

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

THAINARA FERLA NOVAIS DE CASTRO

INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR (PCNA) EM TUMOR MURINO FRENTE A INIBIÇÃO NÃO SELETIVA DAS
CICLOXIGENASES

BAURU

2019

THAINARA FERLA NOVAIS DE CASTRO

INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR (PCNA) EM TUMOR MURINO FRENTE A INIBIÇÃO NÃO SELETIVA DAS
CICLOXIGENASES

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado como parte dos
requisitos para obtenção do título de bacharel
em Biomedicina – Universidade do Sagrado
Coração.

Orientador: Prof.º Dr. Geraldo Marco Rosa
Junior.

Coorientadora: Prof.ª Dr. Dulce Helena Jardim
Contantino

BAURU

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com
ISBD

C355i

Castro, Thainara Ferla Novais de

Investigação da expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) em tumor murino frente a inibição não seletiva das ciclooxigenases / Thainara Ferla Novais de Castro. -- 2019.

28f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Júnior

Coorientadora: Prof.^a Dra. Dulce Helena Jardim Constantino

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) -
Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. PCNA. 2. Proliferação celular. 3. Tumor de Ehrlich. 4. Anti-inflamatório não seletivo. I. Júnior, Geraldo Marco Rosa. II. Constantino, Dulce Helena Jardim. III. Título.

THAINARA FERLA NOVAIS DE CASTRO

INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR (PCNA) EM TUMOR MURINO FRENTE A INIBIÇÃO NÃO SELETIVA DAS
CICLOXIGENASES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina -
Universidade do Sagrado Coração.

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora:

Prof.^o Dr. Geraldo Marco Rosa Junior (Orientador)

Universidade do Sagrado Coração

Prof.^a Dra. Dulce Helena Jardim Constantino (Coorientadora)

Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth

Universidade do Sagrado Coração

RESUMO

O câncer é um importante problema de saúde pública e o número de casos vem aumentando de forma considerável em todo o mundo. Os tumores são formados por conta das células que sofrem alterações neoplásicas e se proliferam excessivamente, podendo comprimir ou invadir estruturas normais adjacentes. Alguns autores relatam a eficácia da investigação da expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), por ser este marcador um indicador útil do comportamento biológico de alguns tumores, sendo comparável, ou até mesmo superior, aos resultados obtidos em métodos tradicionais. O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) em tumor de Ehrlich transplantado em camundongos frente o uso de droga inibitória não seletiva de cicloxigenases, sendo utilizadas amostras de material biopsiado fixado em formalina e posteriormente mantido em etanol a 70% e emblocado em parafina histológica, quantificadas pela técnica de imuno-histoquímica através da aplicação de anticorpos primários e secundários e comparados estatisticamente pelo teste “*t*” de *student*. Como o valor de *p* foi menor ao nível de significância (0,05), evidenciou-se diferença estatisticamente significativa no número de células marcadas pela expressão do PCNA entre os dois grupos estudados, concluindo, então, que este pode ser considerado um bom marcador de estudo de proliferação celular, principalmente quando se avalia o desenvolvimento tumoral tratado com drogas anti-inflamatórias, auxiliando em um prognóstico confiável e eficaz na investigação da expressão desse antígeno em células neoplásicas.

Palavras-chave: PCNA. Proliferação celular. Tumor de Ehrlich. Anti-inflamatório não seletivo.

ABSTRACT

Cancer is a major public health problem and the number of cases is increasing considerably worldwide. Tumors are formed on account of cells that undergo neoplastic changes and proliferate excessively and may compress or invade adjacent normal structures. Some authors report the effectiveness of the investigation of Nuclear Cell Proliferation Antigen (PCNA) expression, as this marker is a useful indicator of the biological behavior of some tumors, being comparable or even superior to the results obtained in traditional methods. The objective of this work is to investigate the expression of Cell Proliferation Nuclear Antigen (PCNA) in mouse transplanted Ehrlich tumor against the use of a non-selective cyclooxygenase inhibitory drug, using formalin-fixed biopsy samples and subsequently kept in ethanol at 70% and embedded in histological paraffin, quantified by immunohistochemistry using primary and secondary antibodies and statistically compared by Student's t-test. As p value was lower at the significance level (0,05), there was a statistically significant difference in the number of cells marked by PCNA expression between the two groups, concluding that it can be considered a good marker of cell proliferation study, especially when evaluating tumor development treated with anti-inflammatory drugs, helping in a reliable and effective prognosis in the investigation of the expression of this antigen in neoplastic cells.

Keyword: PCNA. Cell proliferation. Ehrlich tumor. Non-selective anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fotomicrografia das células marcadas pela expressão do PCNA (aumento de 400X), onde A apresenta as células antes de serem quantificadas e B, as células já marcadas manualmente 17
- Figura 2 - Fotomicrografias das lâminas montadas, onde: de A a E são campos do grupo Controle e de F a J são campos do grupo Tratado..... 20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cronograma.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 2 - Contagem de células marcadas pela expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular em grupos Controle e Tratado	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	NEOPLASIA.....	8
1.2	RESPOSTA INFLAMATÓRIA ÀS DOENÇAS	9
1.3	RESPOSTA INFLAMATÓRIA ÀS NEOPLASIAS	10
1.4	MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR DROGAS INIBITÓRIAS DE CICLOXIGENASES.....	11
1.5	O TUMOR DE EHRlich COMO MODELO EXPERIMENTAL EM NEOPLASIA ..	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	13
3	JUSTIFICATIVA	14
4	MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1	AMOSTRAS	15
4.2	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA	15
4.2.1	Desidratação e diafanização material.....	15
4.2.2	Infiltração e inclusão em parafina	15
4.2.3	Microtomia e montagem dos cortes em lâmina	16
4.2.4	Montagem das Lâminas	16
4.2.5	Desparafinização e rehidratação	16
4.2.6	Coloração por hematoxilina e eosina.....	16
4.2.7	Montagem dos cortes entre lâmina e lamínula.....	16
4.3	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO PCNA.....	17
4.5	QUANTIFICAÇÃO DO PCNA	17
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
6	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública e o número de casos vem aumentando de forma considerável em todo o mundo (GUERRA *et al.*, 2005). Segundo dados da Organização Pari-Mundial da Saúde/OMS (2018), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença.

Os tumores são formados por conta das células que sofrem alterações neoplásicas e se proliferam excessivamente, podendo comprimir ou invadir estruturas normais adjacentes (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

A utilização de técnicas imuno-histoquímicas, usando marcadores biológicos de proliferação celular, aplicados a análise histopatológica, permite a compreensão das alterações morfo-funcionais que ocorrem no processo de transformação neoplásica. Estas técnicas aliadas aos dados clínicos e histopatológicos fornecem informações úteis sobre o comportamento biológico e possível prognóstico das neoplasias, além de auxiliar no estabelecimento de terapias a serem aplicadas.

Segundo ARISAWA *et al.* (1999), a proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular, que ocorre em quatro fases distintas: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período após a replicação do DNA (G2) e a fase mitótica (M) que culmina na divisão celular. A atividade proliferativa de qualquer tecido, ou neoplasia, pode ser determinada pela sua taxa de crescimento e o tempo que estas levam para completar este ciclo.

Alguns autores relatam a eficácia da investigação da expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), por ser este marcador um indicador útil do comportamento biológico de alguns tumores, sendo comparável, ou até mesmo superior, aos resultados obtidos em métodos tradicionais. A concentração do PCNA é variável durante as etapas do ciclo celular, sendo maior na fase G1 tardia, com pico na fase G1/S, estando praticamente ausente nas fases G2 e M (ARISAWA, 1999).

1.1 NEOPLASIA

Crescimento e diferenciação são características fundamentais dos seres vivos não só para a formação da estrutura do organismo, como também para a manutenção da sua forma e

composição. Quando essas propriedades se encontram alteradas (autonomia na proliferação e diferenciação celular), podemos estar diante de uma neoplasia (GUIDUGLI-NETO, 1997).

Neoplasia pode ser definida como um distúrbio do crescimento celular que é desencadeado por uma série de mutações adquiridas que afetam uma única célula e sua patogênese clonal. As mutações fornecem para as células neoplásicas uma vantagem de sobrevivência e de crescimento, resultando em proliferação excessiva que é independente de sinais fisiológicos de crescimento (ROBBINS; COTRAN, 2016).

O principal determinante do crescimento tumoral é o fato de que ocorre maior produção do que morte de células em um determinado período de tempo. Apenas o tempo de divisão não se responsabiliza pelo aumento do tumor, pois as células tumorais não se dividem necessariamente com maior rapidez do que as células normais (DINTZIZ; HANSEL, 2007).

Os tumores podem ser classificados como benigno ou malignos. Tumores benignos se assemelham ao seu tecido de origem e não penetram as bordas de tecidos adjacentes nem se disseminam para sítio distantes, enquanto que tumores malignos podem se diferenciar do tecido de origem (morfológica e funcionalmente), podem invadir e destruir as estruturas adjacentes e se disseminam para áreas distantes (metastizam), podendo levar a morte (DINTZIZ; HANSEL, 2007; ROBBINS; COTRAN, 2016).

1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA ÀS DOENÇAS

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis a fim de eliminar os agentes agressores. (CRUVINEL *et al.*, 2010). Compreende basicamente dois mecanismos de defesa: uma resposta inespecífica (resposta inata) e uma resposta imunológica, ou adaptativa (COUTINHO, 2009).

A imunidade inata representa uma resposta rápida e limitada a um número grande de estímulos e é representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores. As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer (NK). Já a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas e suas principais características são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo.

A reação inflamatória aguda é caracterizada por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular na região afetada, exsudação de fluido (edema), dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, formação de tecido de granulação e reparo tecidual (LIMA *et al.*, 2007).

Existem substâncias envolvidas no processo inflamatório como as prostaglandinas, modulador pró-inflamatório derivado do metabolismo do ácido araquidônico que, sob estímulos de patógenos e citocinas, são translocadas para o citoplasma das células por fosfolipases A₂. O ácido araquidônico quando liberado, são convertidos pelas cicloxigenases (COXs) em prostaglandinas. Há duas isoformas de cicloxigenases, a COX-1, presente constitutivamente em vários tipos de células; e a COX-2 que está ausente nas condições basais, mas é induzida por vários estímulos como citocinas produzidas por leucócitos em resposta a danos, infecções bacterianas e outros fatores (PUTTINI, 2006).

1.3 RESPOSTA INFLAMATÓRIA ÀS NEOPLASIAS

O reconhecimento tumoral pelo sistema imunológico pode se processar de maneira distintas e complementares. Elementos da imunidade inata e da imunidade adaptativa contribuem na montagem da resposta imune contra tumores.

Os macrófagos (imunidade inata) são encontrados frequentemente em microambientes tumorais e, quando num contexto apropriado, podem secretar citocinas com atividade tumoricida, como TNF- α . A secreção de TNF- α induz morte por apoptose (desencadeada por ativação do receptor de TNF- α), frequentemente seguido de fagocitose e subsequente criação de ambiente anti-inflamatório. Porém, estudos relatam que o infiltrado de macrófagos em tumores está associado antes a uma aceleração da progressão dos tumores do que realmente sua contenção.

O reconhecimento e lise das células por células NK também representa resposta importante da imunidade inata contra tumores. Neste caso, receptores das células NK reconhecem antígenos da célula tumoral, liberando seus grânulos intracelulares enriquecidos em perforinas, dando início à lise celular. A expulsão de perforinas das células NK e sua inserção na membrana da célula tumoral está associada a morte da célula alvo.

Entre os efetores da resposta imune adaptativa encontram-se os linfócitos B e linfócitos T. Na maioria das imunizações contra o câncer tem se considerado como objetivo final a geração de linfócitos T antígenos-específicos. Neste contexto, as células

apresentadoras de antígenos (APC) ocupa uma posição central podendo capturar antígenos tumorais, processá-los e apresenta-los em um contexto MHC I ou MHC II, estimulando assim subpopulações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ que atariam montando uma resposta efetora específica que resultaria na geração de linfócitos T citotóxicos que induziriam a morte das células tumorais.

Linfócitos B participariam da resposta imune (adaptativa) contra tumores produzindo anticorpos específicos contra antígenos tumorais. Esses anticorpos se ligariam aos antígenos específicos das células tumorais facilitando seu reconhecimento e destruição pelas células NK ou fagocitose por macrófagos (opsonização), ou ainda ativando a via do complemento, levando à lise tumoral (CHAMMAS *et al.*, 2009)

1.4 MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR DROGAS INIBITÓRIAS DE CICLOXIGENASES

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) estão entre as drogas mais prescritas e usadas no mundo e exercem suas ações principalmente através da inibição das ciclooxigenases (COX), reduzindo a biossíntese de prostaglandinas fisiológicas e fisiopatológicas (CARVALHO, 2004; LAGES *et al.*, 1998).

A inibição da COX-1 por AINE convencionais acarretaria alguns dos efeitos adversos, como gastropatia e nefropatia. Os inibidores seletivos de COX-2 potencialmente representariam vantagem em relação aos AINE não seletivos, pois permaneceria a atividade anti-inflamatória, sem o aparecimento dos efeitos adversos consequentes à inibição enzimática não seletiva (VANNMACHER; BREDEMEIER, 2004).

A indometacina, utilizada neste estudo como modulador inflamatório, pertence à classe de medicamentos chamados de inibidores da síntese de prostaglandinas (AINEs), inibindo tanto a COX-1 como a COX-2 (não seletivo).

1.5 O TUMOR DE EHRLICH COMO MODELO EXPERIMENTAL EM NEOPLASIA

O tumor de Ehrlich é um tipo de tumor transplantável utilizado para avaliações experimentais, originário de células epiteliais de carcinoma mamário de ratas que cresce na forma sólida quando implantado por via subcutânea e na forma ascética ao ser inoculado por via intraperitoneal (VERÇOSA JUNIOR *et al.*, 2006; VERÇOSA *et al.*, 2004). A vantagem do uso das neoplasias transplantáveis, em comparação as demais, recai sobre o conhecimento

prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e o desenvolvimento rápido da neoplasia que restringe o tempo de estudo (SOUZA *et al.*, 2013).

O tumor de Ehrlich é amplamente utilizado como modelo tumoral experimental devido à sua semelhança com tumores epiteliais indiferenciados humanos (OLENEVA, 2019, tradução nossa).

Pesquisas utilizando o modelo experimental murino foram considerados um bom modelo experimental porque as mamas das ratas sofrem as mesmas modificações morfológicas e cinéticas que as humanas (SOUZA *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) em tumor de Ehrlich transplantado em camundongos frente o uso de droga inibitória não seletiva de cicloxigenases.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

a) Avaliar a eficácia do PCNA como marcador de estudo e acompanhamento do desenvolvimento celular no tumor de Ehrlich comparando dois grupos: tratados e não tratados com AINE;

b) Investigar se o uso de drogas anti-inflamatórias influencia no processo de proliferação celular tumoral e, conseqüentemente, a relação da expressão do PCNA com a inibição da COX-2.

3 JUSTIFICATIVA

A determinação da atividade proliferativa em tumores pode fornecer informações importantes para a formulação de um prognóstico confiável, identificando, por meio de marcações histo e imuno-histoquímicas, a fração de células em proliferação. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína necessária à síntese e reparo de DNA, apresentando seu pico máximo atingido na fase S do ciclo celular (STREFEZZI *et al.*, 2010). Como o PCNA foi descrito como marcador de atividade proliferativa, é possível correlacionar sua marcação com a evolução, resposta ao tratamento ou até mesmo recidiva desses tumores (NETO *et al.*, 2001; BARROS, 2006).

Estudos já revelaram a expressão das enzimas Cicloxigenases (COX) em diversos tecidos, sendo a COX-I encontrada em quase todos os tecidos de forma fisiológica, enquanto a COX-II se revela por indução de processos patológicos. Como é observado a expressão da enzima COX-II em tumores e a presença de um intenso processo inflamatório devido a síntese de prostaglandinas, a investigação do PCNA pode auxiliar no melhor entendimento da sua progressão, bem como a correlação de níveis aumentados de COX-II com a atividade proliferativa celular (MACHADO *et al.*, 2014; COSTA, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram utilizadas neste estudo amostras de material biopsiado fixado em formalina e posteriormente mantido em etanol a 70% e embocado em parafina histológica, em estudo anterior desenvolvido sob orientação da Prof.^a Dra. Dulce Constantino.

Foram inoculados com o tumor sólido de Ehrlich, por via subcutânea 20 camundongos suíços, machos, com 2 meses de idade. Os animais foram divididos em dois grupos com 10 animais cada e tratados com solução fisiológica, por via ip, 1x ao dia ou com indometacina, 2mg/kg de peso animal, 1x ao dia. O período de tratamento dos dois grupos foi de 21 dias no total.

No presente estudo, foram utilizadas 5 amostras de cada grupo (Controle e Tratado), totalizando 10 amostras.

4.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.2.1 Desidratação e diafanização material

Após a fixação, o excesso de fixador foi removido por lavagem em água corrente por um período de 30 min a 1h; posteriormente os tecidos foram passados em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, até o álcool absoluto, onde a água foi totalmente removida. São seis banhos sucessivos de 1h cada, nas seguintes soluções: álcool 70, 80, 90%, álcool absoluto I, II e III. Para diafanização, os tecidos foram colocados em xilol, três banhos sucessivos de 1h cada nas seguintes soluções: xilol I, II e III.

4.2.2 Infiltração e inclusão em parafina

O material foi transferido do agente diafanizador para a parafina derretida (56 e 58°). Para infiltração do material por parafina usou-se dois banhos sucessivos de 1h cada nas soluções parafina I e parafina II. Com auxílio de pinça aquecida, foi realizada a inclusão dos tecidos em parafina. Depois da inclusão, as formas foram resfriadas no freezer para obtenção de blocos para microtomia.

4.2.3 Microtomia e montagem dos cortes em lâmina

Os blocos foram posicionados no micrótomo e foram realizados cortes de 5µ de espessura, posteriormente transferidos para um banho-maria histológico para desparafinização.

4.2.4 Montagem das Lâminas

Os cortes foram transferidos para as lâminas revestidas com albumina, que tem propriedades adesivas e propicia uma melhor fixação do corte na lâmina. As lâminas foram levadas para uma estufa a 55°C, para a secagem da água e coagulação do filme adesivo.

4.2.5 Desparafinização e rehidratação

Antes de corar os cortes, a parafina residual foi removida. Para tanto foi empregado xilol como solvente. As lâminas passaram por banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: xilol I, II e III. Em seguida os tecidos foram reidratados por banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: álcool absoluto I, II e III, álcool 90%, 80%, 70% e água destilada.

4.2.6 Coloração por hematoxilina e eosina

Sequência de coloração: hematoxilina (15 min) → álcool clorídrico 1% (três mergulhos) → água corrente (até ficar violeta) → eosina (2,5 min) → água acética 1% (três mergulhos). O material foi desidratado em álcool em banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: álcool 70, 80, 90%, álcool absoluto I, II e III. Posteriormente foi realizada a clarificação do tecido com xilol em banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: Xilol I, II e III.

4.2.7 Montagem dos cortes entre lâmina e lamínula

Sobre o material foi colocado 100µL de meio de montagem permont e depositado uma lamínula. O material foi então avaliado por microscopia óptica de luz.

4.3 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO PCNA

A avaliação do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) foi feita pela técnica de imuno-histoquímica. Para tanto, as lâminas histológicas da pele dos ratos foram desparafinizadas usando xilol e hidratadas pela aplicação de álcool absoluto. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6.0). A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio, enquanto que foi usado leite em pó dissolvido em PBS para o bloqueio das proteínas restantes.

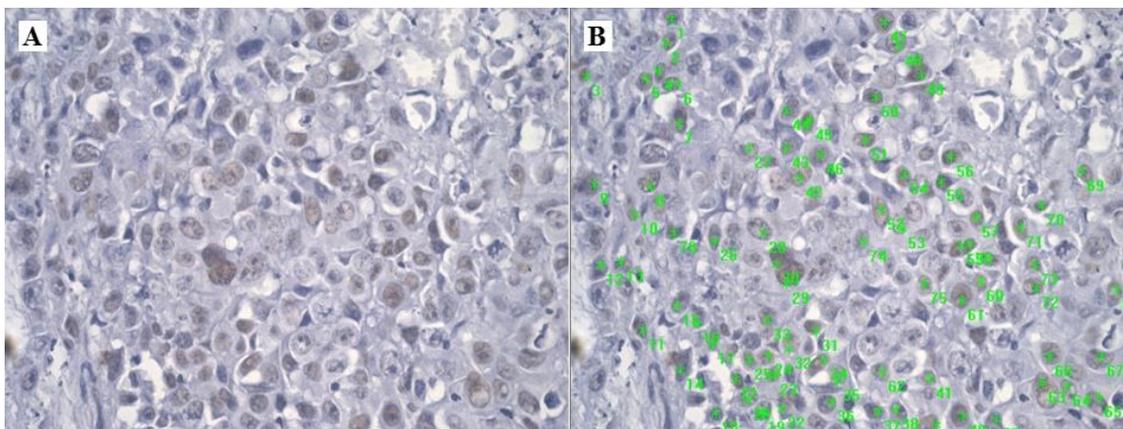
Foram aplicados anticorpos primários e secundários, com diferença de 24 horas entre as incubações. O cromógeno DAB (Diaminobenzidina) foi usado na revelação e a Hematoxilina de Carazzi para corar as lâminas histológicas.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DO PCNA

Foram fotomicrografados, com aumento de 400X, cinco campos diferentes de cada uma das 10 amostras utilizadas (sendo 5 amostras Controle e 5 amostras Tratadas, totalizando 50 campos), onde as células que apresentaram expressão do PCNA (coradas em marrom) foram quantificadas através do programa Image Pró Plus, como observado na Figura 1.

Após marcação manual das células (marcação *green star*), o programa liberou o número de células contadas em cada campo em uma tabela do Excel.

Figura 1 - Fotomicrografia das células marcadas pela expressão do PCNA (aumento de 400X), onde: “A” apresenta as células antes de serem quantificadas e “B”, as células já marcadas manualmente



Fonte: elaborado pela autora.

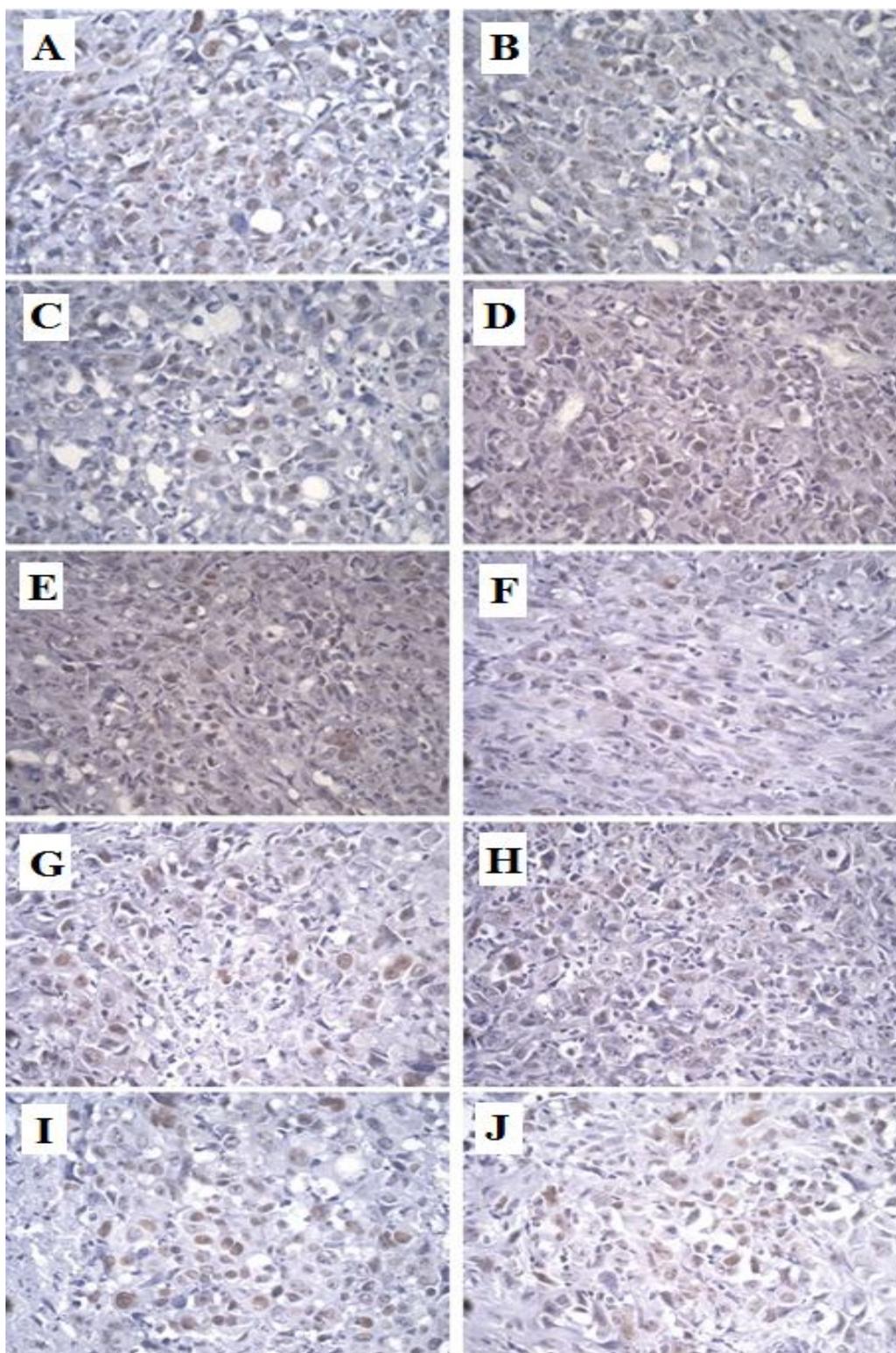
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na comparação da variável de estudo foi empregado o Test “t” de *student* pelo Excel, considerando o nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após aplicação da técnica de imuno-histoquímica e montagem das lâminas, foi possível observar em microscópio (aumento de 400X) as células marcadas com coloração marrom, representando a expressão o PCNA nessas células, tanto no grupo Controle como no grupo Tratado, como pode ser observado na Figura 2 (cada imagem representa 1 dos 5 campos analisados em cada amostra).

Figura 2 - Fotomicrografias das lâminas montadas, onde: de A a E são campos do grupo Controle e de F a J são campos do grupo Tratado



Fonte: elaborado pela autora.

A partir das imagens obtidas, as células marcadas foram quantificadas (Tabela 2) e os resultados foram comparados entre os dois grupos.

Tabela 1 - Contagem de células marcadas pela expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular em grupos Controle e Tratado

Grupo Controle	Número de células contadas	Grupo Tratado	Número de células contadas
C1C1*	104	T1C1**	63
C1C2	88	T1C2	62
C1C3	71	T1C3	111
C1C4	99	T1C4	61
C1C5	92	T1C5	51
C2C1	99	T2C1	74
C2C2	85	T2C2	130
C2C3	76	T2C3	123
C2C4	78	T2C4	102
C2C5	88	T2C5	75
C3C1	58	T3C1	66
C3C2	69	T3C2	53
C3C3	92	T3C3	41
C3C4	68	T3C4	41
C3C5	91	T3C5	54
C4C1	114	T4C1	78
C4C2	116	T4C2	81
C4C3	109	T4C3	34
C4C4	97	T4C4	57
C4C5	106	T4C5	52
C5C1	152	T5C1	71
C5C2	113	T5C2	80
C5C3	108	T5C3	63
C5C4	87	T5C4	57
C5C5	90	T5C5	73
Média	94		70,12

Fonte: elaborado pela autora

*Controle 1 Campo 1

**Tratado 1 Campo 1

Os resultados analisados estaticamente através do teste T de *student* demonstrou valor de p menor ao nível de significância (0,05), rejeitando-se a hipótese nula, ou seja, evidenciou-se diferença estatisticamente significativa no número de células marcadas pela expressão do PCNA entre os dois grupos estudados.

Como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) têm um efeito anti-inflamatório por se ligarem à isoforma das enzimas ciclooxigenase (COX), eles podem atuar no desenvolvimento do câncer através da COX, sendo uma opção terapêutica e/ou quimiopreventiva.

Alguns estudos indicam que o uso de inibidores da COX é uma das principais formas de terapia no tratamento de tumores humanos *in vitro* e *in vivo*, proporcionando inibição das respostas vasculares e inflamação celular, tornando-se um alvo potencial na prevenção e tratamento do câncer.

Neste estudo, foram usados parâmetros morfológicos para demonstrar a atividade antiproliferativa do AINE utilizado. A expressão imuno-histoquímica do PCNA tem sido muito estudada e está associada à divisão celular, detectando o número de células que estão em ciclo de proliferação (predominantemente nas fases G1 e S).

Como os resultados demonstraram uma diminuição na expressão de PCNA em animais tratados quando comparado com o grupo controle, esse pode ser considerado um mecanismo viável através do qual esse agente quimioterápico controlou a proliferação do tumor de Ehrlich e conseqüentemente o desenvolvimento do tumor (SOUZA *et al.*, 2014, tradução nossa), já que uma das mais importantes características da transformação neoplásica é a perda do controle do ciclo celular, o que possibilita sua expansão clonal (SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006).

O tumor murino de Ehrlich, por ser um tumor experimental muito utilizado em pesquisa básica, guarda muitas semelhanças com tumores altamente anaplásicos de ocorrência na espécie humana, como os adenocarcinomas mamários e carcinomas transicionais da bexiga (NETO *et al.*, 2001). O antígeno PCNA tem expressão elevada associada à agressividade tumoral em tumores humanos (ref), e em nosso estudo demonstramos que há associação entre os níveis de COX-2, a expressão PCNA e, portanto, com a agressividade tumoral.

Embora o tratamento não tenha sido efetivo na eliminação do tumor, pode-se observar benefício em sua redução. Estudos adicionais seriam necessários para verificar se o tratamento de animais portadores do tumor de Ehrlich apresentam aumento na taxa de sobrevivência e a qualidade da mesma, uma vez que a análise neste estudo foi pontual, com o objetivo principal de verificar se havia relação PCNA com a inibição COX-2.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos e comparados com estudos de outros autores, concluímos que o antígeno PCNA pode ser correlacionado com a inibição da COX-2 através uso de anti-inflamatório não esteroidais devido a diminuição significativa da sua expressão nas células tumorais, quando comparadas ao grupo controle (não tratado), podendo ser considerado um bom marcador de estudo de proliferação celular, auxiliando em um prognóstico mais confiável e preciso na investigação do desenvolvimento de tumores.

REFERÊNCIAS

- GUERRA, M. R; GALLO, C. V. M; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 51, p. 227-234, maio 2005. Disponível em: <http://files.rachelmarins.webnode.com.br/200000020-3c6b73d65a/Risco%20de%20C%C3%A2ncer%20no%20Brasil%20-%20estudos%20epidemiol%C3%B3gicos,%202005.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2019.
- ORGANIZAÇÃO PARI-MUNDIAL DA SAÚDE/OMS. Folha informativa – câncer. *In*: **paho.org**. Brasília, DF, 2018. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094. Acesso em: 5 nov. 2019.
- OLIVEIRA, R. B; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 976-984, fev. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n6a/12774.pdf>. Acesso em: 21 maio 2019.
- ARISAWA, E. A. L. *et al.* Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67 - Breve Revisão. **Faculdade de Odontologia de São José dos Campos**, São Jose dos Campos, v. 2, n. 1, jun. 1999. Disponível em: <http://ojs.ict.unesp.br/index.php/cob/article/view/37/17>. Acesso em: 21 mai. 2019.
- GUIDUGLI-NETO, J. **Elementos de patologia geral**. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1997.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. **Patologia**: bases patológicas das doenças. 9 ed. São Paulo: Elsevier Editora, 2016.
- HANSEL, D. E.; DINTZIS, R. Z. **Patologia**: Fundamentos de Rubin. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.
- CRUVINEL, W. de M. *et al.* Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 4, n. 50, p. 435-361, maio, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbr/v50n4/v50n4a08>. Acesso em: 15 abr. 2019.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, Sônia S. Flavonoides: Potenciais agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 241-246, jun. 2009. Disponível em: <http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/51/98>. Acesso em: 15 abr. 2019.
- LIMA, R. R. *et al.* Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 21, n. 2, abr. 2007. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?pid=S0101-59072007000200006&script=sci_arttext. Acesso em: 15 abr. 2019.

PUTTINI, S. M. B. **Avaliação da resposta inflamatória desencadeada pelas telas de prolipropileno e politetrafluoretileno expandidas implantadas no espaço intraperitoneal. Estudo experimental em camundongos.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2006. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/2168/1/Sinthia%20Maria%20Benigno%20Puttini.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2019.

CHAMMAS, *et al.* Imunologia clínica das neoplasias. **Imunologia Clínica na Prática Médica**, São Paulo, p. 447-460, 2009. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/download/IMUNOLOGIA/leitura%20anexa%204.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2019.

CARVALHO, Wilson Andrade; CARVALHO, Rosemary Duarte Sales; RIOS-SANTOS, Fabrício. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxigenase-2: Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, [S.l.], v. 54, n. 3, p. 448 - 464, mai. 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/%0D/rba/v54n3/en_v54n3a17.pdf. Acesso em: 18 abr. 2019.

LAGES, A. D. S. *et al.* Inibidores seletivos de prostaglandina endoperóxido sintase 2 (PGHS-2): nova estratégia para o tratamento da inflamação. **Química nova**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 761-771, nov./mar. 1998. Disponível em: [http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol21No6_761_v21_n6_\(16\).pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol21No6_761_v21_n6_(16).pdf). Acesso em: 18 abr. 2019.

WANNMACHER, L; BREDEMEIER, M. Antiinflamatórios não-esteróides: Uso indiscriminado de inibidores seletivos de cicloxigenase-2. **Uso racional de medicamentos**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 1-6, jan. 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Markus_Bredemeier/publication/246545317_Antiinflamatorios_ao-esteroides_Uso_indiscriminado_de_inibidores_seletivos_de_cicloxigenase-2/links/5497ff250cf2c5a7e3427bc7.pdf. Acesso em: 18 abr. 2019.

VERÇOSA JUNIOR, D. *et al.* Influência de *Agaricus Blazei Murrill* sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arq. Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 59, n. 1, p. 150-154, jul/nov. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v59n1/25.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2019.

VERÇOSA JUNIOR, D. *et al.* Quadro hematológico e peso do baço de camundongos com tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com *Agaricus blazei*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, Minas Gerais, v. 14, n. 1, p. 32-34, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v14s0/a13v14s0.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2019.

SOUZA, V. J. D. *et al.* Avaliação do crescimento do tumor de ehrlich sólido em camundongos. In: SEMINÁRIO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA , 1.,2013, [S.l.]. **Anais [...]** [S.l.]: Uniderp, 2013. Disponível em: <https://repositorio.pgsskroton.com.br/bitstream/123456789/427/1/AVALIA%20C3%87%20C3%83%20DO%20CRESCIMENTO%20DO%20TUMOR%20DE%20EHRlich%20S%20C3%93LIDO.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2019.

OLENEVA, E. *et al.* In vivo and in vitro application of near-infrared fiber optic probe for Ehrlich carcinoma distinction: Towards the development of real-time tumor margins

assessment tool. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, [S.L], v. 213, p. 12-18, abr. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30677734>. Acesso em: 19 abr. 2019.

STREFEZZI, R. D. F. *et al.* Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, p. 559-565, jul. 2010. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/37458209.pdf>. Acesso em: 21 de mar. 2019.

NETO, J. A. D. *et al.* ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA) EM CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DE BEXIGA. **Acta. Cir. Bras.**, São Paulo, v. 16, 2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502001000500019&lng=en&nrm=iso&tlng=pt#nt. Acesso em: 21 mar. 2019.

BARROS, S. S. L. V; FREITAS, R. A; SOUZA., L. B. Avaliação imuno-histoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e da proteína p53 em ameloblastomas tratados pela técnica da marsupialização 1. **Brazilian Dental Science**, v. 9, n. 1, p. 32-37, mar. 2006. Disponível em: <http://bds.ict.unesp.br/index.php/cob/article/view/265/204>. Acesso em: 21 mar. 2019.

MACHADO, L. H. de A. *et al.* Avaliações clínica e imunoistoquímica de tumores mamários em cadelas submetidas a tratamento com inibidor da cicloxigenase-2 (firocoxibe). **Veterinária e zootecnia**, [S.L.], v.00, n.11, p. 584-594, dez. 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/carlos_fonseca-alves/publication/274894450_avaliacoes_clinica_e_imunoistoquimica_de_tumores_mamarios_em_cadelas_submetidas_a_tratamento_com_inibidor_da_cicloxigenase-2_firocoxibe_clinical_and_immunohistochemical_evaluation_of_mammary_tumors_in/links/552bde540cf21acb091e9b19.pdf. Acesso em: 28 mar. 2019.

COSTA, S. S. **Proliferação celular e expressão da cicloxigenase-2 como parâmetros prognósticos na ceratose actínica e no carcinoma de células escamosas cutâneo em cães.** 2009. xi, 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Clínica Médica) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/89218>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

SOUZA, C. *et al.* Subcutaneous administration of ketoprofen delays Ehrlich solid tumor growth in mice. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352014000501376&lang=pt. Acesso em: 28 out. 2019.

SILVA; C, A. E. SANTOS F. G. A. CASSALI G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352006000400030&lang=pt. Acesso em: 28 out. 2019.