

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

REGINALDO KELLER FERNANDES

MICHELLE CRISTINA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DAS
ENZIMAS FOSFOLIPASE A2 E CICLOXIGENASES
COX-1 E COX-2 NO DESENVOLVIMENTO DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

BAURU

2010

REGINALDO KELLER FERNANDES

MICHELLE CRISTINA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DAS
ENZIMAS FOSFOLIPASE A2 E CICLOXIGENASES
COX-1 E COX-2 NO DESENVOLVIMENTO DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Dulce Helena Jardim Constantino.

BAURU

2010

F3631a

Fernandes, Reginaldo Keller

Avaliação do efeito da inibição das enzimas fosfolipase A2 e cicloxigenases Cox-1 e Cox-2 no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich / Reginaldo Keller Fernandes, Michelle Cristina Silva -- 2010.

39 f.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Tumor de Ehrlich. 2. Fosfolipase A2. 3. Cicloxigenases. 4. Lipoxigenases. 5. Eicosanóides. I. Silva, Michelle Cristina. II. Constantino, Dulce Helena Jardim. III. Título.

REGINALDO KELLER FERNANDES

MICHELLE CRISTINA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DAS ENZIMAS
FOSFOLIPASE A2 E CICLOXIGENASES COX-1 E COX-2 NO
DESENVOLVIMENTO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde da Universidade Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas sob orientação da Prof.^a Dr.^a Dulce Helena Jardim Constantino.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Dulce Helena Jardim Constantino

Universidade Sagrado Coração

Dr.^a Ana Paula Bordon Graciani

UNESP - Faculdade de Medicina

Bauru, 10 de Dezembro de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor incondicional e atenção dedicada durante toda a minha vida e ao meu namorado, Alexandre, pela paciência, apoio e carinho durante o desenvolvimento do trabalho.

Michelle Cristina Silva

Dedico este trabalho em memória à minha avó materna Aparecida Cardoso Keller pelo amor, proteção, carinho e confiança durante toda minha vida.

Reginaldo Keller Fernandes

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à amiga e Prof.^a Dr.^a Dulce Helena Jardim Constantino que me motivou, me orientou, me transmitiu muito conhecimento e me ofereceu muito de seu tempo durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

À Bióloga Fabiane Bortoluci da Silva pela sua amizade, paciência e atenção dedicada durante a graduação e desenvolvimento desse trabalho.

À todos os Docentes do curso de Ciências Biológicas da Universidade Sagrado Coração, em especial à Prof.^a Daniela Barbosa que sempre me motivou de modo incondicional.

Ao técnico de laboratório Matheus pelo auxílio durante nossos experimentos.

Aos meus pais pela paciência e apoio incondicional.

À minha irmã pelo apoio e confiança.

Aos amigos Isabela, Aline, Gércika, Jakqueline, Mayara, Tatiana, Gabriela, Josias, Marco, Márcio, Tayar, Leonardo, Eduardo e Rafael (em memória) pela amizade e companheirismo ao longo desses anos da minha graduação.

Ao amigo Fábio Cardoso pela amizade, companheirismo, incentivo durante o desenvolvimento desse trabalho e dedicação com que me instruiu a língua estrangeira.

Aos mais novos amigos Ana Paula, Daniela, Luciane, Tatiana, Guilherme e à Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Victoriano de Campos Soares do Laboratório de Imunologia da Paracoccidioidomicose - UNESP pelo modo com que me acolheram e pela paciência que tiveram pela minha ausência nos dias de desenvolvimento desse trabalho.

À amiga Ana Paula Bordon Graciani pelas sugestões muito relevantes ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Ao amigo Bruno Leonardo Laser pela amizade, motivação e otimismo com que sempre referiu a minha escolha profissional.

Ao Laboratório de Análises Clínicas BIOTEST e VITALIS, ambos de Botucatu, que me ofereceram estágio e me garantiram experiência na rotina laboratorial e contribuíram com a minha formação.

Ao amigo Fernando Henrique Tardin e a amiga Graziela Gonçalves Dias da Empresa FHT Comércio de Segurança Eletrônica pela amizade, motivação e flexibilidade quanto a minha ausência durante muitos dias em quatro anos da minha graduação.

Reginaldo Keller Fernandes

Agradeço em especial à Prof.^a Dr.^a Dulce Helena Jardim Constantino que me motivou e me orientou durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

À Bióloga Fabiane Bortoluci da Silva pela sua amizade, paciência e atenção dedicada durante a graduação e desenvolvimento desse trabalho.

À todos os Docentes do curso de Ciências Biológicas da Universidade Sagrado Coração

Ao técnico de laboratório Matheus pelo auxílio durante nossos experimentos.

À minha irmã, Lilian pelo apoio e confiança.

Aos amigos Isabela, Aline, Gérsika, Mayara, Tatiana, Marco, Márcio e Priscila pela amizade e companheirismo ao longo desses anos da minha graduação.

Aos amigos Rosa Maria Otuka, Alex Garcia, Amarilda Moreno pela paciência que tiveram pela minha ausência no serviço nos dias de desenvolvimento desse trabalho.

Ao amigo Rafael (em memória) pela amizade, companheirismo, sorrisos e alegria, durante toda a minha graduação.

Michelle Cristina Silva

“Um homem que ousa desperdiçar uma hora ainda
não descobriu o valor da vida”.
(Charles Darwin)

RESUMO

Câncer é uma doença genética caracterizada pelo acúmulo progressivo de mutações no genoma das células alteradas. Durante o desenvolvimento tumoral há expressão de enzimas como a fosfolipase A2 que tem como função converter fosfolipídeos de membrana em ácido araquidônico (AA) e as cicloxigenases COX-1 e COX-2 que convertem AA em mediadores da resposta inflamatória e imunológica como as prostaglandinas (PGs). Há a produção de radical livre como o óxido nítrico (NO) que atua também como mediador da resposta inflamatória e imunológica. Além disso, há participação de células da imunidade como neutrófilos e macrófagos. Estas células que tem como função a fagocitose de antígenos e na fase de escape do crescimento neoplásico se acham inibidos. A dificuldade do sistema imune em reconhecer as desordens celulares e impedir sua evolução, se dá devido as alterações terem origem no próprio hospedeiro. Os macrófagos tem papel essencial contra essas alterações e quanto aos neutrófilos, até o momento não se sabe exatamente sua importância, pois existem poucos estudos direcionados a estas células e o que se sabe até o momento é que estão presentes em fases iniciais do desenvolvimento de várias neoplasias. A expressão de enzimas foi alvo no presente trabalho de pesquisa, mais exatamente a inibição da fosfolipase A2 e as cicloxigenases COX-1 e COX-2 com os inibidores dexametasona e indometacina, respectivamente no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), além de maiores esclarecimentos relativos ao comportamento de neutrófilos e macrófagos. Quanto aos resultados notamos que com relação ao número de células presentes na cavidade peritoneal constatou-se que tanto o tratamento com dexametasona como o tratamento com indometacina foram capazes de reduzir significativamente estas células (controle= $2,05 \times 10^7 \pm 0,30$ células/mL; dexametasona= $1,53 \times 10^7 \pm 0,41$ células/mL; indometacina= $1,40 \times 10^7 \pm 0,79$ células/mL), portanto uma provável redução do crescimento tumoral. Este efeito não está relacionado ao estado de ativação de macrófagos uma vez que ambos os tratamentos produziram uma redução no número de macrófagos espalhados (controle= $26,0 \pm 8,9$ ME/100uL; dexametasona= $2,8 \pm 6,3$ ME/100uL; indometacina= $10,83 \pm 5,4$ ME/100uL). Agora quanto ao influxo de neutrófilos não foi constatada em nenhum dos grupos a presença destas células no lavado peritoneal. Com relação à produção de NO constatou-se que houve uma tendência à diminuição com ambos os tratamentos (controle= $2,11 \pm 2,8$ ug/mL; dexametasona= $0,93 \text{ug/mL} \pm 0,29$; indometacina= $0,38 \text{ug/mL} \pm 0,23$). Pode-se concluir que, em nossas condições experimentais, não há participação de neutrófilos, macrófagos ou envolvimento do NO na contenção do crescimento tumoral constatada.

Palavras chave: Tumor de Ehrlich. Fosfolipase A2. Cicloxigenases. Lipoxigenases. Eicosanóides

ABSTRACT

Cancer is a genetic disease characterized by progressive accumulation of mutations in the genome of the cells changed. During tumor development there is expression of enzymes such as phospholipase A2, which has the function to convert membrane phospholipids into arachidonic acid (AA) and the cyclooxygenase COX-1 and COX-2 that converts AA into mediators of inflammatory and immune response such as prostaglandins (PGs). There is the production of free radical like nitric oxide (NO) that acts as a mediator of inflammatory and immune response. Moreover, there is participation of immune cells such as neutrophils and macrophages. These cells whose function and phagocytosis of antigens during the escape of tumor growth was inhibited think. The difficulty of the immune system to recognize the disorder and preventing its cellular evolution, is because the changes have originated in the host itself. Macrophages play an essential role against these amendments and to neutrophils, yet no one knows exactly its importance, as there are few studies that target these cells and what is known so far is that they are present in early stages of development of many cancers. The expression of enzymes was targeted in this research work, more accurately the inhibition of phospholipase A2 and cyclooxygenase COX-1 and COX-2 inhibitors with dexamethasone and indomethacin, respectively in the development of Ehrlich ascites tumor (EAT), and further information concerning the behavior of neutrophils and macrophages. As for the results we note that with respect to the number of cells in the peritoneal cavity was found that both treatment with dexamethasone and treatment with indomethacin were able to significantly reduce these cells (control= $2,05 \times 10^7 \pm 0,30$ cells/mL; dexamethasone= $1,53 \times 10^7 \pm 0,41$ cells/mL; indomethacin= $1,40 \times 10^7 \pm 0,79$ cells/mL) thus a probable reduction of tumor growth. This effect is not related to the state of macrophage activation since both treatments produced a reduction in the number of spread macrophages (control= $26,0 \pm 8,9$ ME/100uL; dexamethasone= $2,8 \pm 6,3$ ME/100uL; indomethacin= $10,83 \pm 5,4$ ME/100uL). Now for the neutrophil influx was not observed in any of the groups these cells in peritoneal lavage. With regard to production of NO was no significant effect with any treatment (control= $2,11 \pm 2,8$ ug/mL; dexamethasone= $0,93 \text{ug/mL} \pm 0,29$; indomethacin= $0,38 \text{ug/mL} \pm 0,23$). It can be concluded that in our experimental conditions, there is no participation of neutrophils, macrophages, and involvement of NO in the containment of tumor growth observed.

Key words: Ehrlich tumor. Phospholipase A2. Cyclooxygenase. Lipoxygenases. Eicosanoids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Síntese de Eicosanóides.....	18
GRÁFICO 1 - Número de células tumorais.....	29
GRÁFICO 2 - Número de macrófagos espreiados.....	32
GRÁFICO 3 - Produção de óxido nítrico (NO).....	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeito do tratamento com indometacina ou com dexametasona sobre o número de células tumorais presentes no lavado peritoneal de animais portadores do TAE.....28

TABELA 2 - Efeito do tratamento com indometacina ou com dexametasona sobre o número de macrófagos espalhados removidos por aderência do lavado peritoneal de animais portadores do TAE.....31

TABELA 3 - Efeito do tratamento com indometacina ou com dexametasona sobre a produção de Óxido Nítrico no lavado peritoneal de animais portadores do TAE.....33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
	2.1 TUMOR DE EHRLICH	15
	2.2 CÂNCER E MECANISMOS DE DEFESA DO SISTEMA IMUNE	15
	2.3 NEUTRÓFILOS	16
	2.4 MACRÓFAGOS	17
	2.5 MEDIADORES LIPÍDICOS	17
	2.6 INIBIDORES DA FOSLIPASE A2 E CICLOXIGENASES COX-1 E COX-2	20
	2.7 ÓXIDO NÍTRICO COMO MEDIADOR DE PROCESSOS FISIOLÓGICOS	21
3	OBJETIVOS	23
4	MATERIAL E MÉTODO	24
	4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
	4.2 ANIMAIS	24
	4.3 NEOPLASIA	24
	4.4 IMPLANTE TUMORAL	25
	4.5 TRATAMENTO	25
	4.6 EUTANÁSIA	25
	4.7 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL	25
	4.8 CONTAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS	25
	4.9 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS (PMNs)	26
	4.10 ESPRAIAMENTO DE MACRÒFAGOS	26
	4.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO PELO MÉTODO DE GRIESS	26
	4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	35
7	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Estudos mais recentes mostram que todo ano quase oito milhões de pessoas morrem no mundo por causa de câncer, sendo que no Brasil é a segunda causa mais comum de morte. A carcinogênese é caracterizada por desordens celulares resultantes de alterações no material genético que prevalecem e evoluem para neoplasias malignas. Nesse sentido, é evidente que para uma célula se dividir de modo desordenado e possivelmente evoluir para um câncer fatores ambientais, nutricionais e genéticos estão relacionados.

Durante o desenvolvimento tumoral há expressão de enzimas como a fosfolipase-A2 que tem como função converter fosfolípidos de membrana em ácido araquidônico (AA) e as cicloxigenases COX-1 e COX-2 que convertem AA em eicosanóides como as prostaglandinas (PGs) que são mediadores da resposta inflamatória e imunológica. Há a produção de um radical livre como o óxido nítrico (NO) que atua também como mediador da resposta inflamatória e imunológica. Além disso, há participação de células da imunidade como neutrófilos e macrófagos. Estas células que tem como função a fagocitose de antígenos e na fase de escape do crescimento neoplásico se acham inibidas.

A dificuldade do sistema imune em reconhecer as desordens celulares e impedir sua evolução, se dá devido as alterações terem origem no próprio hospedeiro. Os macrófagos tem papel essencial contra essas alterações e quanto aos neutrófilos, até o momento não se sabe exatamente sua importância, pois existem poucos estudos direcionados a estas células e o que se sabe até o momento é que estão presentes em fases iniciais do desenvolvimento de várias neoplasias. No entanto, os neutrófilos merecem serem estudados em relação a esses processos, uma vez que a literatura tem chamado a atenção para o envolvimento dinâmico dessas células na defesa do hospedeiro contra os diversos microorganismos.

A expressão dessas enzimas foi alvo no presente trabalho de pesquisa, mais exatamente a inibição da fosfolipase-A2 e as cicloxigenases COX-1 e COX-2 no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), além de maiores esclarecimentos relativos ao comportamento de neutrófilos e macrófagos e da produção de óxido nítrico.

2 REVISÃO/LITERATURA

2.1 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich (TE) é definido como uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna que corresponde ao adenocarcinoma mamário do camundongo fêmea, podendo crescer nessa espécie animal na forma ascítica, quando inoculado intraperitonealmente, e na forma sólida, quando inoculado no subcutâneo. Nesse sentido, é essencialmente utilizado no estudo da ação de componentes físicos, químicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, citogenética e terapêutica de células tumorais (ERLICH, 1906).

Ehrlich (1906), ainda coloca, que a vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, está no crescimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e, sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia que otimiza o tempo de estudo.

Inicialmente Paul Ehrlich (1905), desenvolveu o tumor na forma sólida e, posteriormente, em 1932, Leowenthal e Jahn desenvolveram a forma ascítica sendo atualmente um dos tumores mais utilizados nas pesquisas sobre câncer (DAGLI, 1989).

2.2 Câncer e mecanismos de defesa do sistema imune

O câncer geralmente deriva de um único clone de células transformadas, porém o processo de progressão tumoral promove considerável diversidade genética entre as células neoplásicas em crescimento. Essas células são submetidas à inúmeros mecanismos de pressão seletiva, incluindo hipóxia por vascularização inadequada e, provavelmente o ataque pelo sistema imune. A seqüência de eventos, desde a célula alterada até a metástase, envolve uma série de interações entre a célula tumoral e os leucócitos (TORREZINI; ATHANAZIO, 2008).

A carcinogênese está associada a vários fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável desses fatores a dieta de gorduras, mais especificadamente os ácidos graxos essenciais. Esses que são imprescindíveis ao organismo e não podem ser sintetizados pelo mesmo e que, portanto, devem ser oferecidos na alimentação (MARTINS; GRUEZO, 2008).

De acordo com Guyton e Hall (2002), apenas uma fração muito pequena de células mutantes podem sobreviver e dar origem à cânceres, pois existe controles normais do organismo por feedback que impedem seu desenvolvimento. Essas células podem ser destruídas pelo sistema imune, já que a maioria delas apresenta proteínas anormais em sua composição devido a alterações de seus genes, e são necessários vários oncogenes ativados para evolução de um câncer. Essas precauções hereditárias podem raramente falhar a não ser que haja fatores externos como a exposição do indivíduo a fatores químicos, físicos ou biológicos.

Os mesmos autores ainda colocam, que essas desordens durante a divisão celular são raras devido a incrível precisão com que os filamentos de DNA cromossômico são replicados em cada célula antes da mitose, além do processo de leitura desses filamentos que podem corrigir qualquer um que esteja anormal para que o processo mitótico possa ser concluído.

Dependendo da situação clínica do indivíduo encontra-se com maior ou menor relevância anticorpos, complemento, linfócitos NK, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares, macrófagos, células dendríticas e citocinas, todos participantes da resposta imune aos tumores (CALICH; VAZ, 2001).

As células tumorais expressam diferenças qualitativas através de antígenos específicos de tumores (TSA, tumor-specific antigens) e diferenças quantitativas que decorrem da hiperexpressão de alguns produtos gênicos que chegam a atingir em alguns casos, até mil vezes os valores normais. Esses antígenos são conhecidos como antígenos associados a tumores (TAA, tumor-associated antigens) (SHARON, 2000).

2.3 Neutrófilos

Os neutrófilos são fagócitos conhecidos como polimorfonucleares (PMN) que compõem cerca de 50 a 70 % dos leucócitos do sangue. Apresentam grânulos primários e secundários, onde os primários ou azurófilos são compostos por enzimas digestivas como a peroxidase, a lisozima e outras enzimas hidrolíticas e os secundários que em menor quantidade são compostos por colagenase, lactoferrina e lisozima (SEGAL, 2005).

Esses fagócitos são as células iniciais do processo inflamatório, pois são as primeiras a migrarem para o local que necessita de defesa imunológica (entre 2 e 4 horas após a penetração

do patógeno), apresentando mecanismos muito eficazes de defesa, em especial contra vários tipos de bactérias (FORTE, 2007).

2.4 Macrófagos

Os macrófagos são fagócitos mononucleares (MN) que geralmente apresentam meia-vida longa e baixa taxa de proliferação. Eles são derivados de monócitos, que após cerca de três dias na corrente sanguínea, atinge o local de atuação, onde sofrem diferenciação final com distintas alterações morfológicas, recebendo denominações conforme o aspecto e localização. Assim, existem os macrófagos livres nos diferentes tecidos, macrófagos esplênicos, macrófagos alveolares, macrófagos pleurais e macrófagos peritoneais. Esses fagócitos mononucleares iniciam a inflamação no sítio de infecção após 24 a 48 horas (FORTE, 2007).

2.5 Mediadores lipídicos

A evolução de um tumor resulta na expressão de enzimas e mediadores lipídicos como as prostaglandinas h-sintetases (cicloxiogenases COX-1 e COX-2) e prostaglandina E2 (PGE₂), detectadas em tumores de cólon (SANO et al., 1995; MARTINS; GRUEZO, 2008).

Os ácidos graxos essenciais de cadeia longa: ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentanoico (EPA) e ácido docosahexanoico (DHA) constituem os fosfolípidos presentes nas membranas e na matriz estrutural de todas as células. Esses lípidos podem ainda modular a função celular atuando como mediadores intracelulares de sinais e como moduladores das interações entre as células (CARMO; CORREIA, 2009).

Além da manutenção das membranas celulares, os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) como o AA presente nos fosfolípidos são precursores da síntese de eicosanóides. Estes que são o resultado do metabolismo exercido inicialmente pela ação da enzima fosfolipase A2 que converte fosfolípidos de membrana em AA e finalmente pelas enzimas cicloxiogenases (COX) e lipoxigenases (LO) derivando na síntese de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs), respectivamente que atuam como mediadores ativando um grande número de processos fisiológicos, em especial a resposta imune às infecções e às células tumorais.

A produção excessiva de eicosanóides derivados do AA tem sido envolvida em muitos distúrbios inflamatórios e autoimunes, inclusive no processo de carcinogênese. Tem-se mostrado que diversos eicosanóides promovem a sobrevivência e estimulam a proliferação celular, angiogênese, aumentam a permeabilidade vascular e inflamação, apresentando, deste modo, um importante papel na promoção e crescimento do tumor (MARTINS; GRUEZO, 2008).

Martins e Gruezo (2008), também colocam que o AA é o ácido graxo polinsaturado (AGPI) disponível em maior quantidade para a ação da fosfolipase A2, esta enzima que é ativada por mediadores como histamina, serotonina, bradicinina e noradrenalina, liberando AGPIs, que servem como precursores diretos da geração de eicosanóides. São sintetizados, a partir de duas classes de enzimas: cicloxigenases COX-1 e COX-2 e lipoxigenases LO-5, LO-12 e LO-15 como ilustrado na Figura 1:

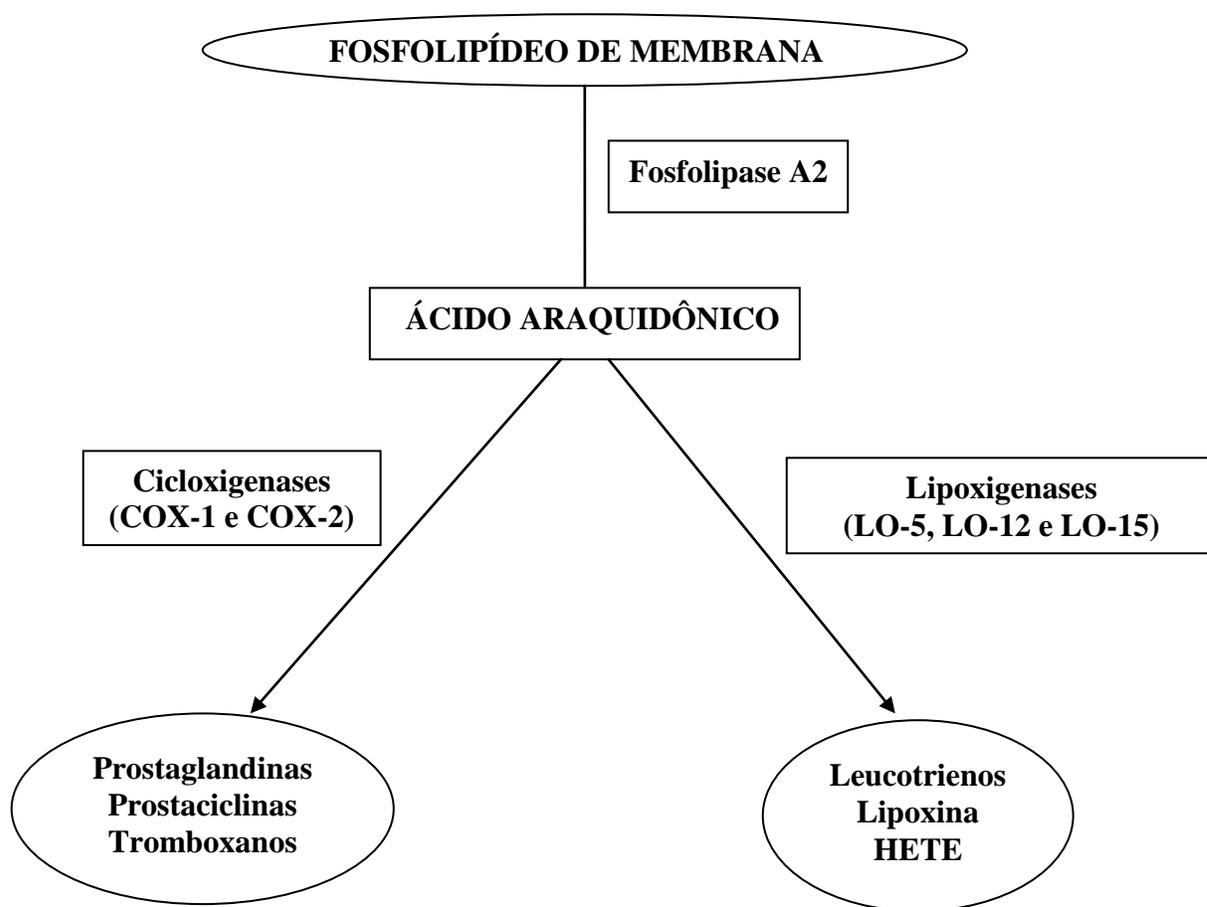


Figura 1: Síntese de Eicosanóides

Os metabólitos do AA: PGs e LTs, além de mediadores das inflamações são importantes imunomoduladores da expressão de citocinas nas respostas imune inata e adquirida. As PGs também são sintetizados por células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como macrófagos e células dendríticas que ativam linfócitos T e inibem a produção de interferon- γ (INF- γ) por leucócitos do sangue periférico e linfócitos CD4+ entre várias outras funções de ativação e inibição. Já os LTs podem também ser secretados por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, atuando como ativadores celulares ou fatores quimiotáticos para neutrófilos, eosinófilos, células mononucleares e linfócitos T (NICOLETE, 2008).

A atividade das COX gera prostaglandina H₂ (PGH₂) que é convertida por sintetases específicas aos três grupos de prostanóides cíclicos: PGs, prostaciclina e tromboxanos. As enzimas COX-1 e COX-2 catalisam reações químicas muito semelhantes, mas são expressas em condições diferentes. A COX-1, enzima de expressão constitutiva para a maioria das células, participa da síntese de prostanóides envolvidos com a homeostase, como citoproteção gastrointestinal, manutenção da função renal, coagulação sanguínea, agregação plaquetária e vasoconstrição (CROFFORD, 1997). Quanto a expressão da COX-2, ocorre normalmente, em resposta a estímulos inflamatórios como LPS, interleucina-1, TNF- α (Fator Necrose Tumoral- α), fatores de crescimento e promotores tumorais (FOSSLIEN, 2000).

As PGs são mediadores lipídicos compostos por 20 carbonos que desempenham diversas atividades biológicas através da interação com seus receptores específicos (DUBOIS et al., 1998; MURAKAMI et al., 2000; FITZPATRICK, 2001). De acordo com SHUTZ et al., 1997, as PGs exercem uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos, as terminações nervosas e as células envolvidas na inflamação. Dentre as PGs, a PGH₂ é a mais abundante produzida nos sítios inflamatórios, em doenças degenerativas como Mal de Alzheimer e em vários tumores, como o de cólon, de estômago e de mama. Nesses tumores, a produção de PGH₂ ocorre em consequência da atividade da COX-2. Em algumas células tumorais, as PGs sintetizadas via COX-2 interagem com receptores celulares, estimulando sua proliferação, impedindo que entrem em apoptose, estimulando a expressão de fatores angiogênicos. Essas alterações, em conjunto, conferem às células tumorais crescimento autônomo e vascularizado independente (DUBOIS et al., 1998; MURAKAMI et al., 2000; FITZPATRICK, 2001).

Quanto as LO (5-LO, 12-LO e 15-LO) constituem família de enzimas citoplasmáticas, classificadas de acordo com a posição na qual oxidam o AA (KUMLIN; DAHLÉN, 1990). Desta

forma, a 5-lipoxigenase (5-LO) é aquela que oxida a insaturação em C-5 deste ácido graxo essencial, sendo a mais importante destas enzimas, promovendo a bioformação dos LTs. A 5-LO é uma enzima citoplasmática (UEDA et al., 1986; YAMAMOTO, 1989) ativada após transporte intracelular, dependente de íons cálcio (Ca^{+2}) e adenosina trifosfato (ATP), em direção à membrana plasmática, onde se associa à proteína denominada proteína ativadora de 5-LO (FLAP) (UEDA et al., 1986; PETERS-GOLDEN; BROCK, 2000). Uma vez associada à FLAP, a 5-LO catalisa a oxigenação da posição C-5 do AA, levando à formação do 5-HPETE, que por ação subsequente da enzima LTA_4 -sintase, presente em mastócitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas e monócitos, é biotransformado no intermediário epóxido ácido 5,6-óxido-7,9-trans-11,14-cis-eicosatetraenóico, LTA_4 . O LTA_4 , por sua vez, é substrato para duas novas enzimas a LTA_4 hidrolase, que origina o LTB_4 ; e a glutathione-S-transferase, levando à bioformação do primeiro leucotrieno cisteínico, o LTC_4 , que por ações sequenciais das enzimas glutamiltranspeptidase e dipeptidase originam os demais Cys-LTs, LTD_4 e LTE_4 , respectivamente (PETERS-GOLDEN; BROCK, 2000; RADMARK, 2000).

Os LTs são eicosanóides resultantes da cascata do AA (SPECTOR, 1995) e as principais propriedades farmacológicas destes eicosanóides, oriundas de sua interação com receptores específicos de membrana incluem: broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, produção de muco, liberação de enzimas lisossômicas, quimiotaxia, ativação de leucócitos e vasoconstrição da musculatura lisa, e refletem seu envolvimento em fisiopatologias inflamatórias como asma, rinite alérgica, artrite reumatóide e psoríase (HAY et al., 1995; MELILLO; MELILLO, 2001).

2.6 Inibidores da fosfolipase A2 e Cicloxigenases COX-1 e COX-2

Na década de 60, Flower et al. e Hirota et al., demonstraram que os corticosteróides estimulam a lipocortina, proteína antiinflamatória que inibe a fosfolipase A2, inibindo a formação de PGs e produtos da LO. Assim, até 1980, havia larga aceitação de que os efeitos antiinflamatórios dos corticosteróides eram apenas resultado da inibição da fosfolipase A2 (GOULDING; GUYRE, 1992; SCWIEBERT et al., 1996). No entanto, atualmente já se sabe que os corticosteróides afetam, também, indiretamente a ação das citocinas através da inibição do acesso de leucócitos aos sítios inflamatórios, além de inibir a função de fibroblastos, macrófagos,

células endoteliais, linfócitos T e B, bem como a produção de imunoglobulinas (BOUMPAS et al., 1993; HAJJAR; PINHEIRO, 1999).

Esses mesmos autores ainda colocam que muitos fatores influenciam na magnitude desses efeitos dos corticosteróides, incluindo a dose, via de administração, tipo e grau de diferenciação de células-alvo e até mesmo o "hospedeiro" pode modificar a resposta antiinflamatória.

Os antiinflamatórios não esteróides (AINES) tem como mecanismo de ação a inibição da enzima COX, que converte AA em PGs. Podem ser inibidores não seletivos, atuando sobre as isoformas COX-1 e COX-2, ou inibidores seletivos da COX-2, isoforma especialmente associada com o processo inflamatório (WANNAMACHER; FERREIRA, 2004). A indometacina é um exemplo de AINE não seletivo, ou seja, inibe ambas isoformas da COX e pertence ao grupo dos ácidos indolacéticos. Apresenta importante atividade antiinflamatória, analgésica, antipirética e tem como característica físico química a presença de grupamento ácido carboxílico na molécula e baixo pka (ROBERTS II; MARROW, 2001).

2.7 Óxido Nítrico como mediador de processos fisiológicos

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que se encontra na forma de gás, é inorgânico e incolor. É uma molécula de configuração simples e que pode ser encontrada no ar, é extremamente reativa devido a presença de um elétron extra (SNYDER & BREDT, 1992), mas em compensação difunde-se através das membranas celulares e fases lipídicas com facilidade (WOLF, 1997).

O NO é gerado por uma família de izoenzimas, através da catálise enzimática da L-arginina, que resulta na formação de L-citrulina e NO, este último que está envolvido em muitos processos fisiológicos dos mamíferos, que incluem a neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, inflamação, reações imunológicas e nos mecanismos de defesa contra microorganismos e tumores (COSTA, 2003). É um gás solúvel, produzido por células endoteliais, macrófagos e por neurônios centrais específicos. É sintetizado a partir da L-arginina, do oxigênio molecular e da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). O NO produzido pelos macrófagos, que atua como radical livre é citotóxico para determinados micróbios e células tumorais, sendo que a produção descontrolada

de NO por esse fagócito pode levar a uma vasodilatação periférica maciça e ao choque (ROBBINS, KUMAR, COTRAN, 1996).

Em neoplasias malignas humanas tem-se observado a produção de uma enzima envolvida no metabolismo da L-arginina, a arginase. Esta enzima ocorre em duas isoformas: arginase I e II e há relatos de que a arginase II seja produzida em níveis elevados em neoplasias malignas como o carcinoma de próstata (MUMENTHALER et al, 2008; VISSERS et al, 2005).

A L-arginina pode ser citada como estimuladora do sistema imune, pois estimula a síntese de linfócitos T, poliaminas, interleucinas e NO (NOVAES, 1999). O NO apresenta um papel importante na modulação da resposta imunológica, pois regula a síntese de citocinas, macrófagos e outras células que induzem a formação de interferon gama (IFN- γ) e fator necrose tumoral (TNF- γ) (BARBUL, 1981).

Na biologia do tumor os efeitos do NO são complexos e bifuncionais, pois pode favorecer o crescimento, metástase, angiogênese do tumor, ou então pode apresentar ações antitumorais, através de citotoxicidade e pela indução da apoptose (LALA; ORUCEVIC, 1998).

Em vista do exposto, concluímos ser relevante o estudo do crescimento neoplásico, frente a inibição das enzimas cicloxigenases COX-1 e COX-2 e fosfolipase A2, de modo que a inibição das COX resulta na ausência da produção de eicosanóides como prostaglandina, prostaciclina e tromboxana, e a inibição da fosfolipase A2 impede a síntese desses eicosanóides mais aqueles sintetizados pela via da lipoxigenase como leucotrieno, lipoxina e HETE (ácido hidroxieicosatetraenóico), possibilitando a avaliação de como a ausência desses metabólitos influenciam no crescimento tumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inibição das enzimas fosfolipase A2 e cicloxigenases COX-1 e COX-2 com o tratamento com os inibidores dexametasona e indometacina, respectivamente no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliamos o crescimento do Tumor Ascítico de Ehrlich frente ao tratamento com inibidor não seletivo como a indometacina que age nas cicloxigenases COX-1 e COX-2 e o inibidor dexametasona que age na fosfolipase A2;
2. Buscamos quantificar os neutrófilos no lavado peritoneal;
3. Avaliamos o estado funcional e o número de macrófagos na cavidade peritoneal;
4. Determinamos a produção de óxido nítrico.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No desenvolvimento deste estudo foram constituídos três grupos de oito animais cada. Posteriormente os animais foram inoculados com 10^3 células tumorais por via intraperitoneal. O grupo controle, após inóculo com células tumorais, foi tratado com solução fisiológica via intraperitoneal. O grupo indometacina foi tratado via intraperitoneal na dose de 2mg/kg de peso e o grupo dexametasona foi tratado por esta mesma via com 3 mg/kg de peso durante 6 dias. Após esse período, os animais foram eutanasiados com dose letal dos anestésicos ketamina (0,2 ml) e xylasina (0,2 ml) por via intraperitoneal. Na seqüência, foi realizada a lavagem peritoneal de cada animal e recolhido o lavado em tubos de ensaio para posterior contagem de leucócitos e células tumorais presentes no lavado, em suspensões diluídas 1:10 em câmara de Neubauer. Parte do lavado peritoneal foi utilizado para avaliação da produção de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 24 camundongos da linhagem Balb C, machos, com idade entre 30 e 45 dias e procedentes do Biotério da Universidade Sagrado Coração - USC. Durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (8 animais por caixa), com ingestão de água “*ad libitum*” e ração comercial específica para camundongos.

4.3 NEOPLASIA

Neste estudo foi empregado o tumor de Ehrlich, mantido no Biotério da Universidade Sagrado Coração – USC. As células neoplásicas foram mantidas “*in vivo*” por repiques semanais em camundongos Balb C, através do implante de 10^3 células tumorais por via intraperitoneal. Na obtenção de inóculos para implante do tumor, o fluido ascítico foi removido, por punção da cavidade peritoneal, e a suspensão foi centrifugada por duas vezes em solução fisiológica a 1500 rpm, 10 minutos. A determinação do número total de células neoplásicas foi realizada através da

contagem em Câmara de Neubauer, e a concentração desejada obtida mediante diluição em PBS estéril.

4.4 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.

4.5 TRATAMENTO

Os animais foram tratados com 0,1 ml de solução fisiológica, com indometacina na dose de 2mg/kg de peso e dexametasona com 3 mg/kg de peso, sendo que as aplicações foram realizadas por via intraperitoneal uma vez ao dia, durante 6 dias.

4.6 EUTANÁSIA

Após 6 dias de tratamento os animais foram eutanasiados com dose letal dos anestésicos ketamina (0,2 ml) e xylasina (0,2 ml) por via intraperitoneal.

4.7 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL

Com auxílio de seringa descartável foram inoculados 3 ml de solução fisiológica na cavidade peritoneal. O abdome do animal foi massageado e posteriormente foi realizado uma incisão para introdução de uma pipeta automática possibilitando recolher o lavado peritoneal. Todo este procedimento foi realizado após a eutanásia do animal.

4.8 CONTAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS

Após a remoção do lavado peritoneal, a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:10, sendo que uma alíquota de 0,5ml foi separada para contagem de células tumorais em câmara de Neubauer.

4.9 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS (PMNs)

Foi depositada em lâmina de microscopia uma alíquota de 100uL. Realizou-se a distensão e posterior coloração pelo método de Leishman. As distensões foram avaliadas em microscopia óptica, aumento de 400x.

4.10 ESPRAIAMENTO DE MACRÓFAGOS

A suspensão de células coletadas foi imediatamente colocada em tubo plástico. Em seguida, alíquotas de 200uL desta suspensão foram colocadas sobre lâminas de microscopia e adicionados 200uL de meio RPMI 1640 e incubadas durante 30 minutos a 37°C. Ao fim desse tempo as lâminas foram lavadas com soro fisiológico para remoção das células não aderentes e posteriormente coradas pela Hematoxilina de Harris. Toda a extensão da lâmina foi avaliada de maneira sistemática à microscopia óptica no aumento de 400x.

4.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO PELO MÉTODO DE GRIESS

A determinação da concentração de nitrito é uma forma indireta de se determinar a concentração de óxido nítrico (NO). Este procedimento foi feito utilizando-se o método de Griess, este método quantifica indiretamente a produção de NO pela determinação de nitritos e nitratos acumulados no sobrenadante das células, após o tratamento (MOSHAGE, 1995). Para tanto a cada 0,2 ml de lavado peritoneal foi acrescido de 1,8 ml do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e naphtylenediamina a 0,1 % em água destilada). Como branco do teste foi empregado 1,8 ml de solução fisiológica acrescido de 0,2 ml do lavado peritoneal. A reação ocorreu num período de 20 min, após o qual foi realizada a leitura em espectrofotômetro (CELM) em comprimento de onda 540nm. O cálculo dos resultados foram realizados através da comparação do comprimento de onda dos testes com o comprimento de onda de um padrão com 100ug de nitrito/ml.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao teste paramétrico T de student, realizado através do emprego do software Sigma Stat, versão 3.1 (Jandel Scientific).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo o principal objetivo foi avaliar o efeito da inibição das enzimas fosfolipase A2 e cicloxigenases COX-1 e COX-2 com o tratamento com os inibidores dexametasona e indometacina, respectivamente no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich. Para tanto, os parâmetros utilizados foram a contagem de células tumorais presentes no lavado peritoneal, contagem de células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos presentes no mesmo lavado e determinação da produção de óxido nítrico (NO).

Constatamos que tanto o tratamento com dexametasona como o tratamento com indometacina foram capazes de reduzir significativamente o número células tumorais (controle= $2,05 \times 10^7 \pm 0,30$ células/mL; dexametasona= $1,53 \times 10^7 \pm 0,41$ células/mL; indometacina= $1,40 \times 10^7 \pm 0,79$ células/mL;). Dados encontram-se demonstrados na tabela 1 e gráfico1.

Tabela 1. Efeito do tratamento com indometacina ou com dexametasona sobre o número de células tumorais presentes no lavado peritoneal de animais portadores do TAE.

Tratamento ^a	Células tumorais ($\times 10^6$/mL)
Soro Fisiológico	$20,47 \pm 3,02^{b,c}$
Indometacina	$14,07 \pm 7,89$
Dexametasona	$15,34 \pm 4,19^*$

a- animais tratados com solução fisiológica (0,1ml, ip, 1x/dia), indometacina (1 mg/kg de peso, 0,1ml, ip, 1x/dia) ou com dexametasona (3 mg/kg de peso, 0,1mL, ip, 1x/dia).

b- Resultados expressos em média \pm desvio padrão;

c- n= 5 animais por grupo;

* P<0,005 na comparação com o grupo tratado com soro fisiológico.

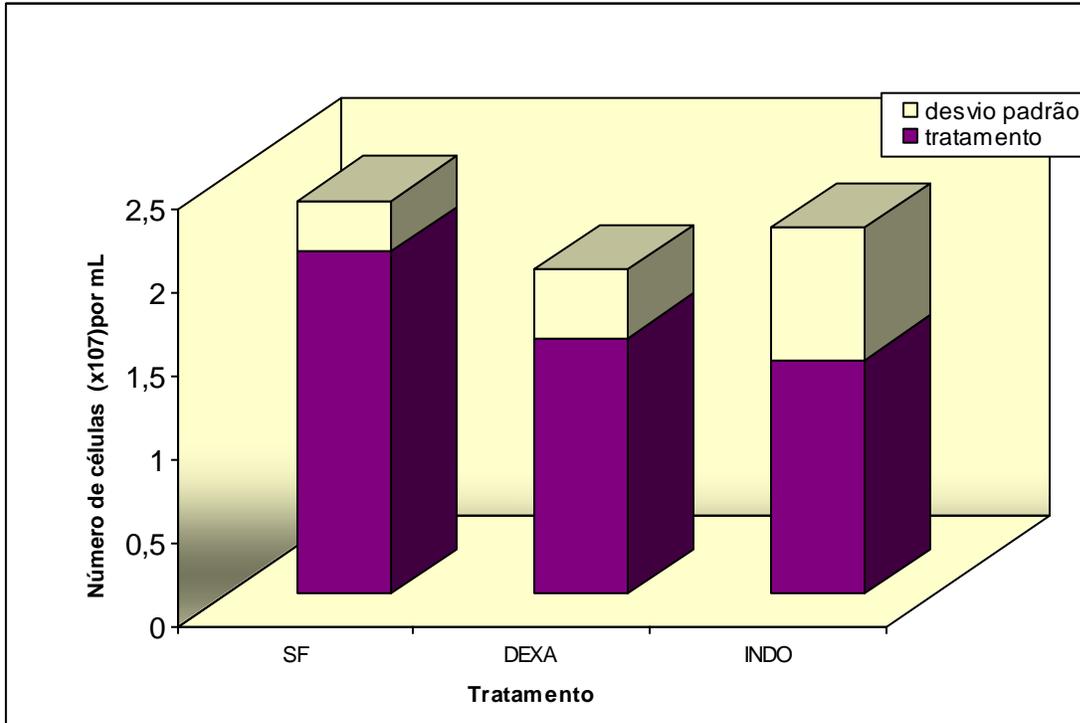


Gráfico 1: Efeito do tratamento com Dexametasona ou com Indometacina sobre o n° total de células tumorais presentes no lavado peritoneal.

A produção excessiva de eicosanóides derivados do AA tem sido envolvida em muitos distúrbios inflamatórios e autoimunes, inclusive no processo de carcinogênese. Tem-se mostrado que diversos eicosanóides promovem a sobrevivência e estimulam a proliferação celular, angiogênese, aumentam a permeabilidade vascular e inflamação, apresentando, deste modo, um importante papel na promoção e crescimento do tumor (MARTINS; GRUEZO, 2008).

De acordo com SHUTZ et al., 1997, as PGs exercem uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos, as terminações nervosas e as células envolvidas na inflamação. Dentre as PGs, a PGH_2 é a mais abundante produzida nos sítios inflamatórios, em doenças degenerativas como Mal de Alzheimer e em vários tumores, como o de cólon, de estômago e de mama. Nesses tumores, a produção de PGH_2 ocorre em consequência da atividade da COX-2. Em algumas células tumorais, as PGs sintetizadas via COX-2 interagem com receptores celulares, estimulando sua proliferação, impedindo que entrem em apoptose, estimulando a expressão de fatores angiogênicos. Essas alterações, em conjunto, conferem às células tumorais crescimento

autônomo e vascularizado independente (DUBOIS et al., 1998; MURAKAMI et al., 2000; FITZPATRICK, 2001).

Em acordo com essa revisão, as PGs podem estar diretamente envolvidas no crescimento tumoral já que nós constatamos uma diminuição do número de células tumorais com ambos os tratamentos dexametasona e indometacina, estes inibidores que por sua vez inibem a síntese de PGs justificando a redução do número de células tumorais como mostrado nos resultados acima.

Lala et al. trabalhando com o tumor ascítico de Ehrlich em camundongos CBA notaram que a atividade NK atingia um pico coincidente com a elevação da taxa de células NK. Essa atividade declinou em torno do 7º dia, enquanto que a taxa de linfócitos NK ainda se encontrava elevada. Isso sugere em nosso estudo que os linfócitos NK podem estar atribuídos na diminuição das células tumorais constatada.

Neste estudo buscou-se uma correlação entre a inibição de cicloxigenases e fosfolipases com o influxo de PMN's (dados não demonstrados). Uma vez que a inibição das COXs resulta em uma maior disponibilidade de AA para ser metabolizado por via LO e conseqüente aumento na produção de LTs, dentre eles o LTB_4 . Porém não foi constatada em nenhum dos grupos a presença destas células no lavado peritoneal. Este fato pode estar relacionado ao período de avaliação realizado, nesta fase o influxo de PMN's pode ter sido afetado por outros mediadores envolvidos na resposta imunitária.

Sabe-se que a resposta inflamatória nessa forma de tumor é discreta, caracterizada por mínima infiltração de macrófagos e por influxo tardio de células polimorfonucleares para a cavidade (FECCHIO et al., 1990). Além disso, o mecanismo de elevação dos leucócitos e neutrófilos é obscuro no tumor de Ehrlich, contudo existem fortes indícios de que o fator estimulador de colônia (CSF) e o fator estimulador de colônia de granulócitos produzidos pelas células tumorais estejam envolvidos (OGILVIE, 1993, MORALES et al., 1999).

Além disso, ambos os tratamentos induziram uma redução no número de macrófagos espalhados (controle = $26,0 \pm 8,9$ ME/100 μ L; dexametasona = $2,8 \pm 6,3$ ME/100 μ L; indometacina = $10,83 \pm 5,4$ ME/100 μ L). Dados encontram-se demonstrados na Tabela 2 e Gráfico 2.

Tabela 2. Efeito do tratamento com indometacina ou com dexametasona sobre o número de macrófagos espalhados removidos por aderência do lavado peritoneal de animais portadores do TAE.

Tratamento ^a	Macrófagos espalhados (média em 10 campos MO – aumento 400x)
Soro Fisiológico	$26,0 \pm 8,90^{b,c}$
Indometacina	$10,83 \pm 5,42^*$
Dexametasona	$2,80 \pm 6,26^*$

a- animais tratados com solução fisiológica (0,1ml, ip, 1x/dia), indometacina (1mg/kg de peso, 0,1ml, ip, 1x/dia) ou com dexametasona (3 mg/kg de peso, 0,1mL, ip, 1x/dia).

b- Resultados expressos em media \pm desvio padrão;

c- n= 5 animais por grupo;

* $P < 0,005$ na comparação com o grupo tratado com soro fisiológico.

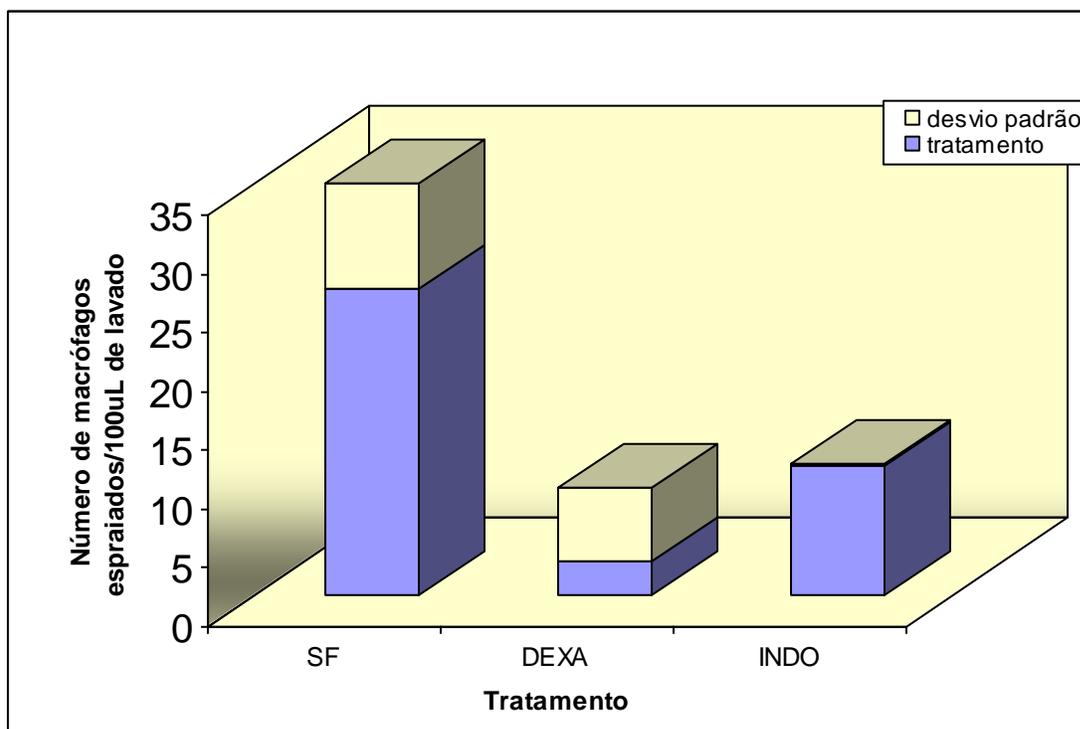


Gráfico 2: Efeito do tratamento com Dexametasona ou com Indometacina sobre o espraio de macrófagos peritoneais.

Sabe-se que macrófagos, linfócitos T e suas subpopulações participam efetivamente da resposta de defesa antitumoral (BARBERA-GUILLEM et al., 2002).

Os metabólitos do AA: PGs e LTs, além de mediadores das inflamações são importantes imunomoduladores da expressão de citocinas nas respostas imune inata e adquirida. As PGs também são sintetizados por células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como macrófagos e células dendríticas que ativam linfócitos T e inibem a produção de interferon- γ (INF- γ) por leucócitos do sangue periférico e linfócitos CD4+ entre várias outras funções de ativação e inibição. Já os LTs podem também ser secretados por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, atuando como ativadores celulares ou fatores quimiotáticos para neutrófilos, eosinófilos, células mononucleares e linfócitos T (NICOLETE, 2008).

Nesse sentido, nossos resultados mostram que tanto o tratamento com dexametasona quanto o tratamento com indometacina inibiram a resposta imunitária dependente de macrófagos. Pois a dexametasona inibiu a síntese total de eicosanóides já que impede a liberação de AA do fosfolípido de membrana, isso resultou na ausência de fatores quimiotáticos e conseqüente diminuição de macrófagos. Quanto à indometacina inibiu a síntese de PGs mantendo a via de

produção de LTs através da ação da enzima LO, resultando em uma diminuição menos significativa do número de macrófagos.

Ao avaliarmos a produção de NO constatamos que houve uma tendência à diminuição em ambos os tratamentos (controle = $2,11 \pm 2,8$ $\mu\text{g/mL}$; dexametasona = $0,93 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$; indometacina = $0,38 \pm 0,23$ $\mu\text{g/mL}$). Dados encontram-se demonstrados na Tabela 3 e Gráfico 3.

Tabela 3. Efeito do tratamento com indometacina ou com dexametasona sobre a produção de Óxido Nítrico no lavado peritoneal de animais portadores do TAE.

Tratamento ^a	NO (ug/100uL)
Soro Fisiológico	$2,12 \pm 2,86^{b,c}$
Indometacina	$0,38 \pm 0,23$
Dexametasona	$0,93 \pm 0,29$

a- animais tratados com solução fisiológica (0,1ml, ip, 1x/dia), indometacina (1mg/kg de peso, 0,1ml, ip, 1x/dia) ou com dexametasona (3 mg/kg de peso, 0,1mL, ip, 1x/dia).

b- Resultados expressos em media \pm desvio padrão;

c- n= 5 animais por grupo.

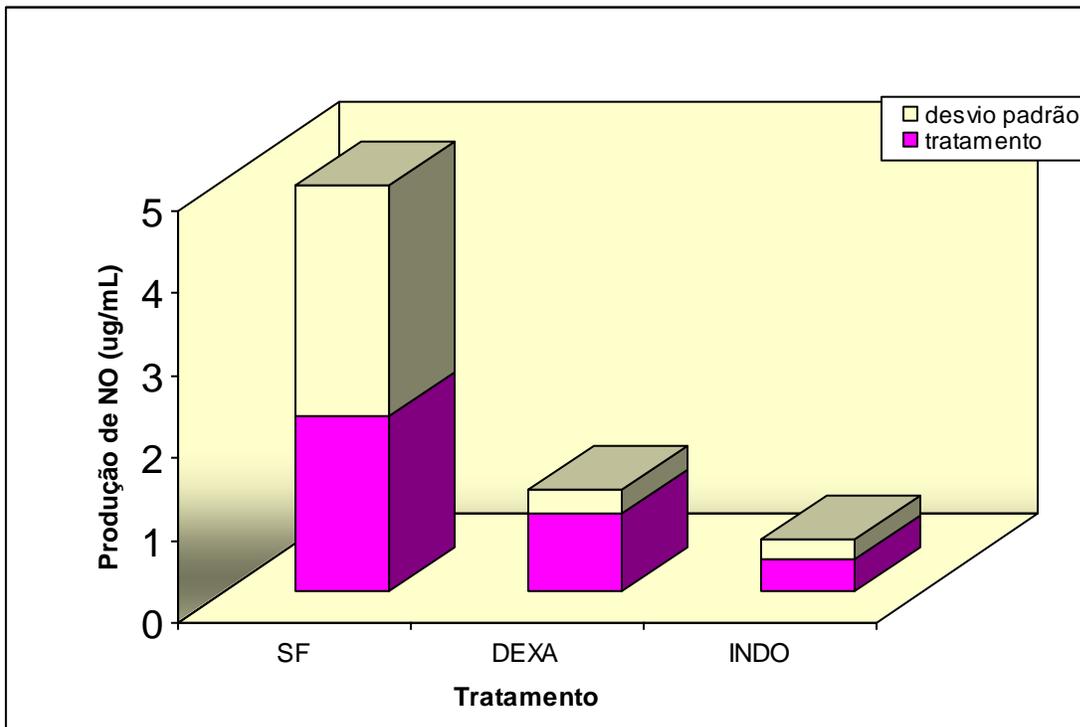


Gráfico 3: Efeito do tratamento com Dexametasona ou com Indometacina sobre a produção de óxido nítrico (NO).

Sabe-se que na biologia do tumor os efeitos do NO são complexos e bifuncionais, pois pode favorecer o crescimento, metástase e angiogênese do tumor, ou então pode apresentar ações antitumorais, através de citotoxicidade e pela indução da apoptose (LALA; ORUCEVIC, 1998).

Além disso, baixos níveis de NO, produzidos por células tumorais, podem estimular angiogênese, crescimento tumoral e metástase, porém, altos níveis deste gás, produz efeito oposto (EDWARDS, 1996). O NO produzido pelos macrófagos, que atua como radical livre é citotóxico para determinados micróbios e células tumorais (ROBBINS, KUMAR, COTRAN, 1996).

A baixa produção de NO endógeno pode induzir a resistência por parte das células tumorais a este gás, entretanto, a restauração de iNOS (isoforma NOS indutível ou macrofágica) reverte esta resistência, inibindo o crescimento tumoral e a produção de metástases (XIE e HUANG, 2003).

Baseado na literatura, esta tendência à diminuição da produção de NO constatada, se deve a diminuição do número de macrófagos e consequente início à resistência por parte das células tumorais.

6 CONCLUSÕES

Concluimos que em nossas condições experimentais:

- Tanto a inibição de fosfolipase como das cicloxigenases foram capazes de reduzir o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich;
- O número de macrófagos espraiados foi diminuído por ambos os tratamentos, sendo que a ação da dexametasona teve um efeito superior ao da indometacina;
- O NO não participa da contenção do crescimento tumoral constatada.

REFERÊNCIAS

BARBERA-GUILLEM, E.; NYHUS, J. K.; WOLFORD, C. C.; FRIECE, C. R.; SAMPSEL, J. W. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis and IgG immune complexes potentiate the process. **Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.**, v. 62, p. 7042-7049, dec. 2002.

BARBUL, A.; SISTO, D. A.; WASSERKRUG, H. L.; EFRON, G. Arginine stimulates lymphocyte immune response in healthy human beings. **Surgery**, v.90, n.2, p. 244-51. ago, 1981.

BOUMPAS, D.; CHROUSOS, G. P.; WILDER R.L.; CUPPS, T. et al. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **Ann Intern Med.** 1993; 119: 1198-1208.

CALICH V.; VAZ, C. Sistema Imune Frente aos Tumores. In: **Imunologia**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2001 p. 250 – 252.

CARMO N. C. N. S., CORREIA M. I. T. D. A importância dos ácidos graxos ômega-3 no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2009; 55(3): 279-287.

COSTA, M. T.; FABENI, R. C.; APTEKMANN, K. P.; MACHADO, R. R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p. 967-974, 2003.

CROFFORD L. J. COX-1 and COX 2 tissue expression: implications and predictions. **J Rheumatol**, 1997; 24: 15-19.

DAGLI, M. L. Z. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental. 148f. **Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparativa)**- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

DUBOIS R. N.; ABRAMSON S. B.; CROFFORD L. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, 1998; 12: 1063-1073.

EDWARDS, P.; CENDAN, J. C.; TOPPING, D. B.; MOLDAWER, L. L.; MACKAY, S.; COPELAND III, E. M.; LIND, D. Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth in vitro, but stimulates tumorigenesis and lung metastasis in vivo. **J. Surg. Res.**, v.63, n. 1, p. 49-52, 1996.

EHRlich, P. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. **Arb. Inst. Exp. Ther. Frankfurt**, v.1, p. 78-80, 1906.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M. et al. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v.14, p.125-132, 1990.

FITZPATRICK, F. A.; SOBERMAN R. Regulation of eicosanoids. **J Clin Invest**, 2001; 107: 1347-1351.

FORTE W. C. N. Células fagocitárias. In: **Imunologia do Básico ao Aplicado**. Porto Alegre: Editora artmed, 2007 p. 34-35.

FOSSLIEN E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX-2) inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. **Crit Rev Clin Lab Sci**, 2000; 37: 431-502.

GOULDING, N. J.; GUYRE, P. M. Regulation of Inflammation by Lipocortin 1. **Immunology Today** 1992; 13: 295-297.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Câncer. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002 p. 34 - 35.

HAJJAR, L. A.; PINHEIRO, A. M. C. Ação do furoato de mometasona sobre as citocinas inflamatórias. **An Bras Dermatol** 1999; 74(1): 3-22.

HAY, D. W. P.; TORPHY, T. J.; UNDEM, B. J.; **Trends Pharmacol. Sci.** 1995, 16, 304.

KUMLIN, M.; DAHLÉN, S. E.; **Biochem. Biophys. Acta** 1990, 1044, 201.

LALA, P. K.; PARHAR, R. S. Changes in the host natural killer cell population in the mice during development. 1. Kinetics and “in vivo” significance. **Cell. Immunology**, v.93, p.250-261, 1985.

LALA, P. K.; ORUCEVIC, A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. **Cancer Metastasis Rev**, v.17, n. 1, p. 91-106, mar. 1998.

MARTINS J. M., GRUEZO N. D. Ácido graxo w-6 na etiologia do câncer de cólon e reto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2009; 55(1): 69- 74.

MELILLO, G.; MELILLO, E.; **Clin. Appl. Immunol. Rev.** 2001, 1, 235.

MORALES, J.R.; VÉLEZ, D.; SUBIZA, J.L. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Exp. Hematol.**, v.27, p.1757-1767, 1999.

MUMENTHALER, S. M.; ROZENGURT, N.; LIVESAY, J. C.; SABAGHIAN, A.; CEDERBAUM, S. D., GRODY, W. W. Expression of arginase II in prostate cancer. **International journal of oncology**, v.32, n.2, p. 357-365, fev. 2008.

MURAKAMI M., NARABA H., TANIOKA T., SEMMYO N, NKATARI Y. KOJIMA F, IKEDA T et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenases-2. **J. Biol. Chem**, 2000; 275: 32783-32792.

NICOLETE R. Estudos sobre o efeito da administração in vivo de microesferas biodegradáveis contendo leucotrieno B₄ ou prostaglandina E₂ em modelo de histoplasmoze murina. 146f .Tese

(Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

NOVAES, M. R. G. Efeitos da suplementação nutricional com L-arginina no tumor de Walker 256 [tese]. Brasília (DF): Universidade de Brasília, 1999.

OGILVIE, G.K.; WALTERS, L.M.; GREELEY, S.G. et al. Concentrations of alpha 1-acid glycoprotein in dogs with malignant neoplasia. **J. Am. Vet. Assoc.**, v.203, p.1155-1146, 1993.

PETERS-GOLDEN, M.; BROCK, T. G.; **Am. J. Respir. Crit. Care** 2000, 161, S36.

RADMARK, O. P.; **Am. J. Respir. Crit. Care** 2000, 161, S11.

ROBERTS II, L. J.; MARROW, J. D. Anagesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman and Gilman's the pharmacological basics of therapeutics**. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap. 27, p. 687-731.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. **Patologia estrutural e funcional**, 5. ed. Guanabara Koogan, 1996.

SANO H., KAWAHITO Y., WILDER R. L. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in human colorectal cancer. **Cancer Res.** 1995; 55: 3785-3789.

SCHUTZ, A. B. et al. Estudo comparativo dos efeitos biológicos do Tenoxicam, Indometacina, Dexametasona e Metotrexato em granulomas induzidos pela placa microbiana dental. **Revista Faculdade de Odontologia Bauru**; 5(3/4):1-8, jul/dez. 1997.

SCWIEBERT, L. et al. Glucocorticosteroid inhibition of Cytokine production. Relevance to antiallergic actions. **J Allergy Clin Immunol** 1996; 97: 143-52.

SEGAL A. W. How neutrophils kill microbes. **Ann Rev Immunol** 23: 197-223, 2005.

SHARON, J. Imunologia do Câncer. In: **Imunologia Básica**. Tradução: Patrícia Josephine Voeux. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000 p. 197 – 204.

SNYDER, S.H.; BREDET, D. S. Biological role of nitric oxide. **Scientific American**, p. 28-35, may. 1992.

SPECTOR, S. L.; **Ann. Allerg. Asthma Im.** 1995, 75, 463.

TORREZINI T., ATHANAZIO D. A. Imunovigilância e Imunoedição de neoplasias: implicações clínicas e potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2008; 54(1): 63-77.

UEDA, N.; KANEKO, S.; YOSHIMOTO, T.; YAMAMOTO, S.; **J. Biol. Chem.** 1986, 261, 7982.

VISSERS, Y. L. J. et al. Plasma arginine concentrations are reduced in cancer patients: evidence for arginine deficiency? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, n.5, p. 1246-6, mai. 2005.

XIE, K., HUANG, S. Contribution apoptosis to cancer metastasis inefficiency. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 34, n. 8, p. 969-986, apr. 2003.

WANNAMACHER, L. E.; M. B., FERREIRA. Antiinflamatórios não esteróides. In: FUCHS, F. D.; WANNAMACHER, L. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004^a. Cap. 21, p. 187-193

WOLF, G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. **Histol Histopathol**, Murcia, v.12, n.1, p. 251-61, jan. 1997.

YAMAMOTO, S.; **Prostag. Leukotr.** Ess. 1989, 35, 219.