma and host antimicrobial defense: Current and future clinical applications. *The American Journal of Medicine* 97, 459-467, 1994.

Nishikawa M, Chang BJ & Inoue M. Inducible NO synthase inhibits the growth of free tumor cells, but enhances the growth of solid tumors. *Carcinogenesis* 25(11), 2101-2105, 2004.

Noda K, Tanaka K, Yamada A, Ogata J, Tanaka H, Shoyama Y. Simple assay for antitumour immunoactive glycoprotein derived from *Chlorella vulgaris* strain CK22 using ELISA. *Phytotherapy Research* 16, 581-585, 2002.

Pace JL, Russel SW, Torres BA, Johnson HM, Gray PW. Recombinant mouse g interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *The Journal of Immunology* 130, 2011-2013, 1983.

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* 17(1), 43-54, 2003.

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. *Cellular Immunology* 93(2), 265-279, 1985.

Parhar RS & Lala PK. Prostaglandin E2-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 44, 474-484, 1988.

- Patchen ML, Fischer R, MacVittie TJ. Effects of combined administration of interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor on recovery from radiation-induced hemopoietic aplasia. *Experimental Hematology* 21(2), 338-344, 1993.
- Pelus LM & Bockman RS. Increased prostaglandin synthesis by macrophages from tumor-bearing mice. *Journal of Immunology* 123, 2118-2125, 1979.
- 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* 39, 391-395, 1982(b).
- 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. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 102(3), 235-244, 1982(a).
- Pick E & Keisare Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells culture. *Journal of Immunological Methods* 38, 161-170, 1980.
- Queiroz ML, Valadares MC, Bincoletto C, Dieamant GC. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 26(4), 511-525, 2004.
- Queiroz MLS, Rodrigues APO, Bincoletto C, Figueirêdo CAV, Malacrida SA. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Immunopharmacology* 3, 889-900, 2003.
- 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. *Journal of Ethnopharmacology* 117, 228-235, 2008.
- 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 factor. *Immunology* 114, 313-321, 2005.
- Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39, 603-613, 2001.
- 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. *Experimental Hematology* 27, 1757-1767, 1999.

- Russo M, Teixeira HC, Marcondes MCG, Barbuto JAM. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 22, 1271-1273, 1989.
- Sakai M, Fonseca ES, Dagli ML, Palermo-Neto J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Life Sciences* 78(16), 1777-1783, 2006.
- 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* 13(1), 29-32, 2004.
- Sayers TJ, Wiltout RH. Differing roles for interleukin 2 and interferon γ in the augmentation of mouse peritoneal natural killer cell activity in vivo. In *Natural Killer Cells and Host Defenses*; Ades EW, Lopez C, Eds.; S. Karger: AG, Basel, 1989; 88.
- Schepetkin IA & Quinn MT. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and
- Schultz RM, Pavlidis NA, Stylos WA, Chirigos MA. Regulation of macrophage tumoricidal function: a role for prostaglandins of the E series. *Science* 20(202), 320-321, 1978.
- Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Letters* 414, 1-6, 1997.
- 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* 74, 111-115, 2000.
- 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 Therapies* 6, 66-73, 2007.
- Shu YZ. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products* 61, 1053-1071, 1998.
- Souza-Queiroz J, Malacrida SA, Justo GZ, Queiroz MLS. Myelopoietic Response in Mice Exposed to Acute Cold/Restraint Stress: Modulation by *Chlorella vulgaris* Prophylactic Treatment. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 26(3), 455-467, 2004.
- Souza-Queiroz J, 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, Behavior, and Immunity* 22(7), 1056-1065, 2008.

Spooncer, E., et al. *Haemopoiesis: A practical approach*. New York: Molineux Oxford University Press, 1993. p. 56-73.

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

Stefanski HE, Mathur A. Decreased expression and function of V β 6⁺ and V β 14⁺ cells is associated with decreased Th1 cytokine production in mice with plasma cell tumors. *Tumori* 82(1), 22-26, 1996.

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

Subiza JL, Gil J, Rodriguez R, Ruiz de Morales JG, Vinuela JE & de la Concha EG. Tumor cytostasis mediated by a monoclonal IgM antibody promoting adhesion between macrophages and tumor cells. Evidence for a lectin-like behavior. *Journal of Immunology* 148(8), 2636-2642, 1992

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. *International Journal of Cancer* 44(2), 307-314, 1989.

Sugarman BJ, Aggarwal BB, Figari IS. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230(4728), 943-945, 1985.

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

Svedersky LP, Nedwin GE, Goeddel DV, Palladino MA Jr. Interferon- γ enhances induction of lymphotoxin in recombinant interleukin 2-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Immunology* 134, 1604-1608, 1985.

Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li X-F, Shimizu J, Fujiwara H, Hamaoka T. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *The Journal of Immunology* 146(3), 1077-1082, 1991.

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* 69(11), 2042-2050, 2005.

Tanaka K, Koga T, Konishi F, Nakamura M, Mitsuyama M, Himeno K, Nomoto K. Augmentation of host defense by unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. *Infection and Immunity* 53(2), 267-271, 1986.

Tanaka K, Tomita Y, Tsuruta M, Konishi F, Okuda M, Himeno K, Nomoto K. Oral administration of *Chlorella vulgaris* augments concomitant antitumor immunity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 12(2), 277-291, 1990.

Tanaka K, Yamada A, Noda K, Hasegawa T, Okuda M, Shoyama Y, Nomoto K. A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK22 shows antimetastatic immunopotential. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 45, 313-320, 1998.

Tanaka K, Yamada A, Noda K, Shoyama Y, Kubo C, Nomoto K. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. *Planta Medica* 63(2), 465-466, 1997.

Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J. Structure and expression of cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302, 305-310, 1983.

Teixeira AS, Araújo FA, Ferreira MA, Barcelos LS, Teixeira MM, Andrade SP. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. *Life Sciences* 78(14), 1637-1645, 2006.

therapeutic potential. *International Immunopharmacology* 6, 317– 333, 2006.

Tsavaris N, Kosmas C, Vadiaka M, Kanelopoulos P, Boulamatsis D. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *British Journal of Cancer* 87, 21-27, 2002.

Tsujimoto M, Yip YK, Vilcek J. Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *The Journal of Immunology* 136(7), 2441-2444, 1986.

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. *Journal of Immunology* 145(1), 397-403, 1990.

Vacek A, Rotkovská D, Bartonícková A. Radioprotection of hemopoiesis conferred by aqueous extract from chlorococcal algae (Ivastimul) administered to mice before irradiation. *Experimental Hematology* 18(3), 234-237, 1990.

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

Valadares M.C, Ramos AL, Rehmann FJK, Sweeney NJ, Strohfeldt K, Tacke M, Queiroz MLS. Antitumour activity of [1,2-di(cyclopentadienyl)-1,2-di(*p*-N,N-dimethylaminophenyl)-ethanediyl] titanium dichloride in xerografted Ehrlich's ascites tumour. *European Journal of Pharmacology* 534, 264-270, 2006 (b).

Valadares MC, Klein SI, Guaraldo AMA, Queiroz MLS. Enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumour. *European Journal of Pharmacology* 473, 191-196, 2003.

Valadares MC, Klein SI, Queiroz MLS. Titanocene modulation of cytokine imbalance induced by Ehrlich ascites tumour progression. *European Journal of Pharmacology* 503, 203-208, 2004.

Van Den Engh G & Bol S. The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin-treated mice. *Cell and Tissue Kinetics* 8(6), 579-587, 1975.

Verhoef MJ, Hilsden RJ, O'Beirne M. Complementary therapies and cancer care: an overview. *Patient Education and Counseling* 38(2), 93-100, 1999.

Vijayavel K, Anbuselvam C, Balasubramanian MP. Antioxidant effect of the marine alga *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Molecular Cellular Biochemistry* 303, 39-44, 2007.

Viñuela JE, Rodriguez R, Gil J, Coll J, DeConcha EG, Subiza JL. Antigen shedding vs. development of natural suppressor cells as mechanism of tumor escape in mice bearing ehrlich tumor. *International Journal of Cancer* 47(1), 86-91, 1991.

Wang JM, Colella S, Allavena P, Mantovani A. Chemotactic activity of human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Immunology* 60(3), 439-444, 1987.

Watson GA, Fu YX, Lopez DM. Splenic macrophages from tumor-bearing mice co-expressing MAC-1 and MAC-2 antigens exert immunoregulatory functions via two distinct mechanisms. *The Journal of Leukocyte Biology* 49(2), 126-138, 1991.

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

Wu LC, Ho JA, Shieh MC, Lu IW. Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4207–4212, 2005.

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 Journal of Immunology* 154, 2281-2290, 1995.

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

Young HA, Ortaldo JR. One-signal requirement for interferon- γ production by human large granular lymphocytes. *The Journal of Immunology* 139, 724-727, 1987.

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 Journal of Immunology* 159(2), 990-996, 1997.

Yssel H, De Wall Malefyt R, Roncarolo M, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, De Vries JE. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *The Journal of Immunology* 149(7), 2378-2384, 1992.