

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

**MARCO AURÉLIO LEONARDO
MARCIO FRANCO PEREIRA**

**EFEITO DA HEPARINA DE BAIXO PESO
MOLECULAR (HBPM) SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS EM ANIMAIS PORTADORES DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

**BAURU
2010**

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

**MARCO AURÉLIO LEONARDO
MARCIO FRANCO PEREIRA**

**EFEITO DA HEPARINA DE BAIXO PESO
MOLECULAR (HBPM) SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS EM ANIMAIS PORTADORES DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Centro de Ciências Biológicas e Profissões de
Saúde, sob orientação da Prof^a. Dra. Dulce
H.J.Constantino.

**BAURU
2010**

L5819e

Leonardo, Marco Aurélio

Efeito da heparina de baixo peso molecular (HBPM) sobre a resposta inflamatória e parâmetros hematológicos em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich / Marco Aurélio Leonardo, Marcio Franco Pereira -- 2010.

32f.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Jardim Constantino
Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Heparina de baixo peso molecular (HBPM). 2. Selectinas. 3. Análise hematológica. 4. Células tumorais. I. Pereira, Marcio Franco. II. Constantino, Dulce Helena Jardim. III. Título.

Dedicamos este trabalho a todos os nossos familiares e amigos que estiveram sempre presentes na nossa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos especialmente a Prof^a. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino pelo apoio e incentivo e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Agradecemos aos nossos familiares, colegas e amigos que confiaram e nos apoiaram para que nossos esforços fossem reconhecidos e a Deus, que nos deu força e coragem para seguir em frente.

“O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis”.

(Dale Carnegie)

RESUMO

Apesar de a heparina ser amplamente utilizada como agente anticoagulante, suas funções biológicas permanecem incertas. Além do papel de coagulação, esse sacarídeo parece modular respostas imunológicas e inflamatórias. Com o objetivo de avaliar-se o efeito da heparina de baixo peso molecular (HBPM) nos parâmetros hematológicos, seu envolvimento com as moléculas de adesão selectinas e quantificar o crescimento tumoral em animais portadores do tumor Ascítico de Hhrlich, realizou-se este trabalho em nível experimental. Foram utilizados 20 camundongos suíços, machos divididos em três grupos: Grupo ST (sem tumor) – tratados com solução fisiológica estéril; Grupo CF (com tumor tratados com solução fisiológica); Grupo CH (com tumor tratados com HBPM). Os animais foram acompanhados e tratados durante 10 dias. Decorrido esse prazo, os animais foram eutanasiados e através de punção cardíaca foram coletadas amostras de sangue em frascos contendo o anticoagulante EDTA e na sequência foi realizado a obtenção do lavado peritoneal para a contagem do número de células tumorais e mononucleares. Na análise hematológica se observou uma diminuição no número de eritrócitos e uma estabilidade das plaquetas, em relação aos leucócitos e segmentados notou-se um aumento no número dessas células, podendo estar relacionado à inflamação causada pelo tumor. Houve um aumento de células tumorais mostrando que a HBPM não influenciou na migração de neutrófilos e plaquetas que levam nutrientes para o tumor, mostrando sua baixa afinidade com essas células.

Palavras-chave: Heparina de baixo peso molecular (HBPM). Selectinas. Análise hematológica. Células tumorais.

ABSTRACT

Although heparin is widely used as an anticoagulant agent, its biological functions remain uncertain. Besides the role of coagulation, this saccharide appears to modulate immune and inflammatory responses. Aiming to evaluate the effect of low molecular weight heparin (LMWH) in hematological parameters, their involvement in adhesion molecules selectins and quantify tumor growth in animals with ascites tumor Ehrlich, realize this is work experimental level. We used 20 Swiss male mice divided into three groups: ST (without tumor) - treated with sterile saline, Group CF (with tumor treated with saline), Group CH (with tumor treated with LMWH). The animals were monitored and treated for 10 days. Thereafter, the animals were euthanized by cardiac puncture and blood samples were in bottles containing the anticoagulant EDTA and the sequence was performed to obtain the peritoneal fluid for counting the number of tumor cells and mononuclear cells. In blood analysis, there was a decrease in the number of erythrocytes and stability of platelets, for leukocyte-targeted and there has been an increase in the number of these cells may be related to inflammation caused by the tumor. There was an increase of tumor cells showing that LMWH did not influence the migration of neutrophils and platelets that carry nutrients to the tumor, showing its low affinity for these cells.

Keywords: low molecular weight heparin (LMWH). Selectins. Hematological analysis. Tumor cells.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	8
2 – OBJETIVOS.....	11
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4 – RESULTADOS.....	15
4.1 – RESUMO DOS RESULTADOS.....	23
5 – DISCUSSÃO.....	24
6 – CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS.....	29

1- INTRODUÇÃO

A heparina é um polissacarídeo obtido a partir de tecidos de animais, através da mucosa intestinal suína, sendo o segundo agente terapêutico natural mais utilizado no mundo, superado apenas pela insulina. Com a descoberta da heparina houve um grande avanço no campo da cirurgia cardíaca, sendo utilizada na circulação extra corpórea (CEC). A grande vantagem desse anticoagulante é que ele não produz anafilaxia ou alergias, tendo como efeito colateral mais importante a trombocitopenia, que raramente é letal (MELO et al, 2008).

Heparina não fracionada (HNF) é uma mistura heterogênea de moléculas compostas por cadeias de polissacarídeos que são utilizadas na fabricação da heparina de baixo peso molecular (HBPM) onde os fragmentos de HNF são obtidos por despolimerização química ou enzimática. A antitrombina III é ativada pela ação desses anticoagulantes (HNF e HBPM) (MACIEL, 2002).

“O interesse pelas HBPM, como agente antitrombóticos, cresceu a partir do estudo de Johnson em 1976. Neste estudo observou-se que os níveis de atividade anti fator Xa no plasma dos pacientes que haviam recebido HBPM, eram 4 vezes maiores comparado aos que receberam a heparina não fracionada. Em outros estudos também ficou demonstrado que as complicações hemorrágicas eram pouco frequentes, às custas de uma menor inibição da função plaquetária pela HBPM. Por último, a biodisponibilidade e a vida média destas heparinas seria maior, o que permitiria uma única aplicação diária para se obter uma boa tromboprolifaxia” (SILVEIRA et al, 2001).

Este mucopolissacarídeo é produzido pelos mastócitos, e o aumento na velocidade de formação de complexos que envolvem a antitrombina III e vários fatores de coagulação ocorrem pela sua atividade anticoagulante. “Estudos realizados, por Saliba et al. (1978), utilizando a heparina em queimaduras térmicas e infarto do miocárdio, constataram duas funções: anticoagulante e antiinflamatória. Esse papel é dependente do pH do meio, de sua concentração sérica e de sua origem. Em meio ácido e em grandes doses, a heparina pode ligar-se a diferentes mediadores químicos, promovendo reações de neutralização, inativação ou combinação. Alguns estudos, utilizando oligossacarídeos de heparina sem atividade anticoagulante mostraram que os polimorfonucleares são bloqueados em presença de peritonite. Essa inibição depende da combinação da heparina com receptores leucocitários e plaquetários. As proteínas também podem sofrer ação da heparina em suas atividades, como no crescimento celular, fatores angiogênicos e componentes do complemento. Ela também

modifica a função plaquetária, a proliferação fibroblástica e a regeneração de células musculares lisas e endoteliais vasculares (ALMEIDA et al, 1996).

A família das selectinas é composta pelas proteínas ELAM-1 (E-selectina; CD62E) presente nas células endoteliais, LAM-1 (L-selectina; CD62L) presente nos linfócitos e GMP-140 (P-selectina; CD62P) presente nos grânulos alfa das plaquetas e nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais. Atuam como receptores de superfície capazes de mediar a interação entre plaquetas ativadas e células endoteliais com neutrófilos e monócitos. Alguns carboidratos da membrana, como a fucose e o ácido siálico se ligam a P-selectina. Apresenta grupamento carboxila intracitoplasmático e é composta por nove repetições de proteínas homólogas à proteínas reguladoras do sistema complemento, uma porção similar ao fator de crescimento epidérmico e uma porção terminal com cerca de 100 aminoácidos contendo o sítio de adesão. Nas plaquetas não ativadas, a P-selectina está localizada na membrana dos grânulos alfa e, após a ativação, passa a ser expressa na membrana plaquetária. Estima-se que haja cerca de 10 mil sítios de ligação da P-selectina na superfície das plaquetas ativadas (LANDI e MARQUES JUNIOR, 2003).

Quando a superfície do endotélio é estimulado por citocinas inflamatórias (interleucinas 1 e 10) as moléculas de E-selectina e P-selectina são expressas promovendo a adesão do leucócito ao endotélio. “O papel destas moléculas na história natural do câncer não é completamente esclarecido, mas acredita-se que desempenhe função fundamental no processo de disseminação por via hematogênica do tumor, promovendo a adesão da célula neoplásica ao endotélio”. Pacientes com câncer apresentam maior concentração de P-selectina, pois sua interação com células neoplásicas promove a adesão de células tumorais circulantes mediando a disseminação tumoral por via hematogênica, suprindo o tumor com fatores de crescimento e substâncias mitogênicas. A P-selectina também está presente em pacientes com diabetes, hipertensão, tabagismo e hipercolesterolemia e pode ser um fator de alerta para um evento cardiovascular adverso (NASTRI et al, 2008).

“Em organismos multicelulares, o controle da proliferação celular ocorre em parte pela modulação do processo diferenciação. Em células normais o progresso em direção à diferenciação terminal conclui a proliferação celular, enquanto que em células neoplásicas o bloqueio no processo de diferenciação constitui possível causa da proliferação celular desordenada. Von Wangenheim e Peterson propõem que o progresso da diferenciação depende do aumento da razão entre a divisão mitocondrial (atividade potencializadora) e a divisão nuclear (atividade antagonizadora) (VON WANGENHEIM E PETERSON, 1998). Essa razão é baixa em células embriônicas e células tronco, devido ao seu baixo conteúdo

mitocondrial. Assim a taxa de multiplicação mitocondrial controlaria o processo de diferenciação e sofreria regulação através de sinais extracelulares. Mutações em genes que codificam proteínas mitocondriais, são prováveis causadoras de diminuição na taxa de multiplicação mitocondrial, levando ao bloqueio na diferenciação e à predisposição ao crescimento tumoral”(LIMA et al, 2009).

Quando células normais, que desempenham suas funções corretamente, sofrem mutações, começam a crescer de forma desordenada. Isso tem como consequência não só a multiplicação desordenada da célula, mas também da progressiva resistência à morte celular fazendo com que essas células ultrapassem o limite dos tecidos de origem e modifiquem o ambiente que as cerca podendo migrar para diversos tecidos do corpo formando novos tumores (metástase).

Algumas substâncias têm sua quantidade muito aumentada quando existe um tumor e outras são modificadas na presença dele. Existem diversas explicações para a chamada ‘quimiorresistência’, uma delas é que essa resistência está na própria natureza da doença onde no decorrer do desenvolvimento (entre 10 e 20 anos antes do diagnóstico clínico) as células tumorais vão sendo selecionadas pela capacidade de sobrevivência em um ambiente frequentemente desfavoráveis. Por isso, alguns medicamentos podem até combater certas células tumorais mas, se tiver uma resistente a ele o tumor volta a aparecer com células selecionadas para suportar os efeitos do medicamento.

Em um tumor encontramos diferentes tipos de células que são geneticamente alteradas. Alguns tumores malignos, por exemplo, são formados por células normais que rodeiam um outro tipo de tumor.

“Entre as células normais presentes na massa tumoral estão as que integram a parede de vasos sanguíneos, fundamentais para levar nutrientes e oxigênio aos tecidos, inclusive ao tumor. O câncer só expande em níveis detectáveis clinicamente se houver a formação de vasos, processo chamado de angiogênese. A capacidade de induzir e sustentar o processo de angiogênese é outra característica essencial da célula cancerosa” (OTAKE et al, 2006).

Em função das inúmeras variáveis relacionadas ao crescimento neoplásico e a alta incidência, muitos estudos são realizados com a função de esclarecer esta interação entre as neoplasias e o organismo. Modelos experimentais, como o tumor de Ehrlich, são largamente empregados nestas investigações. O tumor de Ehrlich é um tumor transplantável murino, isolado por Paul Ehrlich em 1905 (EHRlich, 1905) e transplantado com sucesso para a cavidade peritoneal (EHRlich e APOLLANT, 1932) e mantido até os dias atuais por repiques semanais.

Neste estudo pretendemos avaliar o tratamento com heparina de baixo peso molecular (HBPM) em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich, uma vez que a heparina é um inibidor de moléculas de adesão da família das selectinas. Essas moléculas de adesão são essenciais tanto à participação de células de defesa na resposta antitumor quanto à ligação de células tumorais aos vasos sanguíneos e produção de metástases.

Em vista dos fatos relatados concluímos ser de extrema relevância esclarecer a participação das selectinas neste tumor assim como a repercussão do tratamento com heparina sobre a resposta de defesa e parâmetros hematológicos.

2- OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo principal esclarecer os efeitos do tratamento com Heparina de baixo peso molecular (HBPM) sobre parâmetros hematológicos em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar quantitativamente e qualitativamente hemácias, leucócitos e plaquetas em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados ou não com HBPM
- Quantificar o crescimento tumoral frente ao tratamento com HBPM.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Para o desenvolvimento deste estudo 20 animais foram inoculados com 10^4 células tumorais por via intraperitoneal (ip) e distribuídos em três grupos, e o seu tratamento foi iniciado vinte e quatro horas após o implante tumoral. Um grupo controle sem tumor foi tratado com solução fisiológica estéril (0,1 mL por via intraperitoneal), uma vez ao dia; um grupo inoculado com o tumor foi tratado com solução fisiológica estéril (0,1 mL por via intraperitoneal) uma vez ao dia; um grupo teste foi tratado com heparina de baixo peso molecular (HBPM) na concentração de 5 U/mL (0,1mL, via ip, 1 vez ao dia). Decorridos dez dias após o início do tratamento, os três grupos de animais, totalizando 20, foram eutanasiados com dose letal de Ketamina e Xylasina. Na sequência, foi obtido o lavado peritoneal para a contagem do número de células tumorais, células mononucleares e avaliação hematológica.

Animais

Foram utilizados camundongos suíços, machos, com idade entre 30 e 45 dias, procedentes do Biotério da Universidade Sagrado Coração. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno e distribuídos em três grupos. Os animais foram tratados com ingestão de água e ração específica para camundongos, em condições controladas de luz e temperatura.

Neoplasia

Foram implantadas 10^4 células tumorais por animal, por via intraperitoneal, com auxílio de seringa hipodérmica. A determinação do número de células neoplásicas inoculadas por animal foi realizada através de contagem em câmara de Neubauer, empregando-se apenas as suspensões onde a viabilidade celular foi superior a 95% (teste de exclusão do Azul Trypan) (EHRLICH, 1905).

Implante tumoral

Após a obtenção das células tumorais, foi estabelecida a concentração de 10^3 /ml e cada animal foi inoculado por via intraperitoneal com volume de 0,1ml da suspensão.

Tratamento

Os animais do grupo controle, sem tumor e com tumor, foram tratados com solução fisiológica, os do grupo teste com HBPM (0,1mL, 1x/dia, via ip). O tratamento foi iniciado após 48h do inóculo tumoral.

Eutanásia

Os animais foram eutanasiados com dose letal de Ketamina e Xylasina (0,2 mL/animal) por via intraperitoneal.

Obtenção do lavado peritoneal

Com auxílio de seringa descartável foram inoculados 3ml de solução fisiológica na cavidade peritoneal. O abdome do animal foi massageado e posteriormente foi realizada uma incisão no abdome com o objetivo de se introduzir uma pipeta Pasteur e recolher o lavado peritoneal. Todo este procedimento foi realizado após o sacrifício do animal.

Contagem de células tumorais e mononucleares

Após a remoção do lavado peritoneal, a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:100, uma alíquota de 0,5ml foi separada. A esta alíquota foi adicionado um volume de 0,05ml do corante Cristal Violeta. Posteriormente as células tumorais e mononucleares foram contadas em câmara de Neubauer.

Avaliação hematológica: série branca e série vermelha

Através de punção cardíaca foi coletada uma amostra de 3 mL de sangue em frasco contendo o anticoagulante EDTA. Os frascos foram encaminhados em seguida para o laboratório de análises clínicas onde foi realizada a avaliação hematológica: plaquetas, hemácias e leucócitos.

Análise estatística

Primeiramente foi empregado o teste de normalidade de Komogorov-Smirnov, no sentido de certificar-se se as variáveis estavam normalmente distribuídas. Posteriormente, o teste de hipótese t de Student no modo pareado e de médias independentes, no sentido de analisar comparativamente os valores médios do número de células tumorais, leucócitos, hemácias e plaquetas. No estudo estatístico observaremos um nível de significância $p < 0,05$. Os dados obtidos foram avaliados com auxílio do software Sigma Stat versão 3.1 (Jandel Scientific).

4- RESULTADOS

Neste trabalho tivemos como principal objetivo verificar o número total de células, assim como o número de células tumorais. Para tanto camundongos suíços foram tratados com heparina de baixo peso molecular, na concentração de 0,1mL por dia via ip e solução fisiológica, na mesma concentração, via ip.

Um dos parâmetros avaliados neste estudo foi o efeito da HBPM sobre o número de eritrócitos. Constatou-se que no grupo portador de tumor não tratado com HBPM houve uma redução significativa nestas células enquanto que o grupo portador de tumor tratado com HBPM não apresentou alterações significativas neste parâmetro. Estes dados se encontram demonstrados na tabela 1 e gráfico 1.

Tabela 1. Efeito do tratamento com HBPM sobre o número de eritrócitos em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

GRUPOS ^a	N ^o DE ERITRÓCITOS (x10 ⁵)
ST	4,68 ± 2,6 ^{b,c}
CF	4,28 ± 2,1 [*]
CH	4,37 ± 3,1

a- ST= sem tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CF= com tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CH= com tumor, tratado com HBPM (5 U/mL, 0,1mL, ip, 1x/dia);

b- resultados expressos em média ± desvio padrão;

n- 6 a 7 animais por grupo;

* P<0,005 na comparação com o grupo não portador de tumor.

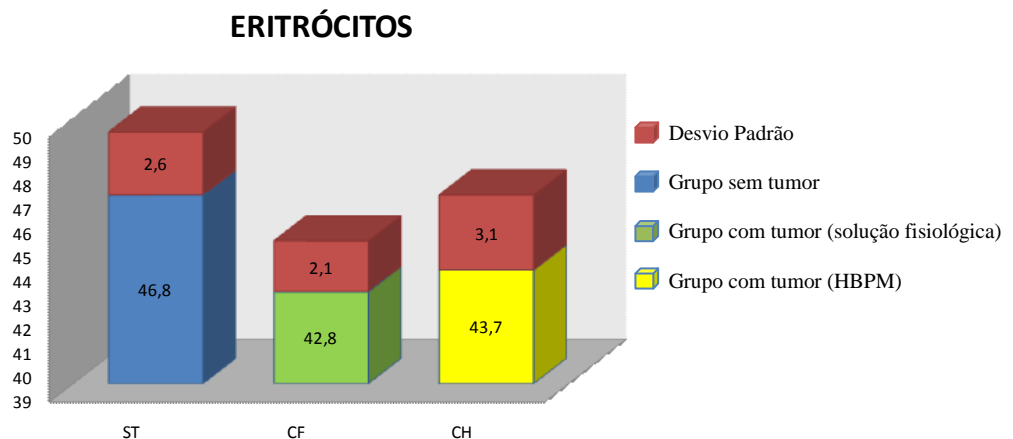


Gráfico 1. Efeito do tratamento com HBPM sobre o número de eritrócitos em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Ao analisar a quantidade de plaquetas presentes nos grupos, usados neste trabalho, não observamos diferenças consideráveis. Estes dados se encontram demonstrados na tabela 2 e gráfico 2.

Tabela 2. Quantidade de plaquetas após o tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

GRUPOS ^a	N ^o DE PLAQUETAS (/mL)
ST	1258,7 ± 280,1 ^{b, c}
CF	1261,0 ± 124,4
CH	1355,8 ± 121,5

a- ST= sem tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CF= com tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CH= com tumor, tratado com HBPM (5 U/mL, 0,1mL, ip, 1x/dia);
 b- resultados expressos em média ± desvio padrão;
 n- 6 a 7 animais por grupo.

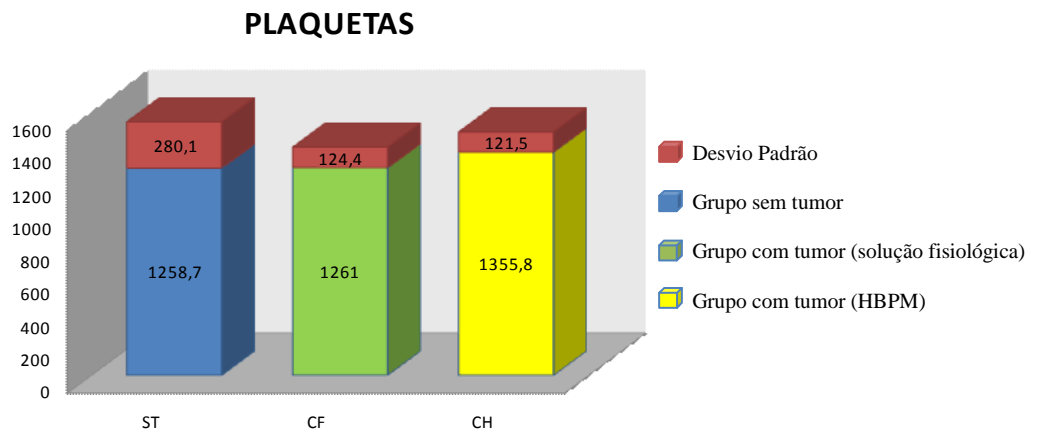


Gráfico 2. Quantidade de plaquetas após o tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Verificamos que o número de leucócitos presentes no grupo tratado com HBPM tiveram um aumento, mas considerado dentro do normal. Estes dados se encontram demonstrados na tabela 3 e gráfico 3.

Tabela 3. Numero de leucócitos após tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

GRUPOS ^a	N ^o DE LEUCÓCITOS(x10 ⁵)
ST	2850,0 ± 1042,6 ^{b, c}
CF	3050,0 ± 1473,4
CH	4316,7 ± 1574,1

a- ST= sem tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CF= com tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CH= com tumor, tratado com HBPM (5 U/mL, 0,1mL, ip, 1x/dia);
b- resultados expressos em média ± desvio padrão;
n- 6 a 7 animais por grupo.

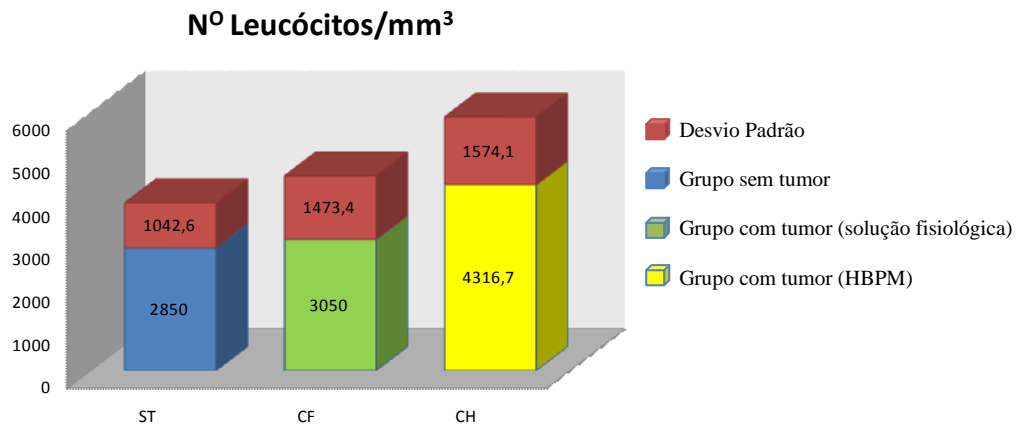


Gráfico 3. Numero de leucócitos após tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Tabela 4. Quantidade de bastonetes após o tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

GRUPOS ^a	N ^o DE BASTONETES(x10 ⁵)
ST	0,3 ± 0,6 ^{b, c}
CF	0,0 ± 0,0
CH	0,0 ± 0,0

a- ST= sem tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CF= com tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CH= com tumor, tratado com HBPM (5 U/mL, 0,1mL, ip, 1x/dia);
b- resultados expressos em média ± desvio padrão;
n- 6 a 7 animais por grupo.

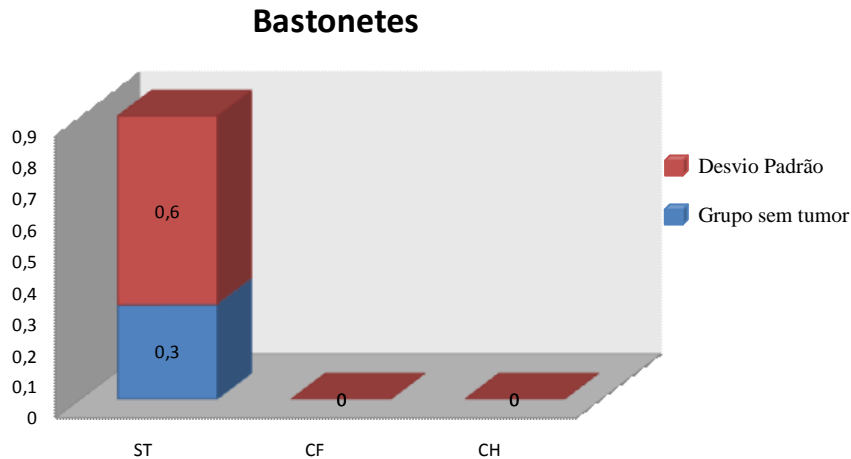


Gráfico 4. Quantidade de bastonetes após o tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Estudando o grupo portador de tumor tratado com HBPM notamos um aumento na quantidade de segmentados enquanto que o grupo não portador de tumor tratado com solução fisiológica não apresentou alteração neste parâmetro. Estes dados se encontram demonstrados na tabela 5 e gráfico 5.

Tabela 5. Número de segmentados após tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

GRUPOS ^a	N ^o DE SEGMENTADOS (x10 ⁵)
ST	28,0 ± 5,6 ^{b, c}
CF	31,2 ± 12,2
CH	51,2 ± 17,7 [#]

a- ST= sem tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CF= com tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CH= com tumor, tratado com HBPM (5 U/mL, 0,1mL, ip, 1x/dia);

b- resultados expressos em média ± desvio padrão;

n- 6 a 7 animais por grupo;

P<0,005 na comparação com o grupo não portador de tumor.

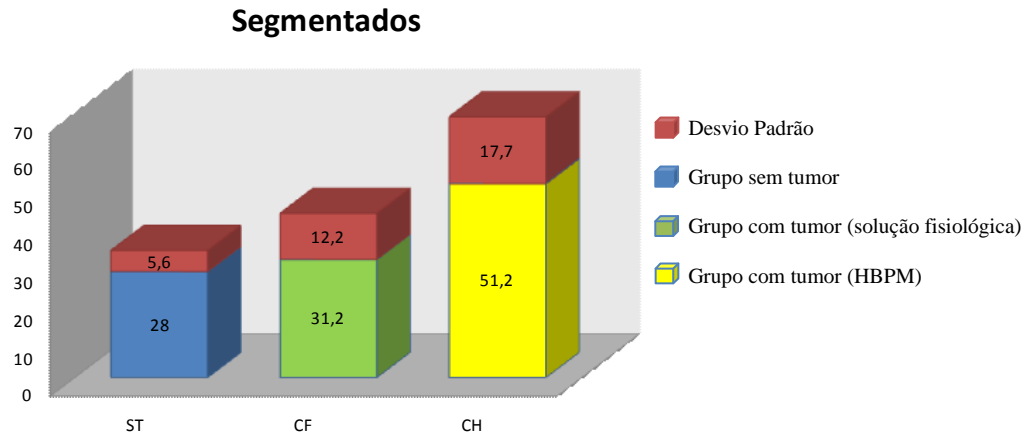


Gráfico 5. Número de segmentados após tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Em relação a quantidade de eosinófilos presentes nos animais, após o tratamento com HBPM, não foi observado alterações consideráveis. Estes dados se encontram demonstrados na tabela 6 e gráfico 6.

Tabela 6. Efeito do tratamento de HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

GRUPOS ^a	N ^o DE EOSINÓFILOS(x10 ⁵)
ST	1,3 ± 0,6 ^{b, c}
CF	0,7 ± 0,8
CH	0,5 ± 0,6

a- ST= sem tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CF= com tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CH= com tumor, tratado com HBPM (5 U/mL, 0,1mL, ip, 1x/dia);

b- resultados expressos em média ± desvio padrão;

n- 6 a 7 animais por grupo.

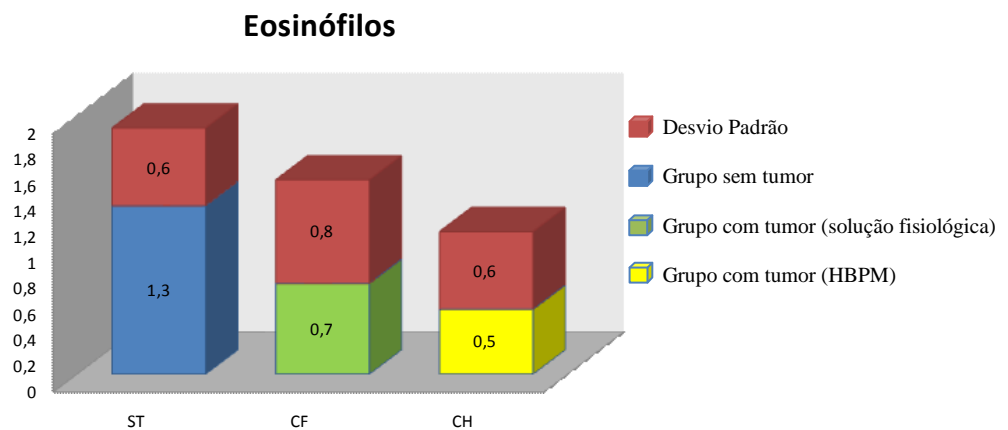


Gráfico 6. Efeito do tratamento de HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Constatou-se que no grupo portador de tumor tratado com HBPM houve uma redução significativa de linfócitos enquanto que o grupo portador de tumor e o grupo sem tumor tratados com solução fisiológica não apresentaram alterações neste parâmetro. Estes dados se encontram demonstrados na tabela 7 e gráfico 7.

Tabela 7. Número de linfócitos após tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

GRUPOS ^a	N ^o DE LINFÓCITOS(x10 ⁵)
ST	69,3 ± 4,2 ^{b, c}
CF	61,2 ± 12,1
CH	47,7 ± 17,7

a- ST= sem tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CF= com tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CH= com tumor, tratado com HBPM (5 U/mL, 0,1mL, ip, 1x/dia);
b- resultados expressos em média ± desvio padrão;
n- 6 a 7 animais por grupo.

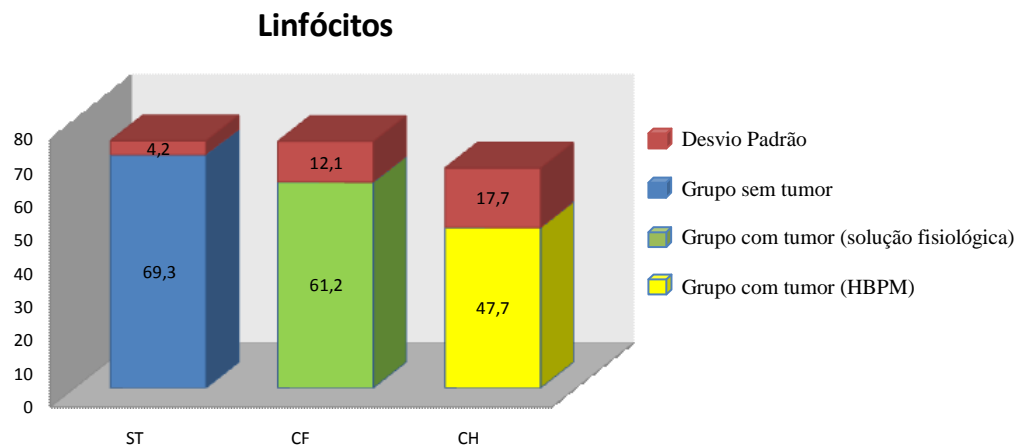


Gráfico 7. Número de linfócitos após tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Tabela 8. Quantidade de monócitos após o tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

GRUPOS ^a	N ^o DE MONÓCITOS(x10 ⁵)
ST	1,3 ± 0,6 ^{b, c}
CF	1,3 ± 0,8
CH	1,3 ± 0,8

a- ST= sem tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CF= com tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CH= com tumor, tratado com HBPM (5 U/mL, 0,1mL, ip, 1x/dia);

b- resultados expressos em média ± desvio padrão;

n- 6 a 7 animais por grupo.

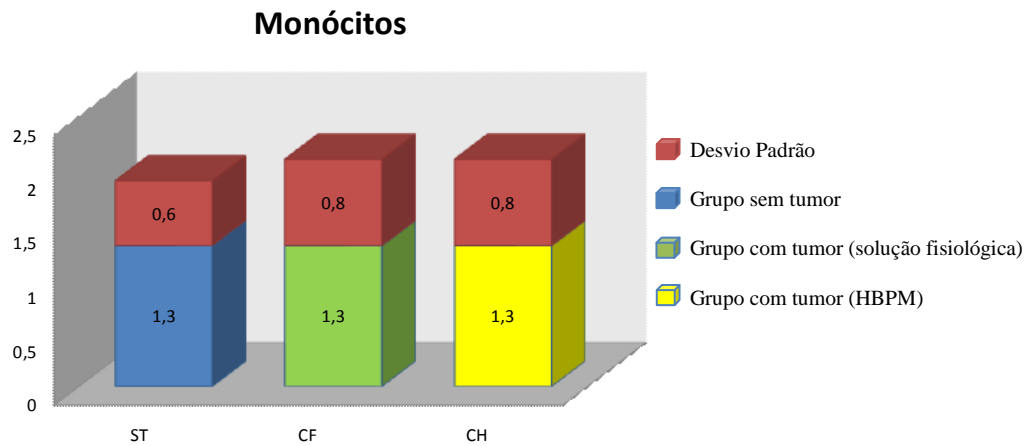


Gráfico 8. Quantidade de monócitos após o tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

O numero de células tumorais, presentes após os dez dias de tratamento nos grupos inoculados, estão expressos na tabela 9 e gráfico 9:

GRUPOS ^a	MÉDIA
CF	11,42 x 10 ⁶
CH	23 x 10 ⁶

a- CF= com tumor, tratado com solução fisiológica (0,1mL, ip, 1x/dia); CH= com tumor, tratado com HBPM (5 U/mL, 0,1mL, ip, 1x/dia);

n- 6 a 7 animais por grupo.

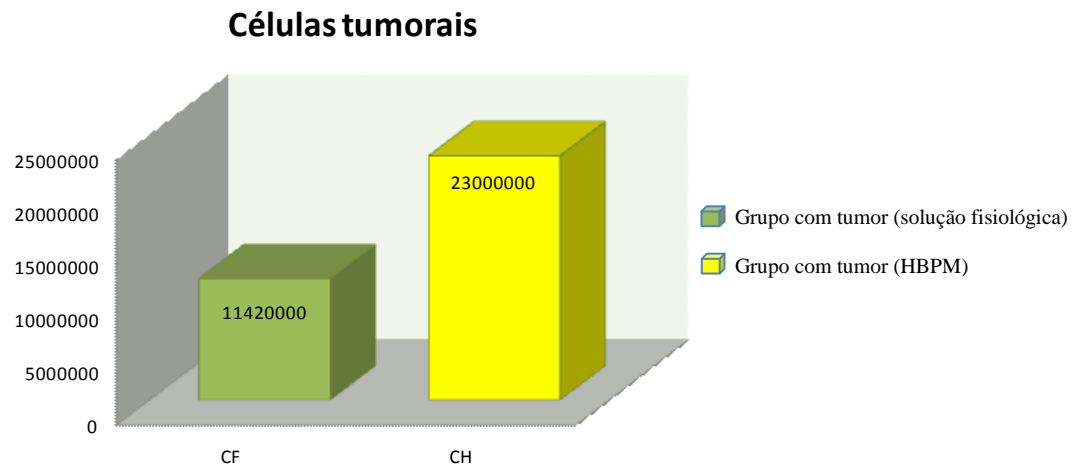
















Gráfico 9. Numero de células tumorais, presentes após os dez dias de tratamento nos grupos inoculados.

4.1- RESUMO DOS RESULTADOS

PARÂMETRO

	TRATAMENTO	
	GRUPO SEM TUMOR TRATADO COM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA	GRUPO COM TUMOR TRATADO COM HBPM
ERITRÓCITOS		
PLAQUETAS		
LEUCÓCITOS		
SEGMENTADOS		
EOSINÓFILOS		
LINFÓCITOS		
MONÓCITOS		

RESUMO DA MÉDIA DE CÉLULAS TUMORAIS

TRATAMENTO	
GRUPO COM TUMOR TRATADO COM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA	GRUPO COM TUMOR TRATADO COM HBPM
	

5 – DISCUSSÃO

Neste estudo constatou-se que o tratamento com a heparina de baixo peso molecular promoveu um aumento das células tumorais presentes no lavado peritoneal. O controle do crescimento tumoral é realizado através de uma resposta imune adaptativa e esta envolve a participação principal de linfócitos natural killer (NK) e T citotóxicos. Entre as células envolvidas diretamente na resposta antitumor, encontram-se macrófagos, linfócitos e células naturais killer (NK). Macrófagos ativados no tecido tumoral podem apresentar elevada capacidade fagocitária e produzem uma grande variedade de citocinas e mediadores químicos como a interleucina 1 α (IL-1 α), interleucina 12 (IL-12), interferon γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e derivados do metabolismo do ácido araquidônico, entre outros. Nestes macrófagos citolíticos ativos, a expressão de moléculas do MHC de classe II está aumentada, assim como a produção da molécula co-estimulatória CD86 (ALLI RS et al, 2004).

Alguns desses mediadores produzidos por macrófagos, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos apresentam atividade biológica variada e, em alguns casos, a ação do mediador resulta num efeito pró-tumor, induzindo a angiogênese e favorecendo o crescimento tumoral (LEEK RD et al, 1994).

O grau de comprometimento da resposta imune é extremamente variável entre neoplasias. Em tumores de ovário e mama há falha na ativação de linfócitos CD4+ e CD8+, fato atribuído principalmente à inibição na ação de células apresentadoras de antígenos (APC). A fusão de células dendríticas com células tumorais produz células filhas capazes de apresentar antígenos e, com uma boa carga de antígenos tumorais, que estimulam linfócitos CD4+ e CD8+ “in vitro” (Koido S et al, 2004), e “in vivo” (AVIGAN D et al, 2004), sendo este um grande avanço para futuro emprego no tratamento de neoplasias que apresentam falhas na função APC. No adenocarcinoma de próstata, à medida que o tumor evolui, observa-se uma relação inversa com o número de macrófagos infiltrando os tecidos tumorais e o desenvolvimento neoplásico (SHIMURA S et al, 2000).

Estudo realizado “in vitro”, demonstrou que macrófagos apresentam papéis distintos frente a estímulos variados, isto é, sua atividade não é estereotipada e sim especificamente adaptada ao estímulo agressor. O perfil de citocinas e mediadores químicos produzidos por macrófagos difere entre macrófagos incubados com células tumorais apoptóticas (produzem interleucina 10 – IL-10 e fator transformador do crescimento – TGF- β) e com células tumorais mortas por mecanismos não apoptóticos (neste caso produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α e TNF- α) (GOUGH MJ et al, 2001).

Estes dados indicam que macrófagos são responsáveis por direcionar a resposta imune e que sua inibição ou a diminuição no recrutamento destas células são eventos diretamente relacionados ao escape do crescimento tumoral.

Na resposta imune ao crescimento neoplásico, as citocinas que teriam um papel importante no controle do crescimento de tumores, ativariam um perfil de resposta imune, padrão TH1, com produção de interleucina 12 (IL-12), a qual são atribuídos ativação de células NK e estímulo à produção de IFN- γ (BAXEVANIS CN et al, 2000). Estudo recente comprova este efeito através da administração de IL-12, porém, a administração repetida produz um efeito inverso, estimulando a produção de IL-10, uma citocina inibitória de linfócitos padrão Th1. A subpopulação de linfócitos padrão Th1 ativam linfócitos T citotóxicos (Tc), células NK e células killer (K), as quais são responsáveis pela lise de células tumorais e, portanto, sua inibição resulta na progressão acelerada do crescimento neoplásico (PORTIELJE JEA et al, 2003).

Há um limite muito estreito no balanço entre as populações de linfócitos TH1 e TH2 durante o desenvolvimento neoplásico, sendo que o desequilíbrio entre essas populações permite o crescimento de neoplasias, uma vez que a resposta imune celular capaz de controlar o crescimento tumoral é substituída por uma resposta imune humoral (SHEU BC et al, 1999).

Em relação à atividade de linfócitos CD4+ e CD8+, demonstrou-se que em câncer de ovário, à medida que o tumor evolui, linfócitos CD3+ passam a expressar RNAm para citocinas inibitórias do perfil TH1, como a IL-10 e o TGF- β ; enquanto células CD4+ e CD8+ expressam RNAm para IFN- γ , este último conhecido pelo seu potente efeito imunomodulador relacionado à inibição do crescimento neoplásico e à indução de apoptose em células tumorais (ELSÄSSER-BEILE U et al, 1999; WALL L et al, 2003).

Em pacientes portadoras de câncer de mama, submetidas à quimioterapia convencional, foi apresentado como um dos efeitos colaterais do tratamento, a redução no número de linfócitos CD4+ e CD8+, sendo este evento relacionado à recidiva da doença. Quando é feita a reinfusão destas células, em associação com fator estimulador de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CSF), há uma restauração para números normais das populações CD4+ e CD8+ em circulação. O GM-CSF atua não diretamente sobre a população CD4+, mas induzindo à proliferação e ativação de células APC, e estas, por sua vez, ativariam e aumentariam a sobrevivência de linfócitos CD4+. Este tratamento aumentou o tempo de sobrevivência sem recidivas para um período médio de 21 meses (GAST GC et al, 2002). Além disso, em portadores de carcinoma cólon retal, observa-se uma relação positiva entre o número de macrófagos e células CD8+ e a taxa de sobrevivência dos pacientes (FUNADA

Y et al, 2003).

A análise da subpopulação CD8+ em pacientes portadores de câncer de pulmão revelou que o microambiente tumoral induz a alterações na população CD8+, reduzindo o número de células efetoras e depleção de perforina, indicando uma falha na função efetora. Outro fato constatado, foi que linfócitos CD8+ virgens expressam a molécula Fas em condições anormais, sendo que a superexpressão desta molécula estaria relacionada à indução de apoptose nestas células (PRADO-GARGIA H et al, 2005).

A ativação da subpopulação CD8+ é dependente de linfócitos CD4+, e a manutenção da vigilância imunológica após a ressecção dos tumores está implicada na cura, ou não, do paciente. Em várias neoplasias, o escape tumoral também pode ser decorrente de falhas na função de linfócitos CD4+, comprometendo a ativação de linfócitos CD8+, sendo um melhor prognóstico associado à infiltração tumoral por estas duas subpopulações de linfócitos (ALI AA et al, 2004; MELIEF CJ et al, 2000).

Outro ponto a se destacar é que a função efetora e o potencial de proliferação de linfócitos CD8+ são eventos isolados no programa de diferenciação destas células (HERNANDEZ J et al, 2002).

Nos resultados obtidos na análise hematológica observamos que o efeito da HBPM não influenciou a quantidade de plaquetas, no período de dez dias do tratamento, porém embora não haja alteração numérica não podemos descartar uma possível alteração funcional. Os defeitos funcionais das plaquetas podem ser congênitos, causados por mutações em genes específicos, ou podem ser adquiridos, em consequência de ação de drogas ou em estados patológicos que causam ativação das plaquetas (NURDEN AT et al, 1999). Os defeitos qualitativos adquiridos das plaquetas são inúmeros, sendo mais frequentes aqueles causados por medicamentos, entre os quais a aspirina droga mais frequente. Algumas doenças sistêmicas causam defeitos funcionais das plaquetas, como coagulação vascular disseminada, circulação extracorpórea, hepatopatia, doença aterosclerótica, anemia falciforme, hemangiomas, doenças mieloproliferativas crônicas, paraproteinemias, aneurisma de aorta e uremia (PATROCÍNIO LG et al, 2005). A quantidade de leucócitos, observados nos resultados, aumentou, causa da inflamação proporcionada pelo tumor. Em relação ao diferencial hematológico nota-se um súbito aumento de neutrófilos segmentados (neutrofilia), observando no mesmo a diminuição no número de linfócitos (linfopenia) seguido de ausência de eosinófilos. Em relação ao número de eritrócitos notamos uma redução numérica de eritrócitos não acompanhada de alterações morfológicas (eritrócitos normocíticos e normocrômicos).

Em neoplasias mamárias humanas, nota-se que as moléculas de adesão P-selectina e E-selectina são associadas com estágios avançados de neoplasias e presença de células tumorais circulantes. Sabe-se que a molécula P-selectina está relacionada à disseminação neoplásica, pois promove a adesão de células tumorais circulantes através da via hematogênica e, em plaquetas ativadas, supre o tumor com fatores de crescimento e substâncias mitogênicas (NASTRI et al, 2008).

6 – CONCLUSÃO

- O tratamento com HBPM reduziu significativamente o número de eritrócitos sem produzir alterações morfológicas nos mesmos;
- Constatou-se que a HBPM aumentou o número de leucócitos e que este aumento foi relacionado ao número de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, por outro lado produziu uma redução no número de eosinófilos e basófilos;
- Com relação ao crescimento tumoral o tratamento com HBPM em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich promoveu crescimento tumoral significativo;
- Estudos adicionais são necessários para esclarecer o estado de ativação leucocitária e os dados relacionados a redução do número de eritrócitos e a relação entre a HBPM e a resposta imunitária.

REFERÊNCIAS

Alli RS, Khar A. Interleukin-12 secreted by mature dendritic cells mediates activation of NK cell function. *FEBS Letters* 2004; 1-6;

Avigan D, Vasir B, Gong J, et al. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4699-708;

Ali AA, McMillan DC, Matalka II, McNicol AM, McArdle CS. Tumor T-lymphocyte subset infiltration and tumor recurrence following curative resection for colorectal cancer. *EJSO* 2004; 30:292-95;

Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Gritzapis AD, Sotiriadou R, Papamichail M. Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol* 2000; 164:3902-12;

Elsässer-Beile U, Grussenmeyer T, Gierschemer D, Schmoll B, Schultze-Seemann W, Wetterauer U, Mönning JS. Semi quantitative analysis of Th1 and Th2 cytokine expression in CD3+, CD4+ and CD8+ renal-cell-carcinoma-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48:204-08;

Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, Gabbert HE. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncology Reports* 2003; 10:309-13;

Gast GC, Vyth-Dreese FA, Nooijen W, et al. Reinfusion of autologous lymphocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces rapid recovery of CD4+ and CD8+

T cells after high-dose chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:58-64.

Gough MJ, Melcher AA, Ahmed A, et al. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res* 2001; 61:7240-47;

Hernandez J, Aung S, Marquardt K, Sherman L. Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8+ T cells responding to self-antigens. *J Exp Med* 2002; 196:323-33;

Hernandez J, Aung S, Marquardt K, Sherman L. Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8+ T cells responding to self-antigens. *J Exp Med* 2002; 196:323-33.

Koido S, Ohana M, Liu C, Nikrui N, Durfee J, Lerner A, Gong J. Dendritic cells fused with human cancer cells: morphology, antigen expression, and T cell stimulation. *Clinical Immunology* 2004; 113:261-69;

Leek RD, Harris AL, Lewis CE. Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *J Leukocyte Biol* 1994; 56:423-435;

LIMA, J.L.O; LOURO, A.P.S; LOURO, I.D. **Terapia rediferenciadora do câncer**. Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia. No.9;

LANDI, E.P; MARQUES JUNIOR, J.F.C. **Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Vol. 25. No.1. São José do Rio Preto. Janeiro/Março 2003;

MELO, E. I. et al. **Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular:** Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular. Vol. 23. No. 2. São José do Rio Preto. Abril/Junho 2008;

MACIEL, R. **Jornal de Pneumologia.** Vol. 28. No. 3. São Paulo. Maio/Junho 2002;

Melief CJ, Toes RE, Medema JP, van der Burg SH, Ossendorp F, Offringa R. Strategies for immunotherapy of cancer. Adv Immunol 2000; 75:235-282;

Nurden AT. Inherited abnormalities of platelets. Thromb Haemost 1999, 82:468-80;

NASTRI, C.O. et al. **Câncer de mama e disfunção endotelial.** Revista da Associação Médica Brasileira. Vol.54. no.5. São Paulo. Setembro/Outubro 2008;

OTAKE, A.H; CHAMMAS, R; ZATZ, R. **Câncer.** Revista Ciência Hoje. Vol.38.no.223. janeiro/ fevereiro 2006;

Patrocínio LG, Moura GB, Silva JBP, Júnior RS, Resende KO, Patrocínio JA, et al. Epistaxe Grave e Plaquetopatia em Paciente com Câncer. Arq. Int. Otorrinolaringol. 2005;9(3):235-238;

Prado-Gargia H, Aguilar-Cazares D, Flores-Vergara H, Mandoki JJ, Lopez-Gonzalez JS. Effector, memory and naive CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. Lung Cancer 2005; 47:361-73;

Portielje JEA, Lamers CHJ, Kruit WHJ, et al. Repeated administrations of interleukin (IL)-12 are associated with persistently elevated plasma levels of IL-10 and declining IFN- γ , Tumor Necrosis Factor- α , IL-6 and IL-8 responses. Clin Cancer Res 2003; 9:76-83;

SILVEIRA, P.G. et al. **Estudo experimental comparativo da eficácia antitrombótica da heparina convencional e da heparina de baixo peso molecular.** Acta Cirúrgica Brasileira. Vol.16.no.4. São Paulo. Out/Nov/Dez 2001;

Saliba et al. (1978);

Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. Cancer 1999; 86:1537-43;

Shimura S, Yang G, Ebara S, Wheeler TM, Frolov A, Thompson T. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. Cancer Res 2000; 60:5857-586;

Wall L, Burke F, Barton C, Smyth J, Balkwill F. IFN- γ induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro. Clin Cancer Res 2003; 9:2487-96.