

**BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES
UNESP**

RESSALVA

Alertamos para ausência das Figuras de 1 a 15, não incluídas pelo autor no arquivo original.

LUCIANA BOFFONI GENTILE

**MODULAÇÃO POR PGE₂ NO PERFIL
DE SUBPOPULAÇÕES CELULARES E
DE CITOCINAS NA EVOLUÇÃO DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich
(TAE)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Patologia (Área de Concentração: Patologia).

**BOTUCATU
2001**

LUCIANA BOFFONI GENTILE

**MODULAÇÃO POR PGE₂ NO PERFIL
DE SUBPOPULAÇÕES CELULARES E
DE CITOCINAS NA EVOLUÇÃO DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH
(TAE)**

Orientadora: Dra. Denise Fecchio

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Patologia (Área de Concentração: Patologia).

**BOTUCATU
2001**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ELZA NUMATA

Gentile, Luciana Boffoni

Modulação por PGE₂ no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) / Luciana Boffoni Gentile. – 2001.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2001.

Orientador: Denise Fecchio

1. Tumores ascíticos - Aspectos imunológicos - Modelos animais

CDD 616.99295

Palavras-chave: Tumor de Ehrlich; Indometacina; Leucócitos polimorfonucleares; Macrófagos; Linfócitos; Citocinas

À minha orientadora,

Denise Fecchio,

Pessoa admirável, cuja orientação e disponibilidade foram fundamentais para a elaboração deste projeto. Agradeço sua extrema atenção, dedicação constante e senso crítico

À minha madrinha,

Clarinda,

Por ter acreditado em mim desde o início.

Dedico este trabalho.

*Aos meus pais,
Benvenuto e Annita
e à minha “vozinha” **Elvira**,
Que sempre me incentivaram, obrigada pela
compreensão, a todos meu amor e carinho.*

Trabalho realizado no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

Nesta caminhada, diversas pessoas foram fundamentais para que eu atingisse meu objetivo, às quais devo meus agradecimentos.

Agradeço:

À Dra. Sônia Jancar, por toda a atenção dispensada diante de minhas solicitações na fase experimental do trabalho.

Aos professores do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina-UNESP, Campus de Botucatu, que durante todo o curso de pós-graduação forneceram os fundamentos necessários para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Barbosa do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, pela análise estatística dos dados obtidos neste trabalho.

À Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, coordenadora do curso de pós-graduação em Patologia, pela compreensão e presteza em atender minhas solicitações.

Ao especialista de laboratório Richardt Gama Landgraf, pelo pronto auxílio e sugestões na dosagem de PGE₂.

Às minhas queridas e preciosas amigas Taninha, Suzana, Roueda e Cristina, obrigada pelo carinho, ajuda, convivência e também pela paciência. Foi um privilégio ter tido a oportunidade de **crescer** junto a vocês. De coração, muito obrigada.

Ao casal de amigos Reinaldo José da Silva e Márcia Guimarães, por todo apoio na fase experimental deste trabalho e sugestões valiosas para seu aprimoramento.

Às pós-graduandas Lívia Torres, Lízia Colares Vilela e Soraya Imon de Oliveira, pelo auxílio fundamental durante a fase experimental deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia, Fernanda Rodrigues, Lízia Colares Vilela, Márcia Dalalio, Moisés Guedes de Sene, Rita de Cássia Siqueira, Lívia Torres e Sílvia Scapolio, pelo companheirismo e pelos divertidos momentos de lazer.

Aos amigos da pós-graduação, pela simpatia e inestimável ajuda. E à Letícia Colares Vilela, pela atenção e preocupação em esclarecer minhas dúvidas.

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia, Izaíra Maximo Carvalho Prudente, Laura Ferrari de Castro, Claudinei Jurandir Figueira e Maria Isabel Corrêa da Silva, pela prestatividade e ajuda durante a fase experimental deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, Paulo César Georgeti, Étore Rodrigo Nunes da Silva e Glória Aparecida Rodrigues, pela disponibilidade na busca dos camundongos junto ao Centro de Bioterismo da UNICAMP e pela ajuda na manutenção e manejo dos animais utilizados neste estudo.

Às bibliotecárias Rosemary e Elza, pela atenção e auxílio prestados durante a pesquisa bibliográfica e organização da ficha catalográfica.

E a todos os demais que, direta ou indiretamente, de alguma forma, contribuíram para o bom êxito deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Sumário

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Animais	27
3.2. Neoplasia	27
3.3. Teste da viabilidade celular	28
3.4. Determinação do número total e contagem diferencial de células presentes na cavidade peritoneal	28
3.5. Determinação do perfil de citocinas	29
3.6. Inibição na síntese de prostaglandinas	30
3.7. Análise estatística	30
3.8. Delineamento Experimental	31
3.8.1. Cinética do efeito do tratamento com indometacina no influxo inflamatório ao TAE	31
3.8.2. Modulação na secreção de citocinas em animais portadores de TAE tratados com indometacina	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Avaliação do efeito do tratamento com indometacina na evolução do Tumor Ascítico de Ehrlich e no influxo inflamatório	34
4.1.1. Avaliação do número absoluto de células nucleadas peritoneais ..	35
4.1.2. Avaliação do número absoluto de células neoplásicas	36
4.1.3. Avaliação do número absoluto de neutrófilos segmentados	36
4.1.4. Avaliação do número absoluto de basófilos e mastócitos	37
4.1.5. Avaliação do número absoluto de eosinófilos	37
4.1.6. Avaliação do número absoluto de bastonetes neutrófilos	37
4.1.7. Avaliação do número absoluto de monócitos e macrófagos	43

4.1.8. Avaliação do número absoluto de linfócitos	43
4.1.9. Avaliação do número absoluto de células mesoteliais.....	44
4.2. Avaliação do efeito do tratamento com indometacina sobre o perfil de citocinas na evolução do Tumor Ascítico de Ehrlich	49
4.2.1. Avaliação dos níveis de PGE ₂	50
4.2.2. Avaliação do perfil de IL-1 α	50
4.2.3. Avaliação do perfil de IL-2	51
4.2.4. Avaliação do perfil de IL-4	51
4.2.5. Avaliação do perfil de IL-6	56
4.2.6. Avaliação do perfil de IL-10	56
4.2.7. Avaliação do perfil de IL-13	56
4.2.8. Avaliação do perfil de TNF- α	57
4.3. Avaliação da correlação entre os tipos celulares e as citocinas obtidas da cavidade peritoneal de camundongos	62
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8. RESUMO	98
9. ABSTRACT	101

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de células peritoneais presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 38
- Figura 2. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de células neoplásicas presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 39
- Figura 3. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de neutrófilos segmentados presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 40
- Figura 4. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de basófilos e mastócitos presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 41

- Figura 5. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 42
- Figura 6. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de monócitos e macrófagos presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 45
- Figura 7. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de linfócitos presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 46
- Figura 8. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de células mesoteliais presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 47

- Figura 9. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de PGE₂ presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 5 a 8 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 52
- Figura 10. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-1 α presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável. 53
- Figura 11. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-2 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.. 54
- Figura 12. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-4 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável. 55
- Figura 13. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-6 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável..... 58

-
- Figura 14. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-10 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável. 59
- Figura 15. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-13 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável. 60

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Análise de correlação entre célula neoplásica e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.	63
Tabela 2.	Análise de correlação entre neutrófilo segmentado e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.	64
Tabela 3.	Análise de correlação entre basófilo/mastócito e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.	65
Tabela 4.	Análise de correlação entre eosinófilo e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.	66
Tabela 5.	Análise de correlação entre bastonete neutrófilo e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.	67
Tabela 6.	Análise de correlação entre monócito/macrófago e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.	68
Tabela 7.	Análise de correlação entre linfócito e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.	69
Tabela 8.	Análise de correlação entre célula mesotelial e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.	70

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Desde o século passado vários pesquisadores, entre eles, Paul Ehrlich (1906), vêm estudando a evolução tumoral. Com este intuito, foi fundamental a obtenção de vários tipos de tumores transplantáveis em animais, comprovando a importância da reação inflamatória e da imunidade específica na relação hospedeiro-tumor.

Embora a presença em neoplasias de infiltrado inflamatório, constituído de macrófagos, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares, seja descrita há muito tempo pelos patologistas, seu significado clínico e biológico na evolução tumoral ainda não foi totalmente esclarecido.

Sob este aspecto, Mahoney & Leighton (1961) foram os primeiros a demonstrar que o tecido neoplásico apresentava uma reação inflamatória de menor intensidade que os tecidos normais. Os autores, passando um fio de algodão pelo estroma de várias neoplasias, mostraram que no tecido tumoral a inflamação era significativamente reduzida em comparação à observada em tecido normal no mesmo animal. A partir dessa comunicação, muitos pesquisadores demonstraram um efeito anti-inflamatório por parte das células neoplásicas (Fauve et al.,1974; Snyderman et al., 1976; Nathan,1979; Fecchio et al.,1990).

Diversas respostas fisiológicas e patofisiológicas, incluindo o crescimento e a promoção tumorais, são moduladas por vários metabólitos do ácido araquidônico (Noguchi et al., 1995; Ara & Teicher, 1996). As prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXs), prostaciclina e aldeídos malônicos são derivados do ácido

araquidônico, oriundo de fosfolipídeos da membrana celular sob a ação da enzima cicloxigenase (COX). A prostaglandina E₂ (PGE₂) é o eicosanóide predominantemente detectado em processos inflamatórios. Por este fato, é possível que produtos liberados durante a inflamação direcionem a via enzimática para este produto (Ara & Teicher, 1996). Apesar da natureza química dos fatores imunossupressores detectados em camundongos portadores de tumores não estar totalmente esclarecida, há evidências de que produtos do metabolismo do ácido araquidônico, principalmente PGE₂ (Capdevila et al., 1992), estejam envolvidos na supressão dos mecanismos de defesa do hospedeiro frente ao crescimento neoplásico (Ara & Teicher, 1996; Raz et al., 2000).

Prostaglandinas agem como importantes mediadores da inflamação pelo fato de regularem as funções de células, tais como linfócitos, células *natural killer* (NK) e macrófagos, que participam das respostas inflamatória e imune. Macrófagos produzem PGs e são também afetados por elas, sendo estimulados, quando em repouso, e inibidos, quando ativados (Ara & Teicher, 1996). Ou seja, as PGs podem afetar a atividade tumoricida de formas diferentes, dependendo do estado da ativação do macrófago. Contudo, a maioria dos estudos relacionados ao efeito das PGs sobre a função dos macrófagos indicam que a PGE₂ possui ação inibitória (Balch et al, 1984). Ainda, a PGE₂ inibe a expressão de antígenos do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) classe II na membrana de macrófagos, afetando sua interação com células T e inibe a atividade de células matadoras ativadas por linfoquina (LAK) e células NK,

comprometendo a resposta imune (Gehard et al., 1988; Baxevanis et al., 1993).

Em relação à resposta imune, as células T CD4 murinas se diferenciam, sob ativação, em células T auxiliaadoras de padrão 1 (Th1) que produzem IL-2 e IFN γ , ou em células T auxiliaadoras de padrão 2 (Th2) que produzem IL-4 e IL-5. Como resultado dessa diferença nos padrões de citocinas, os dois tipos de células estão associadas com funções diferentes. As células Th1 mediam citotoxicidade e hipersensibilidade do tipo tardia, ao passo que células Th2 induzem a ativação de células B, particularmente estimulando a secreção de IgG1 e IgE (Betz & Fox, 1991). Acredita-se que um dos mecanismos de regulação da atividade de células Th seja por sinais derivados de células apresentadoras de antígeno (APC) (Betz & Fox, 1991). Um imunomodulador secretado pela APC é a PGE₂, que possui efeitos múltiplos sobre o sistema imune, incluindo inibição da produção de IL-2 e IFN γ , inibição da proliferação de células T e inibição da produção de IL-1 e TNF α por parte de macrófagos (Kunkel et al., 1986; Betz & Fox, 1991).

Em neoplasias, há intrincadas relações entre as populações celulares inflamatória e imune, células neoplásicas e mediadores químicos liberados à distância ou localmente.

Estudos histológicos e por citometria de fluxo demonstram que neoplasias mamárias humanas são infiltradas por populações heterogêneas de células imunes, constituídas por diferentes proporções de células T, células B, células NK e macrófagos (Wong et al., 1998). O sistema imune é capaz de responder ao câncer de mama pela

ativação de leucócitos intratumorais, regionais e sistêmicos, sendo que a presença de leucócitos na massa tumoral tem sido associada com um prognóstico favorável ao paciente em alguns estudos (Black & Barclay, 1975; Wong et al., 1998).

Wong et al. (1998) avaliaram a produção de citocinas de padrão Th1 e Th2 em populações leucocitárias intratumorais, em linfonodos axilares e no sangue periférico em pacientes com câncer de mama. Os resultados mostraram que as citocinas de padrão Th1 foram o tipo predominante produzido pelas células T estimuladas para cada população, com diferença estatisticamente maior para IFN γ em células T intratumorais. Entretanto, células T dos linfonodos e do sangue periférico apresentaram proporção significativamente maior de IL-2, demonstrando que há diferenças na capacidade de leucócitos de vários locais anatômicos de pacientes com câncer de mama em sintetizar citocinas imunoestimulatórias e mediar a citotoxicidade às células tumorais.

Diversos estudos sobre os mecanismos pelos quais os tumores evadem a resposta imune estão sendo realizados. Tais mecanismos incluem a não expressão de antígenos tumorais (Marzo et al., 1999), a sub-regulação de moléculas de superfície do MHC (Ögmundsdottir et al., 1995), falta de moléculas coestimulatórias (Townsend & Alisson, 1993), produção de fatores supressores e inversão na proporção CD4/CD8 de células T infiltradas em neoplasias (Sheu et al., 1999).

Os tumores podem produzir citocinas e fatores de crescimento, que influenciam a função de células inflamatórias e imunes. Muitos mediadores químicos produzidos pelas células neoplásicas, como

IL-4, IL-6, IL-10 e PGE₂, suprimem a atividade citotóxica de macrófagos ativados e inibem sua migração em direção ao estímulo quimiotático e adesão às células endoteliais (Elgert et al., 1998; Zeidler et al., 2000). Além disso, as próprias células T produzem citocinas de padrão Th2 em carcinomas, suprimindo a resposta de padrão Th1 específica para tumores. Entre estas citocinas estão a IL-4 e a IL-10, que inibem a ativação de células T por intermédio de IL-2, inibem a produção de TNF- α e IL-1 β pelos macrófagos e subregulam a produção de citocinas pelas células T CD4 (Yamamura et al., 1993).

A participação das PGs no crescimento tumoral foi confirmada por vários pesquisadores, que utilizaram diversos tumores experimentais, tais como Sarcoma de Moleney (Humes et al., 1974; Strausser & Humes, 1975); mastocitoma P815 e carcinoma de Lewis (Hial et al., 1976); fibrosarcoma induzido por metilcolantreno (Lynch et al., 1978); carcinoma mamário (Bennet et al., 1979) e Tumor Ascítico de Ehrlich (Sato et al., 1992).

O uso de drogas anti-inflamatórias não esteróides (NSAIDs) têm sido associadas à redução do risco de diversos tipos de tumores, em humanos, entre eles, os de mama, pulmão, cabeça, pescoço (Ara & Teicher, 1996) e cólon (Marnett, 1992; Ara & Teicher, 1996; Patrignani, 2000). Tilden & Balch (1981) relataram aumento da resposta imune em pacientes com melanoma tratados com indometacina, um inibidor inespecífico da cicloxigenase, independente da influência do estágio da doença ou idade. Vanderveen et al. (1986) também verificaram tal associação das PGs em carcinoma de célula basal. Constatou-se, ainda, que em pacientes

com câncer de cólon a presença de metástases e a avançada faixa etária eram acompanhadas pela depressão da resposta imune. Os linfócitos destes pacientes apresentavam redução na resposta proliferativa à fitohemaglutinina; sendo esta supressão revertida pela adição de indometacina à cultura. Os autores também detectaram a produção de altos níveis de PGE₂ por monócitos nestes pacientes (Balch et al., 1984). Ainda, Natarajan et al. (2000) demonstraram que a indometacina alterava o perfil fosfolipídico das células malignas de câncer de mama para um fenótipo fosfolipídico não maligno, sugerindo que tal alteração poderia estar relacionada à mudanças da via COX-1/COX-2.

Em relação aos tumores experimentais, Rahal et al., em 1992, estudando as mudanças nas populações de linfócitos nulos, NK1.1+ e Thy1lo nas medulas ósseas de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), verificaram que o número de linfócitos Thy1lo aumentou em paralelo com o de células nulas, durante o crescimento do TAE. Quando os animais eram tratados com indometacina verificou-se reversão na queda brusca da expansão de linfócitos nulos na segunda fase da resposta ao crescimento tumoral, sugerindo que a expansão inicial destas células na medula óssea pode ser limitada pela produção de PGE₂, que pode suprimir a atividade de células NK contra uma variedade de células tumorais inibindo a produção de IL-2, essencial para o desenvolvimento destas células.

Em camundongos imunizados com células tumorais irradiadas e, em seguida, desafiados com células de carcinoma pulmonar (3LL) e mamário (4T1), constatou-se que o tratamento com indometacina,

durante a imunização e o desafio, proporcionou aos animais desenvolverem uma imunidade antitumor às células de carcinomas murinos, que continham alta concentração de PGE₂ endógena, sugerindo uma correlação entre esta concentração e a propriedade da indometacina em induzir imunidade contra o tumor (Morecki et al., 2000).

Porém, nem sempre a inibição na síntese de PGs retarda o crescimento dos tumores experimentais e implementa a resposta antitumoral dos animais. Santoro et al. (1976) observaram que a indometacina, estimula o crescimento de melanoma B-16 de camundongos *in vivo* e *in vitro*. O mesmo grupo de pesquisadores, em trabalho posterior, demonstrou que a administração de análogo de PGE₂ à camundongos inoculados com melanoma B-16 retardou o aparecimento do tumor, inibiu o crescimento tumoral e prolongou a sobrevivência dos animais (Santoro et al., 1977). Favalli et al. (1980), nas mesmas condições experimentais, verificaram que o tratamento com PGE₂ de camundongos com o melanoma B-16 implementavam as respostas imune humoral e celular.

Uma vez que PGs modulam a atividade funcional de células inflamatórias e imunes, tais mediadores lipídicos, conseqüentemente, influenciam a síntese e secreção de citocinas.

As citocinas fazem parte de uma família complexa de mediadores que influenciam muitos aspectos da biologia celular tumoral. Por isso, modelos experimentais animais são utilizados cada vez mais na tentativa de elucidar os efeitos destes mediadores sobre o microambiente tissular, pois as citocinas podem ser usadas como

agentes terapêuticos ou são produzidas localmente durante a carcinogênese, sendo capazes de agir sobre as células neoplásicas, sobre o estroma tumoral ou sobre o próprio hospedeiro (Burke, 1999). Citocinas como TNF- α , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13, podem atuar como inibidoras do crescimento tumoral ou mesmo servir como fator de crescimento para células neoplásicas.

Uma destas citocinas é o TNF- α , que é produzido principalmente por macrófagos. Este mediador é responsável pela indução de necrose hemorrágica de certos tumores transplantáveis *in vivo*, como é o caso do fibrosarcoma Meth A, adenocarcinoma Colon 26 e sarcoma-180; porém, há evidências de que a atividade antitumoral é mediada por mudanças vasculares e é efetiva contra tumores sólidos, enquanto que tumores intraperitoneais, como o tumor de Ehrlich, são resistentes ao efeito citotóxico (Manda et al., 1987). Alguns tumores sólidos, como o carcinoma de mama ZR-75-1, também são resistentes a este efeito citotóxico (Spriggs et al., 1987). Na tentativa do uso do TNF- α como agente terapêutico observou-se que a exposição prolongada a este mediador pode restringir o crescimento tumoral, mas os animais acabam por sucumbir à caquexia causada pela toxicidade crônica do TNF- α (Tracey, 1994). O efeito citotóxico do TNF- α nem sempre é direto, como foi demonstrado por Alleva et al., em 1993, que verificaram que a supressão imune induzida pela citocina foi causada pelo aumento na produção de PGE₂ por parte dos macrófagos.

A IL-1 α é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, entre eles, macrófagos, monócitos, neutrófilos, fibroblastos e

linfócitos B e T, e que tem importante participação na resposta inflamatória atuando na indução de IL-8 e na migração de neutrófilos e macrófagos (Dinarello, 1996). É descrito em literatura que a IL-1 α atua sobre diversos tipos de tumores como fator estimulatório de crescimento e diferenciação (Onozaki et al., 1987). Além disso, a IL-1 α exerce efeito anti-proliferativo em diferentes linhagens de células malignas, dentre elas o carcinoma mamário, de tireóide, cervical, células leucêmicas e melanomas (Kimura et al., 1992; Danforth & Sgagias, 1993). Nozaki et al. (2000) demonstraram que a IL-1 α derivada de células de câncer de mama possui importante função na expressão de genes pro-metastáticos nas células neoplásicas, evidenciando seu papel na invasão e metástase de câncer de mama.

Produzida pelas células T CD4 e, em menor quantidade, pelas células T CD8, a IL-2 atua nestas células como um fator de crescimento autócrino e parácrino. As células T CD4 secretam tal citocina, que funciona como seu fator de crescimento autócrino e estimula a proliferação e diferenciação das células T CD8. Assim, as células T CD4 funcionam como auxiliares para o desenvolvimento das células T citolíticas (Abbas et al., 2000). Ainda, a IL-2 estimula o crescimento das células NK e facilita sua ação citolítica, produzindo as células matadoras ativadas por linfocinas (LAK) (Margolin, 2000). Em estudo com pacientes com câncer de bexiga verificou-se que a proliferação de células LAK induzida por IL-2 era inibida pela PGE₂ produzida pelas células mononucleares e células neoplásicas (Wang et al., 1997). Outro aspecto da importância da IL-2 é seu uso na imunoterapia para o câncer, há diversos trabalhos constatando sua

eficácia no tratamento de tumores humanos, como carcinomas de células renais (Beldegrun et al., 1988; Lee et al., 1998; Margolin, 2000), melanoma metastáticos (Rosenberg et al., 1988; Lee et al., 1998) e de tumores murinos, como o Tumor Ascítico de Ehrlich (Lala et al., 1990) e o melanoma B16F10 (Lala & Parhar, 1988).

A IL-4 é uma citocina pleiotrópica produzida por mastócitos e células T, que apresenta como principais efeitos biológicos a diferenciação de células T CD4 em subpopulação Th2, diferenciação de células B e estímulo à produção de IgE (Liles & Van Voorhis, 1995). Esta citocina apresenta potencial atividade antitumoral, que é representada pela sua capacidade em inibir o crescimento de células de câncer de mama e de ovário pela indução de apoptose, em estimular a capacidade funcional de células dendríticas em pacientes com tumores malignos metastáticos e em inibir a adesão célula-célula pela subregulação de moléculas de adesão em câncer de cólon (Gabrilovich et al., 1997; Gooch et al., 1998; Kanai et al., 2000; Roth et al., 2000).

Produzida por macrófagos, monócitos, células T, fibroblastos, células endoteliais e mastócitos, a IL-6 é uma citocina multifuncional que regula a resposta imune, reações de fase aguda e hematopoiese (Hirano, 1994; Liles & Van Voorhis, 1995). Certos tumores de origem humana, entre eles o mieloma múltiplo (Treon & Anderson, 1998), o carcinoma oral de células escamosas (Nakano et al., 1999), carcinoma de ovário (Watson et al., 1990), carcinoma de próstata (Siegal et al., 1990) e glioblastoma (Van Meir et al., 1990) produzem quantidades significativas de IL-6.

Chen et al. (1999) estudando pacientes com carcinoma cervical de células escamosas detectaram IL-1 α , IL-6 e IL-8 no tumor *in situ*. Neste mesmo estudo, demonstraram alta produção de IL-6, IL-8 e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) no sobrenadante das células neoplásicas cultivadas *in vitro*. Os autores sugerem que a elevação crônica de IL-6 pode promover irresponsividade imune, caquexia e hipercalcemia, que são sinais observados em pacientes com carcinoma de células escamosas que possuem prognóstico desfavorável.

Outra citocina também relacionada com subpopulações celulares em neoplasias é a IL-10, que pode ser produzida por macrófagos, células T, queratinócitos e células B. Esta citocina possui propriedades imunossupressoras, bloqueando a resposta imune de padrão Th1 específica para tumores. Halak et al. (1999) demonstraram que células de carcinoma murino de bexiga podem produzir IL-10 como forma de escape evitando a destruição pelo Sistema Imune. Há trabalhos demonstrando que células de câncer de pulmão e de bexiga em humanos induzem a produção de IL-10 pelas células T, por via mediada por PGE₂ (Sharma et al., 1999; Halak et al., 1999). Ménétrier-Caux Et al., em 1999, observaram alta produção de IL-10 e PGE₂ por parte de monócitos em carcinomas de células renais, tais mediadores subregulariam a expressão de moléculas de superfície envolvidas na apresentação de antígenos tumorais.

A IL-13 é produzida principalmente pelas células Th2 CD4 e entre outras funções, estimula a proliferação de células B e T citotóxicas, ativa a expressão de antígenos MHC classe II, controla a

proliferação e atividade de eosinófilos e mastócitos e inibe a produção de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α) por monócitos ativados. Uma das funções da IL-13, em humanos, é a inibição da proliferação e crescimento clonal de células de câncer de mama (Blais et al., 1996; Serve et al., 1996). A IL-13 possui ação sobre a adesão de células de câncer de cólon humano, inibindo a adesão de célula-célula pela subregulação de moléculas de adesão, como a E-caderina e o antígeno carcinoembriônico (Kanai et al., 2000). Outro aspecto das ações biológicas da IL-13 é sua relação com células dendríticas. As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno de uso terapêutico em tumores humanos. Muitos estudos recentes avaliam a possibilidade da geração *ex vivo* de grandes quantidades de células dendríticas com alta capacidade de apresentação de antígeno a partir de culturas de progenitores de sangue periférico ou da medula óssea. Um grupo de pesquisadores demonstrou que células cultivadas na presença de GM-CSF e IL-13 possuíam maior capacidade para apresentar antígenos a linfócitos autólogos e estimular linfócitos T alogênicos. Este efeito foi maior do que o observado com células cultivadas com GM-CSF e TNF- α (Lopez et al., 1997). Há também influência desta citocina sobre a produção de PGE₂ em polimorfonucleares humanos, pois a IL-13 eleva a produção de PGE₂ por aumentar a atividade da enzima COX-2 (Yu et al., 1998).

Uma neoplasia que vem sendo muito utilizada como modelo experimental é o tumor de Ehrlich, que foi um dos primeiros tumores transplantáveis a serem descritos na literatura.

O tumor de Ehrlich surgiu no final do século passado e foi descrito como tumor mamário espontâneo de camundongos e mantido em animais de laboratório pela transplantação sucessiva no tecido subcutâneo (Ehrlich & Apolant, 1905).

Em 1932, Loewenthal & Jahn descreveram que células obtidas do tumor de Ehrlich quando implantadas na cavidade peritoneal, eram capazes de crescer em suspensão no fluido ascítico. A partir deste trabalho, várias linhagens do tumor de Ehrlich sólido foram transformadas em tumor ascítico, e mantidas pela passagem intraperitoneal das células neoplásicas (Klein & Klein, 1951). Esse tumor apresenta a característica de se desenvolver em qualquer linhagem de camundongos (Sugiura, 1965). Foi demonstrado que a linhagem de camundongos CAF₁ (originária do cruzamento Balb/c e A/J) apresentam resistência ao tumor de Ehrlich e que isto está relacionado à capacidade desses animais em produzir e sustentar uma resposta inflamatória ao tumor (Bergami et al., 1996).

O tumor de Ehrlich na sua forma ascítica possui, geralmente, 100% de crescimento, não regredindo espontaneamente. Após a inoculação intraperitoneal de fluido ascítico fresco contendo cerca de um milhão de células neoplásicas, os camundongos apresentam cerca de 5 a 20 mL de líquido ascítico leitoso ou hemorrágico em 7 a 14 dias, vindo a morrer em 10 a 20 dias. Quando o líquido ascítico fresco (0,1 mL contendo cerca de um milhão de células neoplásicas) é injetado dentro da cavidade peritoneal de camundongos, as células proliferam nas superfícies do peritônio visceral e parietal. Durante os primeiros 3 dias não são observados nem ascite ou pequenos nódulos

tumorais. Porém, ao final do 4º dia de crescimento tumoral, há uma pequena quantidade de líquido ascítico, cerca de 1,0 mL. Por volta do 7º dia os camundongos mostram uma leve a moderada dilatação abdominal, apresentando de 2 a 7 mL de líquido branco leitoso na cavidade peritoneal e pelo 14º dia, a maioria dos animais mostra moderada a intensa distensão abdominal, tendo de 5 a 25 mL de líquido. Não há metástase no coração, rins, adrenais, fígado ou baço (Sugiura, 1965).

Reverendo na literatura estudos sobre a relação entre o hospedeiro e a evolução do tumor de Ehrlich, não encontramos grande número de trabalhos avaliando a resposta inflamatória de modo sistemático.

Lala, em 1974, estudando animais portadores do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica, demonstrou que a evolução tumoral era acompanhada pelo influxo de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos da corrente sanguínea para a cavidade peritoneal.

O mesmo grupo (Lala et al.,1985) trabalhando com o Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) em camundongos CBA observaram que, após 3 dias do implante, a atividade citotóxica de células NK atingia um pico coincidente com a elevação do número de células NK. Esta atividade declinou em torno do sétimo dia, enquanto que o número destas células ainda se encontrava elevado. Esta redução na atividade NK foi revertida pelo tratamento com indometacina *in vitro*, sugerindo a participação de PGs. Por outro lado, o tratamento de animais portadores de TAE com indometacina *in vivo* não promoveu efeito sobre a atividade de células NK. (Constantino,1998).

Em 1988, Parhar & Lala verificaram que macrófagos obtidos de camundongos portadores de TAE exerciam efeito pansupressor contra a ativação de todas as linhagens celulares efetoras tumorícidas incluindo as células KAL, NK, T e macrófagos. Tal efeito era anulado totalmente pela adição às culturas de indometacina ou anticorpo monoclonal anti-PGE₂, indicando que este processo é mediado pela PGE₂.

Fecchio et al. (1990) demonstraram que o TAE induz significativa liberação de PGE₂ um dia após o implante intraperitoneal das células tumorais, que se mantém até o décimo dia de evolução neoplásica. Ainda, o implante do TAE não estimula os macrófagos peritoneais, em nenhum dos tempos avaliados. Os autores sugerem que a PGE₂ exerce uma retroalimentação negativa sobre ativação de macrófagos; contudo, a origem desta PGE₂, se das células tumorais ou dos macrófagos, é desconhecida.

Constantino (1998) observou que o tratamento com indometacina de camundongos portadores de TAE inibe o crescimento neoplásico e promove aumento significativo no influxo de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, mas não afeta a atividade de células NK.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Pelo exposto, o objetivo deste trabalho será avaliar o envolvimento da PGE₂ na evolução do TAE, caracterizando as diversas populações celulares na cavidade peritoneal e avaliando a secreção de IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e TNF- α .

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Suíços, machos, com idade entre 30 e 45 dias e peso médio de 35g, procedentes do Biotério Central da Universidade de Campinas - São Paulo.

Durante a fase experimental os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP-Campus de Botucatu, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*.

3.2. Neoplasia

Neste estudo foi empregado o tumor de Ehrlich, mantido no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina - UNESP - Campus de Botucatu. As células neoplásicas foram mantidas *in vivo* por repiques semanais em camundongos Suíços, pelo implante de 10^7 células tumorais por via intraperitoneal. Na obtenção de inóculos para implante do tumor, o fluido ascítico foi retirado, por punção da cavidade peritoneal, e a suspensão lavada por duas vezes em solução salina tamponada estéril apirogênica (1500 rpm, por 10 minutos). A determinação do número total de células neoplásicas foi realizada através da contagem em câmara de Neubauer, e a concentração desejada foi obtida mediante diluição em salina.

3.3. Teste da viabilidade celular

Com o objetivo de se determinar a viabilidade celular, a um volume de suspensão de células foi acrescido um volume de Azul de Tripán, na concentração de 0,2%. A seguir, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula, e procedida a contagem percentual, considerando-se vivas as células que excluíram o corante e mortas as que o incorporaram. O percentual de células vivas foi determinado através de contagem de 200 células. Em todos os protocolos foram empregadas somente as suspensões que apresentarem viabilidade superior a 95%.

3.4. Determinação do número total e contagem diferencial de células presentes na cavidade peritoneal

Na avaliação do número total de células, cada amostra de suspensão peritoneal foi fixada em cristal violeta a 0,5% em ácido acético glacial a 30% e o número total de células foi determinado mediante contagem em Câmara de Neubauer.

Para o estudo das populações celulares, alíquotas de 0,3 ml de cada suspensão, ajustadas para 2×10^5 células/ml, foram colocadas em lâminas e, após citocentrifugação à 600 rpm por 3 minutos, receberam fixação em metanol absoluto por 5 minutos, sendo coradas por Giemsa, para a realização da contagem diferencial de células nucleadas. As células identificadas foram os bastonetes neutrófilos, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos e macrófagos, eosinófilos, basófilos, células mesoteliais e células neoplásicas.

3.5. Determinação do perfil de citocinas

A detecção e quantificação de cada citocina foram feitas pela técnica do *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sanduíche direto. O protocolo usado para cada citocina foi composto dos mesmos procedimentos com diferenças apenas nas concentrações dos anticorpos de captura e biotinizados, que variavam em suas diluições para cada citocina, de acordo com as padronizações. Tais concentrações estavam nas faixas recomendadas pelo fabricante (R&D Systems). Primeiramente sensibilizou-se a placa com 100µl/poço do anticorpo de captura anti-citocina purificado. Este anticorpo foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato, pois tal solução aumenta a adsorção do anticorpo na placa. A incubação da placa foi feita em câmara úmida, *overnight*, a 4° C. O bloqueio das ligações inespecíficas ocorreu adicionando-se 200 µl/poço de leite desnatado a 10%, diluído em tampão carbonato-bicarbonato e incubando-se a placa em câmara úmida, por duas horas, a 37° C. Após a sensibilização e bloqueio da placa foram adicionados, no volume de 100 µl/poço, os padrões (citocinas recombinantes) e as amostras, que foram incubadas em câmara úmida, por duas horas, a 37° C. Nesta etapa não foi colocado material na primeira coluna, para que esta servisse de branco. Em seguida 100 µl/poço de solução contendo o anticorpo anti-citocina biotinizado diluído em tampão PBS/Tween foi adicionado e o material foi incubado em câmara úmida, por duas horas, a 37° C. Após adição de 100 µl/poço de solução contendo um conjugado de HRP (horseradish peroxidase) e estreptoavidina, diluído

em PBS/Tween, as placas foram incubadas por duas horas, em câmara úmida, a 37° C. Finalmente, para se revelar a reação anticorpo-citocina, o substrato para a enzima (HRP) foi adicionado (100 µl/poço). Tal solução se constituía de 25 ml de tampão Citrato-Fosfato, 10mg de OPD (o-Phenylene-Diamine) e 10µl de peróxido de hidrogênio a 30 volumes. Após 15 minutos a reação foi bloqueada com 50µl/poço de solução de ácido sulfúrico a 2 N. A placa foi lavada com solução de PBS/Tween (250µl/poço) após cada etapa do protocolo. A leitura espectrofotométrica foi realizada em comprimento de onda de 492 nm.

3.6. Inibição na síntese de prostaglandinas

Para a inibição da síntese de PGE₂ empregou-se a indometacina, um inibidor não esteróide da ciclooxigenase que pertence ao grupo dos salicilatos (Vane, 1971).

A indometacina foi dissolvida em tampão TRIS - 1M, pH 8,0 e a concentração final ajustada com solução salina fisiológica estéril apirogênica, numa proporção de 1:10.

3.7. Análise estatística

Os dados referentes ao número total de células, contagem diferencial e dosagem de citocinas de cada experimento foram analisados estatisticamente pela prova não paramétrica de Kruskal Wallis para amostras independentes. Quando as diferenças entre as medianas resultaram significativas foram realizadas comparações

múltiplas pelo teste de Dunn. O parâmetro número absoluto de células neoplásicas foi analisado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para análise de correlação entre os tipos celulares e as citocinas empregou-se o teste de correlação de Spearman. Os resultados que estão apresentados em Tabela representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando o valor de p é menor ou igual a 0,05.

O limite máximo de significância adotado foi de 5% (Conover, 1971). A distribuição dos dados foi representada em gráficos de caixa (“box plot”) (Tukey, 1977; Iemma, 1992).

Toda a estatística foi realizada pelo programa SigmaStat 2.0 statistical software (Jandel Corporation).

3.8. Delineamento Experimental

3.8.1. Cinética do efeito do tratamento com indometacina no influxo inflamatório ao TAE

Para avaliar o envolvimento das prostaglandinas no influxo inflamatório durante o crescimento do TAE, camundongos foram inoculados com 1×10^3 células tumorais, por via intraperitoneal (ip), e receberam indometacina na dose de 1 mg/kg de peso, uma vez ao dia, por via ip. A primeira dose de indometacina foi administrada 24 horas antes do implante tumoral. Decorridos 1, 3, 6, 10 e 13 dias os animais foram eutanasiados e avaliados quanto ao influxo inflamatório, total e diferencial, presente na cavidade peritoneal.

Como controle, animais portadores de tumor, foram tratados com diluente nas mesmas condições do grupo experimental. Grupos controle adicionais constituídos de animais não portadores de tumor foram tratados com indometacina ou com diluente, nas mesmas condições experimentais. Logo, os grupos de animais foram divididos em quatro, sendo o grupo TAE+DILU (G1), animais portadores de tumor inoculados com diluente (N=103); o grupo TAE+INDO (G2), animais portadores de tumor tratados com indometacina (N=106); o grupo INDO (G3), animais não portadores de tumor tratados com indometacina (N=74); o grupo DILU (G4), animais não portadores de tumor inoculados com diluente (N=79).

3.8.2. Modulação na secreção de citocinas em animais portadores de TAE tratados com indometacina

Para avaliação do efeito do tratamento com indometacina na secreção de citocinas foi repetido o protocolo descrito no item 3.8.1, obtendo-se, por centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos, amostras de sobrenadantes de fluido ascítico que foram aliqüotadas a -20°C , para posterior avaliação das citocinas.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do efeito do tratamento com indometacina na evolução do Tumor Ascítico de Ehrlich e no influxo inflamatório.

Os resultados obtidos neste experimento estão representados em gráficos de caixa (*box plot*) e gráficos de linha, representando as medianas para cada variável. Também está representada a estatística referente a cada parâmetro estudado.

Em cada figura, os grupos experimentais estão representados da seguinte maneira:

G1: Grupo portador de TAE tratado com diluente;

G2: Grupo portador de TAE tratado com 1 mg/kg de indometacina;

G3: Grupo não portador de TAE tratado com 1 mg/kg de indometacina;

G4: Grupo não portador de TAE tratado com diluente.

O influxo inflamatório foi avaliado por contagem diferencial e foi composto pelos neutrófilos segmentados, basófilos e mastócitos, eosinófilos, bastonetes neutrófilos, monócitos e macrófagos, linfócitos e células mesoteliais. Para cada tipo celular estudado foram feitas comparações múltiplas entre todos os grupos experimentais, tais comparações, quando resultavam em diferenças estatisticamente significativas, foram representadas na estatística referente a cada

variável. Com a finalidade de ressaltar as comparações mais relevantes, para cada parâmetro estudado discorreremos sobre as seguintes comparações: G1 comparado a G4; G2 comparado a G1 e G3 comparado a G4. Sendo as demais comparações representadas somente abaixo de cada figura.

4.1.1. Avaliação do número absoluto de células nucleadas peritoneais.

No crescimento do TAE constatamos que o número total de células presentes na cavidade peritoneal aumentou significativamente e, de modo progressivo, a partir do 10º dia de evolução neoplásica (Figura 1). O tratamento com indometacina de animais portadores de TAE não afetou o número total de células a partir do 6º dia de crescimento tumoral, porém, verificou-se aumento nos 1º e 3º dias de crescimento neoplásico. Embora a mediana do grupo de animais portadores de tumor tenha sido maior do que a do grupo portador de TAE tratado com indometacina, devido à grande variabilidade dos dados o teste estatístico não paramétrico (Kruskall Wallis) não detectou diferença significativa entre os dados nos 10º e 13º dias de evolução tumoral (Figura 1).

O tratamento com indometacina, por si só, promoveu aumento no número de células peritoneais somente no 3º dia de experimento (Figura 1).

4.1.2. Avaliação do número absoluto de células neoplásicas.

Analisando os resultados obtidos na determinação do número de células neoplásicas, constatamos o mesmo padrão visto em relação às células totais em tempos mais avançados de crescimento tumoral (Figura 2). O aumento no número total de células peritoneais no grupo portador de TAE tratado com diluente observado a partir do 10^o dia foi decorrente do crescimento neoplásico. O tratamento com indometacina promoveu redução estatisticamente significativa no número de células tumorais apenas após 13 dias do implante da neoplasia. Embora, no 10^o dia de evolução do TAE o tratamento com indometacina resultasse em inibição no crescimento neoplásico na ordem de 93,3%, devido a grande variabilidade dos dados não constatamos diferenças estatisticamente significativas.

4.1.3. Avaliação do número absoluto de neutrófilos segmentados.

Na análise das células inflamatórias na cavidade peritoneal constatou-se que o crescimento do tumor não afetou este influxo em nenhum dos momentos estudados (Figura 3). Porém, o tratamento com indometacina de animais com TAE aumentou o influxo de neutrófilos segmentados somente no 1^o dia de crescimento tumoral. Ainda, o tratamento com indometacina de animais não portadores de TAE também aumentou o influxo de neutrófilos somente no 1^o dia de tratamento.

4.1.4. Avaliação do número absoluto de basófilos e mastócitos.

O influxo de basófilos e mastócitos diminuiu com 10 e 13 dias de crescimento tumoral, enquanto que o tratamento com indometacina de animais portadores de TAE não modificou o influxo de mastócitos em nenhum dos momentos estudados. O mesmo ocorreu com a indometacina, que não afetou tal influxo em animais não portadores de TAE (Figura 4).

4.1.5. Avaliação do número absoluto de eosinófilos.

Em relação ao influxo de eosinófilos, o tumor não promoveu aumento no influxo destas células em nenhum dos tempos estudados (Figura 5). Os animais portadores de tumor tratados com indometacina, quando comparados ao grupo portador de TAE, não apresentaram alterações significativas no influxo destas células. O tratamento com indometacina de animais não portadores de tumor promoveu o influxo de eosinófilos para a cavidade peritoneal somente no 10^o dia de tratamento.

4.1.6. Avaliação do número absoluto de bastonetes neutrófilos.

Não foram encontradas diferenças significativas na cinética celular quanto ao influxo de bastonetes neutrófilos, em nenhum dos grupos e tempos estudados. Os dados referentes a tais células não

estão representados em figuras, pois todas as medianas, nos grupos e tempos avaliados, foram iguais a zero.

A

B

Estatística:

Dia 1: H = 19,4; P=0,0002; G2>G4; G2>G1

Dia 3: H = 26,3; P=<0,0001; G2>G4; G2>G1; G3>G4

Dia 6: H = 12,6; P=0,0057; G2>G4

Dia 10: H = 26,3; P=<0,0001; G1>G4; G1>G3; G2>G4

Dia 13: H = 13,1; P=0,0044; G1>G4; G1>G3

Figura 1. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de células peritoneais presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE

tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

A

B

Estatística:

Dia 1: T = 307,0 ; P=0,3553

Dia 3: T = 334,0; P=0,2113

Dia 6: T = 291,0; P=0,1044

Dia 10: T = 461,0; P=0,1719

Dia 13: T = 57,0; P=0,0350; G1>G2

Figura 2. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de células neoplásicas presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE

tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

Estatística:

Dia 1: $H = 25,8$; $P < 0,0001$; $G2 > G4$; $G2 > G1$; $G3 > G4$

Dia 3: $H = 11,9$; $P = 0,0076$; $G2 > G4$

Dia 6: $H = 7,93$; $P = 0,0476$; $G2 > G4$

Dia 10: $H = 8,54$; $P = 0,0361$; $G2 > G4$

Dia 13: $H = 0,108$; $P = 0,9908$

Figura 3. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de neutrófilos segmentados presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de

TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

A

B

Estatística:

Dia 1: H = 0,512; P=0,9162

Dia 3: H = 2,35; P=0,5023

Dia 6: H = 0,655; P=0,8838

Dia 10: H = 13,4; P=0,0038; G2<G4; G1<G4

Dia 13: H = 18,6; P=0,0003; G2<G4; G1<G4

Figura 4. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de basófilos e mastócitos presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de

TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

AB**Estatística:**

Dia 1: H = 5,80; P=0,1219

Dia 3: H = 4,89; P=0,1799

Dia 6: H = 9,37; P=0,0247; G1<G3

Dia 10: H = 15,4; P=0,0015; G3>G4; G1<G3; G2>G4

Dia 13: H = 2,55; P=0,4668

Figura 5. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

4.1.7. Avaliação do número absoluto de monócitos e macrófagos.

Em relação ao influxo de monócitos e macrófagos, o tumor não promoveu aumento no influxo destas células em nenhum dos tempos estudados (Figura 6). Os animais portadores de tumor tratados com indometacina, quando comparados ao grupo portador de TAE tratado com diluente, não apresentaram alterações estatisticamente significativas no influxo de monócitos e macrófagos. Embora no 3º dia o tratamento com indometacina no grupo portador de TAE os dados apresentassem tendência a aumento, a grande variabilidade dos dados não permitiu a detecção de diferenças significativas. A indometacina em animais não portadores de TAE não promoveu elevação significativa dessas células durante todo o tratamento.

4.1.8. Avaliação do número absoluto de linfócitos.

O influxo de linfócitos não se mostrou alterado durante o crescimento neoplásico (Figura 7). O tratamento com indometacina de animais portadores de TAE não afetou o influxo de linfócitos em quaisquer dos períodos estudados. Apesar do fato do número de linfócitos do grupo portador de TAE tratado com indometacina não ter sido significativamente diferente em relação ao grupo portador de

tumor, deve-se considerar a possibilidade de haver diferenças significativas entre as subpopulações linfocíticas dos diferentes grupos ao longo da evolução tumoral. O tratamento com indometacina na ausência do tumor promoveu o influxo de linfócitos somente no 3º dia de crescimento tumoral.

4.1.9. Avaliação do número absoluto de células mesoteliais.

O crescimento do TAE promoveu diminuição do número destas células no 13º dia (Figura 8). Já o tratamento com indometacina não induziu alteração no número destas células, em animais portadores de tumor, assim como o tratamento com indometacina, por si só, não afetou tal influxo em nenhum dos tempos avaliados.

A

B

Estatística:

Dia 1: H = 6,55; P=0,0877

Dia 3: H = 8,07; P=0,0446; G2>G4

Dia 6: H = 6,55; P=0,0878

Dia 10: H = 1,80; P=0,6158

Dia 13: H = 1,39; P=0,7069

Figura 6. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de monócitos e macrófagos presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

A

B

Estatística:

Dia 1: H = 5,52; P=0,1374

Dia 3: H = 16,4; P=0,001; G2>G4; G3>G4

Dia 6: H = 7,27; P=0,0637

Dia 10: H = 4,01; P=0,2607

Dia 13: H = 1,54; P=0,6737

Figura 7. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de linfócitos presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores

acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os Box-plot representam grupos constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

A

B

Estatística:

Dia 1: H = 4,18; P=0,2425

Dia 3: H = 2,95; P=0,4001

Dia 6: H = 2,48; P=0,4787

Dia 10: H = 9,55; P=0,0228; G1<G3

Dia 13: H = 15,9; P=0,0012; G1<G4; G2<G4; G1<G3

Figura 8. Box-plot (gráfico A) representando o número absoluto de células mesoteliais presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com

indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

Logo, tomando em conjunto os resultados obtidos na avaliação do influxo inflamatório no tratamento com indometacina de animais portadores de TAE, podemos inferir que a indometacina foi eficaz em inibir o crescimento tumoral em 93,3% no 10^o dia de e em 65,8% no 13^o dia de crescimento tumoral, e que o tratamento influi positivamente, em termos quantitativos, no influxo de neutrófilos segmentados e células totais, em tempos iniciais da evolução tumoral.

4.2. Avaliação do efeito do tratamento com indometacina sobre a produção de mediadores químicos na evolução do Tumor Ascítico de Ehrlich.

Os resultados obtidos neste experimento estão representados em gráficos de caixa (*box plot*) e gráficos de linha, representando as medianas para cada variável. Também está representada a estatística referente a cada parâmetro estudado.

Em cada figura, os grupos experimentais estão representados da seguinte maneira:

G1: Grupo portador de TAE tratado com diluente;

G2: Grupo portador de TAE tratado com 1 mg/kg de indometacina;

G3: Grupo não portador de TAE tratado com 1 mg/kg de indometacina;

G4: Grupo não portador de TAE tratado com diluente.

Os mediadores químicos avaliados foram PGE₂, IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e TNF- α . Para cada um estudado foram feitas comparações múltiplas entre todos os grupos experimentais, tais comparações, quando resultavam em diferenças estatisticamente significativas, foram representadas na estatística referente a cada variável. Com a finalidade de ressaltar as comparações mais relevantes, para cada parâmetro estudado discorreremos sobre as seguintes

comparações: G1 comparado a G4; G2 comparado a G1 e G3 comparado a G4. Sendo as demais comparações representadas somente abaixo de cada figura.

4.2.1. Avaliação dos níveis de PGE₂.

O implante de TAE na cavidade peritoneal estimulou a produção de PGE₂ ao longo de toda a sua evolução, pois o nível basal deste mediador em cavidade peritoneal de camundongos é da ordem de 53,7 mg/mL (Figura 9). Chama a atenção o fato de que a PGE₂ apresentou aumento progressivo com a evolução do TAE, sugerindo que este mediador químico seja produzido pelas células tumorais. O tratamento de animais portadores de TAE com indometacina resultou em inibição estatisticamente significativa de PGE₂ apenas no 13^o dia de evolução neoplásica, embora no 10^o dia os resultados obtidos sugiram que a síntese do mediador já se encontrava inibida.

4.2.2. Avaliação do perfil de IL-1 α .

Os resultados da dosagem das citocinas demonstraram que, o TAE não estimulou a liberação de IL-1 α durante sua evolução (Figura 10). Também, o tratamento com indometacina de animais portadores de TAE não estimulou a liberação de tal citocina. Não houve alteração do perfil de IL-1 α nos animais não portadores de TAE tratados com indometacina.

4.2.3. Avaliação do perfil de IL-2.

O implante do TAE estimulou a liberação de IL-2 no 13º dia de evolução neoplásica e o tratamento com indometacina não afetou tal citocina em animais portadores do tumor (Figura 11). Em animais não portadores de TAE tratados com indometacina não ocorreu liberação de IL-2 nos períodos estudados.

4.2.4. Avaliação do perfil de IL-4.

A evolução do TAE em animais tratados com diluente não estimulou a produção de IL-4 durante todo o experimento (Figura 12). O tratamento com indometacina de animais portadores de TAE não modificou a produção desta citocina durante o crescimento tumoral. O mesmo ocorreu em relação ao tratamento com indometacina, isoladamente, que não influenciou a liberação de IL-4 em nenhum dos momentos avaliados.

A

B

Estatística:

Dia 1: T = 49,0; P=0,710

Dia 3: T = 20,5; P=0,151

Dia 6: T = 18,0; P=0,056

Dia 10: T = 84,0; P=0,105

Dia 13: T = 13,0; P=0,028; G1>G2

Figura 9. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de PGE₂ presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina

(TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 5 a 8 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

A

B

Estatística:

Dia 1: H = 0,965; P=0,8097

Dia 3: H = 4,96; P=0,1745

Dia 6: H = 1,45; P=0,6928

Dia 10: H = 1,60; P=0,6584

Dia 13: H = 14,6; P=0,0022; G2>G3

Figura 10. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-1 α presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

A

B

Estatística:

Dia 1: H = 2,57; P=0,4623

Dia 3: H = 6,68; P=0,0828

Dia 6: H = 8,98; P=0,0296; G2>G4

Dia 10: H = 14,7; P=0,0021; G2>G4; G2>G3

Dia 13: H = 11,5; P=0,0094; G2>G4; G2>G3; G1>G4; G1>G3

Figura 11. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-2 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.



A



B

Estatística:

Dia 1: H = 0,435; P=0,9330

Dia 3: H = 1,32; P=0,7255

Dia 6: H = 2,57; P=0,4633

Dia 10: H = 1,74; P=0,6284

Dia 13: H = 17,8; P=0,0005; G2>G4; G2>G3

Figura 12. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-4 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

4.2.5. Avaliação do perfil de IL-6.

O crescimento do TAE estimulou a liberação de IL-6 nos 10^o e 13^o dias de evolução, enquanto que o tratamento com indometacina de animais portadores de tumor inibiu, de maneira significativa, a liberação desta citocina apenas no 13^o dia de crescimento tumoral. A indometacina não alterou o perfil de IL-6 em animais não portadores de TAE (Figura 13).

4.2.6. Avaliação do perfil de IL-10.

Em animais portadores de tumor tratados com diluente observou-se que o crescimento neoplásico não estimulou a liberação de IL-10, e esta citocina não teve seu perfil alterado pelo tratamento com indometacina em animais portadores de TAE ou animais não portadores do tumor (Figura 14).

4.2.7. Avaliação do perfil de IL-13.

O crescimento neoplásico não alterou o perfil de IL-13 durante todo o experimento (Figura 15). Os animais portadores de TAE tratados com indometacina apresentaram aumento significativo nos níveis de IL-13 somente no 13º dia de crescimento neoplásico. Enquanto que a indometacina, por si só, não estimulou a produção desta citocina.

4.2.8. Avaliação do perfil de TNF- α .

Em relação ao TNF- α não foram encontradas diferenças significativas quanto ao perfil desta citocina em nenhum dos grupos e tempos estudados. Os dados referentes a tal citocina não estão representados em figuras, pois todas as medianas, nos grupos e tempos avaliados, foram iguais a zero.

A

B

Estatística:

Dia 1: H = 4,57; P=0,2063

Dia 3: H = 4,92; P=0,1778

Dia 6: H = 4,09; P=0,2519

Dia 10: H = 12,4; P=0,0061; G1>G4

Dia 13: H = 12,1; P=0,0069; G1>G3; G1>G4; G1>G2

Figura 13. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-6 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90%

e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

A

B

Estatística:

Dia 1: H = 4,59; P=0,2046

Dia 3: H = 0,908; P=0,8235

Dia 6: H = 4,37; P=0,2244

Dia 10: H = 0,760; P=0,8590

Dia 13: H = 1,37; P=0,7125

Figura 14. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-10 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente

como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.



A



B

Estatística:

Dia 1: H = 3,66; P=0,3009

Dia 3: H = 0,469; P=0,9256

Dia 6: H = 2,56; P=0,4653

Dia 10: H = 9,23; P=0,0264; G2>G4

Dia 13: H = 8,70; P=0,0336; G1<G2

Figura 15. Box-plot (gráfico A) representando os níveis de IL-13 presentes na cavidade peritoneal 1, 3, 6, 10 e 13 dias após a inoculação de 1×10^3 células de TAE em camundongos tratados com indometacina (TAE+INDO=G2) ou com o diluente (TAE+DILU=G1). Os animais não portadores de TAE tratados com

indometacina estão representados como INDO=G3 e os animais não portadores de TAE tratados com diluente como DILU=G4. O quadrante superior representa 75% dos dados; o inferior 25%; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90; e os círculos, os valores acima e abaixo de 90% e 10% da distribuição dos dados, respectivamente. Os grupos são constituídos de 6 a 21 animais. O gráfico B representa os valores de mediana obtidos para esta variável.

Sendo assim, os resultados obtidos nos permitem inferir que o implante de TAE estimulou a produção de PGE_2 ao longo de toda a sua evolução e que o crescimento neoplásico influi positivamente na produção de IL-2 somente no 13^o dia de evolução tumoral e de IL-6 a partir do 10^o dia. Ainda, o tratamento com indometacina de animais portadores de TAE modula positivamente a produção de IL-13; negativamente a liberação de IL-6 e não altera os perfis de IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-10 e TNF- α . Além disso, a droga inibiu significativamente a síntese de PGE_2 no 13^o dia de evolução neoplásica.

4.3. Avaliação da correlação entre os tipos celulares e os mediadores químicos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos.

Os resultados obtidos na análise de correlação entre os tipos celulares e os mediadores químicos nos grupos experimentais estudados estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

De todos os testes de correlação realizados, apenas 10 deles apresentaram resultados significativos ($p < 0,05$). Destes, 05 ocorreram no grupo portador de tumor tratado com diluente (G1), 04 no grupo portador de TAE tratado com indometacina (G2) e 01 no grupo não portador de TAE tratado com diluente (G4).

No grupo portador de TAE tratado com diluente (G1) houve correlação positiva das células neoplásicas com os níveis de IL-2, IL-6, IL-10 e PGE₂.

Quando animais portadores de TAE eram tratados com indometacina encontrou-se correlação positiva das células neoplásicas com os níveis de IL-2, IL-10 e IL-13.

Em relação às células inflamatórias as correlações observadas foram que nos grupos portadores de TAE tratados ou não com indometacina (G1 e G2) havia correlação negativa dos basófilos e mastócitos com os níveis de IL-10. Enquanto que nos animais não portadores de TAE tratados com diluente (G4) houve correlação negativa de eosinófilos com os níveis de IL-1 α .

Tabela 1: Análise de correlação entre célula neoplásica e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1^o, 3^o, 6^o, 10^o e 13^o dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de *p*. A correlação é considerada significativa quando *p* é menor ou igual a 0,05.

<i>Grupo</i>	<i>TNF-a</i>	<i>IL-1a</i>	<i>IL-2</i>	<i>IL-4</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-13</i>	<i>PGE₂</i>
G1	—	0,67 (0,233)	0,92 (0,017)	-0,15 (0,783)	0,92 (0,017)	1,00 (0,017)	0,67 (0,233)	0,98 (0,017)
G2	—	0,67 (0,233)	0,98 (0,017)	0,132 (0,783)	0,36 (0,517)	0,98 (0,017)	0,98 (0,017)	0,41 (0,450)

G1=Animais portadores de TAE tratados com diluente

G2=Animais portadores de TAE tratados com indometacina

Tabela 2: Análise de correlação entre neutrófilo segmentado e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.

<i>Grupo</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-1α</i>	<i>IL-2</i>	<i>IL-4</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-13</i>	<i>PGE$_2$</i>
G1	—	0,70 (0,233)	0,15 (0,783)	0,70 (0,233)	0,45 (0,450)	0,21 (0,683)	0,30 (0,683)	0,10 (0,950)
G2	—	-0,10 (0,950)	-0,70 (0,233)	0,46 (0,450)	-0,71 (0,133)	-0,60 (0,350)	-0,70 (0,233)	-0,40 (0,517)
G3	—	0,87 (0,083)	0,15 (0,783)	0,00 (1,000)	0,35 (0,517)	0,22 (0,683)	0,10 (0,950)	—
G4	-0,45 (0,450)	0,60 (0,350)	-0,36 (0,517)	0,20 (0,783)	—	0,45 (0,450)	0,10 (0,950)	—

G1=Animais portadores de TAE tratados com diluente

G2=Animais portadores de TAE tratados com indometacina

G3=Animais não portadores de TAE tratados com indometacina

G4=Animais não portadores de TAE tratados com diluente

Tabela 3: Análise de correlação entre basófilo/mastócito e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1^o, 3^o, 6^o, 10^o e 13^o dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de *p*. A correlação é considerada significativa quando *p* é menor ou igual a 0,05.

<i>Grupo</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-1α</i>	<i>IL-2</i>	<i>IL-4</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-13</i>	<i>PGE₂</i>
G1	—	-0,67 (0,233)	-0,79 (0,133)	0,05 (0,950)	-0,86 (0,083)	-0,95 (0,017)	-0,82 (0,083)	-0,87 (0,083)
G2	—	-0,70 (0,233)	-0,90 (0,083)	-0,05 (0,950)	-0,354 (0,517)	-1,00 (0,017)	-0,90 (0,083)	-0,30 (0,683)
G3	—	0,21 (0,683)	0,205 (0,683)	-0,70 (0,233)	0,00 (1,000)	-0,67 (0,233)	-0,40 (0,517)	—
G4	-0,86 (0,083)	0,05 (0,950)	-0,29 (0,683)	0,616 (0,233)	—	0,69 (0,233)	0,359 (0,517)	—

G1=Animais portadores de TAE tratados com diluente

G2=Animais portadores de TAE tratados com indometacina

G3=Animais não portadores de TAE tratados com indometacina

G4=Animais não portadores de TAE tratados com diluente

Tabela 4: Análise de correlação entre eosinófilo e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1º, 3º, 6º, 10º e 13º dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de *p*. A correlação é considerada significativa quando *p* é menor ou igual a 0,05.

<i>Grupo</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-1α</i>	<i>IL-2</i>	<i>IL-4</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-13</i>	<i>PGE$_2$</i>
G1	—	-0,35 (0,517)	-0,18 (0,783)	0,35 (0,517)	-0,40 (0,517)	-0,54 (0,350)	-0,71 (0,133)	-0,35 (0,517)
G2	—	0,34 (0,517)	-0,11 (0,783)	-0,80 (0,083)	0,791 (0,133)	0,112 (0,783)	-0,11 (0,783)	-0,78 (0,133)
G3	—	0,66 (0,233)	0,16 (0,783)	-0,36 (0,517)	0,36 (0,517)	-0,29 (0,683)	-0,10 (0,783)	—
G4	-0,41 (0,450)	-0,95 (0,017)	0,65 (0,233)	0,16 (0,783)	—	-0,06 (0,950)	-0,05 (0,950)	—

G1=Animais portadores de TAE tratados com diluente

G2=Animais portadores de TAE tratados com indometacina

G3=Animais não portadores de TAE tratados com indometacina

G1=Animais portadores de TAE tratados com diluente
 G2=Animais portadores de TAE tratados com indometacina
 G3=Animais não portadores de TAE tratados com indometacina
 G4=Animais não portadores de TAE tratados com diluente

Tabela 6: Análise de correlação entre monócito/macrófago e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1^o, 3^o, 6^o, 10^o e 13^o dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de *p*. A correlação é considerada significativa quando *p* é menor ou igual a

<i>Grupo</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-1α</i>	<i>IL-2</i>	<i>IL-4</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-13</i>	<i>PGE₂</i>
G1	—	0,10 (0,950)	-0,31 (0,517)	0,40 (0,517)	-0,22 (0,683)	-0,56 (0,350)	-0,90 (0,083)	-0,50 (0,450)
G2	—	0,30 (0,683)	-0,10 (0,950)	0,72 (0,133)	-0,35 (0,517)	-0,30 (0,683)	-0,10 (0,950)	-0,20 (0,783)
G3	—	-0,15 (0,783)	0,67 (0,233)	-0,80 (0,133)	-0,35 (0,517)	-0,89 (0,083)	-0,90 (0,083)	—

G4	0,45	0,60	-0,10	0,00	—	0,34	0,40	—
	(0,450)	(0,350)	(0,783)	(1,000)		(0,517)	(0,517)	

G1=Animais portadores de TAE tratados com diluente

G2=Animais portadores de TAE tratados com indometacina

G3=Animais não portadores de TAE tratados com indometacina

G4=Animais não portadores de TAE tratados com diluente

Tabela 7: Análise de correlação entre linfócito e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1^o, 3^o, 6^o, 10^o e 13^o dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de p . A correlação é considerada significativa quando p é menor ou igual a 0,05.

Grupo	TNF- α	IL-1 α	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-13	PGE ₂
G1	—	0,10 (0,950)	0,67 (0,233)	-0,60 (0,350)	0,45 (0,450)	0,62 (0,233)	0,10 (0,950)	0,70 (0,233)
G2	—	-0,10 (0,950)	0,30 (0,683)	-0,41 (0,450)	0,71 (0,133)	0,00 (1,000)	0,30 (0,683)	0,10 (0,950)
G3	—	-0,15	-0,67	-0,40	-0,71	0,22	0,30	—

		(0,783)	(0,233)	(0,517)	(0,133)	(0,683)	(0,683)	
G4	0,34	0,60	-0,67	0,30	—	0,45	0,60	—
	(0,517)	(0,350)	(0,233)	(0,683)		(0,450)	(0,350)	

G1=Animais portadores de TAE tratados com diluente

G2=Animais portadores de TAE tratados com indometacina

G3=Animais não portadores de TAE tratados com indometacina

G4=Animais não portadores de TAE tratados com diluente

Tabela 8: Análise de correlação entre célula mesotelial e os mediadores químicos obtidos nos animais portadores de TAE tratados ou não com indometacina e nos animais não portadores de TAE tratados ou não com indometacina nos 1^o, 3^o, 6^o, 10^o e 13^o dias de experimento. Os resultados apresentados representam o coeficiente de correlação e o valor de *p*. A correlação é considerada significativa quando *p* é menor ou igual a 0,05.

<i>Grupo</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-1α</i>	<i>IL-2</i>	<i>IL-4</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-13</i>	<i>PGE₂</i>
G1	—	-0,34	-0,63	0,34	-0,63	-0,86	-0,89	-0,78
		(0,517)	(0,233)	(0,517)	(0,233)	(0,083)	(0,083)	(0,133)
G2	—	0,87	-0,67	0,16	-0,54	-0,87	-0,67	0,21
		(0,083)	(0,233)	(0,783)	(0,350)	(0,083)	(0,233)	(0,683)

G3	—	0,56 (0,350)	-0,36 (0,52)	0,20 (0,783)	0,00 (1,000)	0,67 (0,233)	0,50 (0,450)	—
----	---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	---

G4	-0,78 (0,133)	0,00 (1,000)	-0,05 (0,950)	0,70 (0,233)	—	0,89 (0,083)	0,60 (0,350)	—
----	------------------	-----------------	------------------	-----------------	---	-----------------	-----------------	---

G1=Animais portadores de TAE tratados com diluente

G2=Animais portadores de TAE tratados com indometacina

G3=Animais não portadores de TAE tratados com indometacina

G4=Animais não portadores de TAE tratados com diluente

Discussão

5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito do tratamento com indometacina de animais portadores de TAE, avaliando o crescimento tumoral, o influxo inflamatório e o perfil de citocinas durante o desenvolvimento tumoral.

Na análise do número total de células nucleadas na cavidade peritoneal (Figura 1) observamos que animais portadores de tumor apresentaram aumento progressivo deste número a partir do 10^o dia de evolução tumoral. No grupo portador de TAE tratado com indometacina, quando comparado ao grupo portador de TAE tratado com diluente, ocorreu diminuição no número total de células peritoneais a partir do mesmo período e aumento em tempos iniciais (1^o e 3^o dias pós-implante neoplásico). No tratamento de animais não portadores de TAE tratados com indometacina também observamos aumento no número total de células peritoneais apenas no 3^o dia de tratamento. Estes resultados sugerem que a indometacina promove influxo inflamatório em tempos iniciais e inibição do crescimento tumoral, observada em tempos mais tardios (10^o e 13^o dias).

Com intuito de confirmar a inibição no crescimento do TAE determinamos o número de células tumorais. Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com indometacina de animais portadores de TAE inibiu o crescimento tumoral em 93,3% e 65,8% nos 10^o e 13^o dias de evolução neoplásica, respectivamente (Figura 2). Embora no 10^o dia a redução do número de células tumorais no grupo tratado com indometacina não tenha sido estatisticamente significativa, neste grupo entre 20 animais, 15 apresentaram intensa

inibição do crescimento neoplásico. Desta forma, não podemos descartar a possibilidade da não detecção de diferença estatística ser devido à ampla variabilidade dos dados. Porém, no 13º dia de experimento, tal redução no crescimento tumoral passou a ser estatisticamente significativa, confirmando a inibição no crescimento neoplásico pelo tratamento com indometacina.

Estes resultados estão de acordo com o observado na literatura, onde, o crescimento da maioria dos tumores mamários transplantáveis em roedores, é inibido por indometacina (Bennet et al., 1979; Ara & Teicher, 1996; Constantino, 1998; Ogino et al., 1999).

Analisando os resultados obtidos em relação ao influxo inflamatório diferencial constatamos que durante a evolução do TAE não ocorreu alteração estatisticamente significativa no número de neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos, em nenhum dos tempos estudados (Figuras 3, 5, 6 e 7). Entretanto, o implante do TAE promoveu redução no número de células mesoteliais no 13º dia de crescimento (Figura 8) e de basófilos e mastócitos a partir do 10º dia de evolução tumoral (Figura 4). Estes resultados demonstram que o implante do TAE não induz influxo inflamatório significativo em nenhum dos tempos analisados.

Trabalhos na literatura avaliando o influxo inflamatório diferencial, em animais portadores de TAE, empregando o mesmo inóculo de células tumorais e tempos de avaliação semelhantes são conflitantes. Segundo Fecchio et al. (1990) o implante do TAE promove influxo significativo de leucócitos polimorfonucleares 6 horas e 10 dias pós-implante neoplásico. Em trabalho posterior, Silva

(2000) descreveu aumento do influxo de polimorfonucleares e de mononucleares a partir do 8º dia de evolução do TAE. Entretanto, Constantino (1998) relatou elevação de polimorfonucleares até o 6º dia e diminuição de mononucleares a partir do 6º dia de crescimento do TAE.

Vale ressaltar que os trabalhos acima descritos analisaram o influxo inflamatório diferencial empregando coloração por cristal violeta, que não permite identificar os vários tipos de leucócitos polimorfonucleares, nem a diferenciação segura de monócitos jovens e linfócitos. Em nossas condições experimentais, empregamos a coloração de Giemsa, a qual nos permitiu diferenciar os leucócitos polimorfonucleares em neutrófilos segmentados, basófilos, eosinófilos, bastonetes neutrófilos e identificar com maior segurança monócitos, macrófagos e linfócitos. Além disso, esta coloração permitiu a identificação de células mesoteliais, que em cristal violeta são confundidas com macrófagos.

Apesar do implante do TAE não ter promovido influxo de células inflamatórias durante sua evolução, seria necessário a avaliação do estado funcional destas células, que poderiam estar, ou não, funcionalmente ativas. Trabalho anterior demonstrou que a evolução do TAE não estimula a liberação de água oxigenada (H₂O₂) por macrófagos e induz o espriamento de macrófagos peritoneais somente um e três dias depois da inoculação (Fecchio et al., 1990). Ainda, embora o TAE não induza o aumento do influxo linfocitário, tais células podem estar modificadas qualitativamente, já que se conhece da literatura que diferentes subpopulações linfocíticas

possuem influências diversas sobre o crescimento e regressão tumorais (O'Sullivan & Lewis, 1994; Segura et al., 1997; Halak et al., 1999; Sharma et al., 1999).

A diminuição de células mesoteliais, basófilos e mastócitos em tempos avançados do crescimento do TAE (Figuras 4 e 8) poderia ser decorrente do intenso crescimento neoplásico, quando as células tumorais nidam-se em uma rede de fibrina, podendo estimular a aderência das células mesoteliais à fibrina diminuindo, conseqüentemente, seu número no líquido ascítico (Guerra, 1983).

O tratamento de animais portadores de TAE com indometacina promoveu aumento estatisticamente significativo no influxo de neutrófilos segmentados apenas no 1º dia pós implante (Figura 3), sugerindo promoção de resposta inflamatória em tempos iniciais da evolução tumoral, a qual não foi mantida em tempos subseqüentes. Resultado que contrasta com o de Constantino (1998), que verificou aumento do influxo de polimorfonucleares em animais portadores de TAE tratados com indometacina durante os 10 dias de evolução neoplásica.

As demais células inflamatórias não foram alteradas em número pelo tratamento com indometacina de animais portadores de TAE (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8). Apesar de não encontrarmos diferenças estatisticamente significativas entre monócitos, macrófagos e linfócitos, Constantino (1998) observou elevação do número de células mononucleares a partir do 6º dia de tratamento em animais portadores de tumor tratados com indometacina. Estes resultados contrastantes podem ser devido ao emprego de diferentes técnicas de

coloração usadas para a identificação celular, conforme descrito anteriormente.

Entretanto, devemos considerar que o efeito antitumoral da indometacina pode ocorrer por diferentes mecanismos, que não somente por aumento quantitativo de células inflamatórias e imunes.

Um destes mecanismos seria a liberação, por parte das próprias células neoplásicas, de fatores estimulantes de colônias, que ativariam monócitos e macrófagos a sintetizarem PGE₂ (Ara & Teicher, 1996; Ménétier-Caux et al., 1999). Tal mediador químico inibiria a resposta proliferativa de células T, a atividade citotóxica de células NK e LAK, estimularia macrófagos em repouso e os inibiria quando ativados (Baxevanis et al., 1993; Ara & Teicher, 1996). Ainda, a PGE₂ inibe a secreção de citocinas de células T por mecanismo envolvendo AMP cíclico (Van Der Pouw Kraan et al., 1995). Existe forte evidência de que a PGE₂ exerce efeito inibidor mais intenso na produção de citocinas em células T auxiliaadoras de padrão Th1 do que de Th2 (Betz & Fox, 1991), sugerindo que este mediador inibe a resposta imune citotóxica mediada por células.

Ainda em relação à ação do inibidor inespecífico da cicloxigenase, a indometacina, poderia haver nos camundongos portadores de TAE tratados com a droga, uma atenuação da supressão imune com consequente redução do crescimento tumoral. Alguns mecanismos tentam explicar a supressão imune durante o crescimento do Tumor de Ehrlich, tanto na sua forma sólida quanto na ascítica, incluindo perda de atividade NK (Constantino, 1998); produção de citocinas imunossupressoras; indução de resposta do tipo Th2, que

deprimiria a resposta do tipo Th1 possível promotora da regressão tumoral e estimulação de macrófagos supressores (Segura et al., 1997). Tal imunossupressão dependente de PGE₂ em alguns tumores experimentais sugere uma correlação entre macrófagos que poderiam estar sendo estimulados a produzir tal mediador, o que influenciaria negativamente a resposta inflamatória na cavidade peritoneal, e conseqüentemente também afetaria a resposta imune (Balch et al., 1984; Ara & Teicher, 1996). Outro mecanismo de imunossupressão consiste na produção de PGE₂ pelas células neoplásicas inibindo o potencial de monócitos de migrarem em direção ao estímulo quimiotático e de aderirem às células endoteliais (Zeidler et al., 2000).

Embora não possamos excluir a possibilidade de que macrófagos estejam produzindo PGE₂, nos parece que a maior fonte deste mediador lipídico seja a própria célula do TAE.

Analisando os níveis de PGE₂ no lavado peritoneal de animais portadores de TAE (Figura 9) constatamos elevação de sua concentração já no 1º dia pós-implante neoplásico e aumento progressivo concomitante ao crescimento tumoral. Resultados obtidos em nosso laboratório (dados não publicados) demonstraram que células do TAE cultivadas *in vitro* produzem PGE₂. Chama atenção o fato de que o tratamento de animais portadores de tumor tratados com indometacina reduziu a concentração de PGE₂ a partir do 10º dia de tratamento. Estes resultados sugerem que a PGE₂ está associada ao escape do crescimento do TAE, confirmando literatura que comprova o envolvimento das prostaglandinas no controle *in vivo* do crescimento tumoral, tanto em humanos como em animais de

experimentação (Droller et al., 1978; Tilden & Balch, 1981; Chao & Chu, 1989; Marnett, 1992; Rahal et al., 1992; Ménétrier-Caux et al., 1999; Ogino et al., 1999; Morecki et al., 2000).

Por fim, o tratamento com indometacina de animais não portadores de tumor promoveu aumento significativo no influxo de neutrófilos segmentados no 1º dia de tratamento (Figura 3), de linfócitos no 3º dia (Figura 7), juntamente com o número total de células na cavidade peritoneal (Figura 1) e de eosinófilos no 10º dia de tratamento (Figura 5).

Além do influxo inflamatório, avaliamos a possível participação de algumas citocinas (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e TNF- α) na evolução do TAE.

Os resultados obtidos na dosagem das citocinas mostraram que, o TAE promoveu liberação de IL-2 no 13º dia de evolução tumoral e os níveis de IL-6 aumentaram somente a partir do 10º dia (Figuras 11 e 13). Entretanto, os níveis de IL-1 α , IL-4, IL-10, IL-13 e TNF- α não foram alterados significativamente pelo crescimento tumoral (Figuras 10, 12, 14 e 15).

Embora haja na literatura inúmeros trabalhos relacionando o papel da IL-1 α como fator estimulatório de crescimento e diferenciação (Onozaki et al., 1987), seu efeito anti-proliferativo (Kimura et al., 1992; Danforth & Sgagias, 1993) e função na invasão e metástase de diversos tumores sólidos (Nozaki et al., 2000), não houve diferenças estatisticamente significativas no perfil desta citocina em nenhum dos momentos avaliados durante o crescimento do TAE (Figura 10).

Embora o TNF- α induza necrose hemorrágica em certos tumores sólidos, tumores intraperitoneais, como o tumor de Ehrlich, são resistentes ao seu efeito citotóxico (Manda et al., 1987). Não houve produção desta citocina em animais portadores de TAE em nenhum dos momentos avaliados.

Na evolução do TAE observamos aumento significativo na concentração de IL-2 apenas no 13^o dia de crescimento neoplásico (Figura 11). Um aspecto da importância da IL-2 é seu uso na imunoterapia para o câncer, há diversos trabalhos constatando sua eficácia no tratamento de tumores humanos, como carcinomas de células renais, melanoma metastáticos, e de tumores murinos, como o Tumor Ascítico de Ehrlich e o melanoma B16F10 (Beldegrun et al., 1988; Lala & Parhar, 1988; Rosenberg et al., 1988; Lee et al., 1998; Lala et al., 1990; Margolin, 2000). No caso específico do TAE 90% dos camundongos portadores do tumor foram curados com uma terapia de combinação tripla composta pela administração crônica de indometacina, IL-2 e células LAK (Lala et al., 1990). Pode-se sugerir que a IL-2, que foi produzida no 13^o dia de crescimento neoplásico, tenha sido produzida por células T CD4, na tentativa de estimularem células NK em sua ação citolítica contra o TAE e que tal ação seja inibida pela PGE₂ presente na cavidade peritoneal, tendo como consequência o escape tumoral.

Apesar de haver vários trabalhos demonstrando que a IL-4 pode inibir o crescimento tumoral, induzir apoptose em células neoplásicas, estimular a atividade de células apresentadoras de antígeno em pacientes com câncer e regular a expressão de moléculas

de adesão em células neoplásicas (Gooch et al., 1998; Kanai et al., 2000; Roth et al., 2000); durante o desenvolvimento do TAE o perfil de IL-4 não foi alterado (Figura 12). Embora não significativo, no 13º dia de evolução do TAE constatamos tendência a aumento na concentração de IL-4, que poderia estar refletindo resposta imune de padrão Th2 para este tumor (Segura et al., 1997).

O aumento nos níveis de IL-6 observados a partir do 10º dia de evolução do TAE (Figura 13) corroboram os resultados obtidos por Silva (2000), que verificou aumento significativo nos níveis de IL-6 em tempos de semelhantes. Chen et al., em 1999, detectaram em carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço IL-6 *in situ*, confirmando o papel desta citocina na irresponsividade imune e carcinogênese. Nakano et al. (1999), também detectaram níveis elevados de IL-6 em tecidos homogêneos de carcinoma oral de células escamosas. Com base nestes achados, podemos sugerir que a IL-6 possui função na imunossupressão do hospedeiro e na indução da caquexia, em tempos tardios de crescimento neoplásico, nos animais portadores de TAE. Embora os resultados demonstrem elevação dos níveis de IL-6 e de PGE₂ com 10 e 13 dias de crescimento tumoral, e estes dois mediadores induzem o desenvolvimento de mastócitos (Hu et al., 1995; Hu et al., 1997), encontramos diminuição do número de mastócitos e basófilos em tempos avançados de crescimento tumoral. Porém, tal constatação não elimina a possibilidade destas células estarem funcionalmente ativas. A maioria dos trabalhos relatam que em tumores sólidos, os mastócitos possuem função na neovascularização e que são induzidos por IL-6 na presença de PGE₂

(Poole & Zetter, 1983; Hu et al., 1995; Hu et al., 1997). Temos que levar em consideração que os microambientes de tumores sólidos e ascíticos são diferentes e que a neovascularização nos primeiros é uma etapa necessária para o crescimento tumoral. Talvez esta citocina esteja sendo produzida pelas células neoplásicas, pois em animais portadores de TAE há aumento na liberação de IL-6 a partir do 10º dia de crescimento tumoral.

Embora haja trabalhos demonstrando que células de câncer de pulmão e de bexiga em humanos induzem a produção de IL-10 pelas células T por via mediada por PGE₂, pois tal citocina é anti-inflamatória (Sharma et al., 1999; Halak et al., 1999), não encontramos estimulação para a liberação de IL-10 em animais portadores de TAE, provavelmente por diferenças entre os microambientes pulmonar, da bexiga e o da cavidade peritoneal. Nossos resultados também não corroboram com os de Ménétrier-Caux et al. (1999), que observaram alta produção de IL-10 e PGE₂ por parte de monócitos em carcinomas de células renais, tais mediadores subregulariam a expressão de moléculas de superfície envolvidas na apresentação de antígenos tumorais.

O tratamento com indometacina de animais portadores de TAE promoveu aumento da produção de IL-13 (Figura 15) e diminuição na liberação de IL-6 no 13º dia de crescimento tumoral (Figuras 13), não afetando significativamente a concentração das demais citocinas estudadas (Figuras 10, 11, 12 e 14).

Não constatamos diferenças significativas promovidas pela indometacina no perfil de IL-1 α , em animais portadores de TAE

(Figura 10). Entretanto, no 13^o dia de tratamento constatamos forte tendência ao aumento desta citocina, sugerindo resposta efetiva do hospedeiro na inibição do crescimento do TAE.

Os resultados obtidos na dosagem de IL-6 nos animais portadores de TAE tratados com indometacina (Figura 13) nos permitem sugerir que a diminuição na liberação desta citocina poderia estar relacionada com a inibição do crescimento tumoral, já que nos animais portadores de tumor tratados com diluente houve aumento nos níveis de IL-6 a partir do 10^o dia de crescimento tumoral, momento em que há o escape tumoral, com a elevação do número de células neoplásicas e elevada produção de PGE₂.

O tratamento de animais portadores de TAE com indometacina promoveu aumento significativo no nível de IL-13 no 13^o dia de evolução neoplásica (Figura 15), coincidindo com inibição no crescimento tumoral.

Relatos na literatura associam a IL-13 e inibição da proliferação tumoral (Blais et al., 1996; Serve et al., 1996; Kornmann et al., 1999); por aumentar a apresentação de antígenos a células T (Lopez et al., 1997). Além disso, a IL-13, entre outras funções estimula a proliferação de células B e T citotóxicas. Desta forma, o aumento de IL-13 observado em animais portadores de TAE tratados com indometacina poderia ser decorrente de mudança para o padrão Th2 de células T CD4 e / ou aumento na apresentação de antígenos pelos macrófagos.

Por fim, o tratamento com indometacina, por si só, não promoveu alteração significativa no perfil das citocinas estudadas em nenhum dos tempos analisados (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Buscando correlacionar os vários tipos celulares com os mediadores químicos presentes na cavidade peritoneal durante o desenvolvimento do TAE, realizamos o teste da correlação de Spearman. Nesta análise verificamos correlações positivas das células neoplásicas com IL-2 e IL-10, sendo que tais correlações eram também observadas em animais portadores de TAE tratados com indometacina, isto sugere que pode não haver influência da PGE₂ na regulação da produção de IL-2 e IL-10 durante a evolução tumoral. Fato que não ocorre em relação a IL-6, que possui correlação positiva somente no grupo portador de TAE, sugerindo que, à medida que a neoplasia evolui os níveis de IL-6 aumentam, reforçando a hipótese de que as células neoplásicas estejam produzindo IL-6.

Outra correlação positiva de células neoplásicas foi com os níveis de PGE₂, o que sugere a produção deste mediador lipídico pelas células do TAE. Hipótese que é reforçada pelo fato de que no grupo de animais portadores de TAE tratados com indometacina os níveis deste mediador lipídico diminuíram em relação aos animais com TAE tratados com diluente nos 10^o e 13^o dias de evolução neoplásica.

Quanto ao grupo portador de TAE tratado com indometacina houve uma correlação positiva entre as células tumorais e os níveis de IL-13, sendo que quanto maior o número de células neoplásicas maiores os níveis de IL-13. Devemos considerar que se verificou aumento dos níveis de IL-13 no 13^o dia de evolução tumoral no grupo

tratado com indometacina. Tais resultados indicariam influência do tratamento com indometacina sobre a produção de IL-13 em animais portadores de TAE. Tal fato não descarta a possibilidade de haver em nosso caso uma relação entre o bloqueio de PGE₂ pela indometacina e o aumento dos níveis de IL-13, produzida ou pelas próprias células neoplásicas ou pelas células inflamatórias, em função da diminuição na produção de PGE₂; embora não haja correlação estatística entre os níveis de IL-13 e PGE₂ em animais portadores de TAE tratados com indometacina (dado não mostrado). A IL-13 também poderia ter a função, neste caso, de estimular células dendríticas do hospedeiro a apresentarem maior funcionalidade.

Embora haja correlação estatística negativa entre a IL-10 e os basófilos nos animais portadores de TAE tratados, ou não, com indometacina, isto não significa que haja necessariamente uma relação biológica entre os dois parâmetros. Sendo assim, seriam necessários alguns estudos *in vitro* para a confirmação da relação biológica entre basófilos e IL-10 neste modelo experimental.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo mostraram que o tratamento com indometacina foi eficaz em inibir o crescimento do TAE e influenciou positivamente, em termos quantitativos e significantes, no influxo de neutrófilos segmentados e células totais em tempos iniciais da evolução tumoral. Ainda, a avaliação do perfil de citocinas no tratamento com indometacina de animais portadores de tumor, nos permitiu inferir que a indometacina modula positivamente a produção de IL-13; negativamente a liberação de IL-6 e não altera os perfis de IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-10 e TNF- α .

Nossos resultados demonstraram que a PGE₂ modula o crescimento do TAE e que a inibição do crescimento tumoral poderia estar em parte relacionada com supressão da liberação de IL-6 e estimulação da liberação de IL-13. Estudos adicionais, *in vivo* e *in vitro* com o uso de inibidores específicos para COX-2, avaliando as relações entre as subpopulações celulares, citocinas e células neoplásicas na inibição do crescimento tumoral poderão contribuir para a elucidação do(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) a PGE₂ modula a evolução do TAE.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Levando em consideração nossas condições experimentais, podemos concluir que:

- 1) O implante de TAE em camundongos induz:
 - 1.1) Aumento do número de células neoplásicas a partir do 10^o dia de crescimento tumoral;
 - 1.2) Produção de PGE₂ durante toda sua evolução;
 - 1.3) Diminuição do influxo de células mesoteliais e de basófilos em tempos subseqüentes do desenvolvimento tumoral;
 - 1.4) Produção de IL-2 com 13 dias e IL-6 com 10 e 13 dias de crescimento do TAE.

- 2) O tratamento de animais portadores de TAE com indometacina induz:
 - 2.1) Inibição do crescimento tumoral a partir do 10^o dia;
 - 2.2) Inibição da síntese de PGE₂ a partir do 10^o dia de crescimento tumoral;
 - 2.3) Aumento no influxo de células totais e de neutrófilos segmentados em tempos iniciais da evolução tumoral;
 - 2.4) Produção de IL-13 e supressão da produção de IL-6 no 13^o dia de crescimento do TAE.

- 3) O tratamento de animais não portadores de TAE tratados com indometacina induz:
- 3.1) Aumento do influxo total de células nucleadas no 3^o dia;
 - 3.2) Aumento no influxo de neutrófilos segmentados no 1^o dia, de linfócitos no 3^o dia e de eosinófilos no 10^o dia;
 - 3.3) A produção de IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e TNF- α não foi afetada em nenhum dos tempos estudados.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A., H., POBER, J. S. **Citocinas**, cap. 12, p. 255-284. In:_____. *Imunologia Celular & Molecular*, 3 ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2000, 486 p.
- ALLEVA, D. G., ASKEW, D., BURGER, C. J., ELGERT, K. D. Fibrosarcoma-induced increase in macrophage tumor necrosis factor alpha synthesis suppresses T cell responses. **Journal of Leukoc. Biol.**, v. 54, p. 152-160, 1993.
- ARA, G., TEICHER, B. A. Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors in Cancer therapy. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 54, p. 3-16, 1996.
- BALCH, C. M., DOUGHERTY, P. A., CLOUD, G. A., TILDEN, A. B. Prostaglandin E₂-mediated suppression of cellular immunity in colon cancer patients. **Surgery**, v. 95, p. 71-77, 1984.
- BAXEVANIS, C. N., RECLOS, G. J., GRITZAPIS, A. D., DEDOUSIS, G. V. Z., MISSITZIS, I., PAPAMICHAIL, M. Elevated prostaglandin E₂ production by monocytes is responsible for the depressed levels of natural killer and lymphokine-activated killer cell function in patients with breast cancer. **Cancer**, v. 72, p. 491-501, 1993.
- BELLDEGRUN, A., MUUL, L. M., ROSENBERG, S.A. Interleukin-2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell

¹ Referências Bibliográficas apresentadas segundo as normas para publicação da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", v. 4, São Paulo:UNESP, 1995, 93 p.

- cancer: isolation, characterization, and antitumor activity. **Cancer Research**, v. 48, p. 206-214, 1988.
- BENNET, A ., HOUGHTON, J., LEAPER, D. J., STAMFORD, I. F. Cancer growth, response to treatment and survival time in mice : Benefical effect of the prostaglandins synthesis inhibitor flurbiprofen. **Prostaglandins**, v. 17, p. 179-191, 1979.
- BERGAMI, P. C., MARIANO, M., BARBUTO, J. A. M. Inflammation and resistance to Ehrlich ascites tumor. In: FESBE, 11, Caxambú, MG, 1996. **Abstracts**. p. 96.
- BETZ, M., FOX, B. S. Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **The Journal of Immunology**, v. 146, p. 108-113, 1991.
- BLACK, M. M., BARCLAY, T. H. C. Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. **Cancer**, v. 36, p. 2048- 2055, 1975.
- BLAIS, Y., GINGRAS, S., HAAGENSEN, D. E., LABRIE, F., SIMARD, J. Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit estrogen-induced breast cancer cell proliferation and stimulate GCDPF-15 expression in human breast cancer cells. **Mol. Cell. Endocrinology**, v. 121, p. 11-18, 1996.
- BURKE, F. Cytokines (IFNs, TNF-alpha, IL-2 and IL-12) and animal models of cancer. **Cytokines Cell Mol Ther**, v. 5, p. 51-61, 1999.
- CAPDEVILA, J. H., FALCK, J. R., ESTABROOK, R. W. Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 731-736, 1992.

- CHAO, T., CHU, T. M. Effect of indomethacin on tumor-infiltrating lymphocytes of a spontaneously developed murine mammary adenocarcinoma. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 30, p. 158-164, 1989.
- CHEN, Z., MALHOTRA, P. S., THOMAS, G. R., ONDREY, F. G., DUFFEY, D. C., SMITH, C. W., ENAMORADO, I., YEH, N. T., KROOG, G. S., RUDY, S., McCULLAGH, L., MOUSA, S., QUEZADO, M., HERSCHER, L. L., WAES, C. V. Expression of Proinflammatory and Proangiogenic Cytokines in Patients with Head and Neck Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 1369-1379, 1999.
- CONOVER, W. J. **Practical NonParametric Statistics**. New York: John Willey & Sons Inc., 1971. 462p.
- CONSTANTINO, D. H. J. **Efeito do Tratamento com Indometacina na Atividade “Natural Killer” em camundongos portadores de tumor de Ehrlich**. Botucatu, 1998. Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- DANFORTH, D. N., SGAGIAS, M. K. Interleukin-1 α and interleukin-6 act additively to inhibit growth of MCF-7 breast cancer cells *in vitro*. **Cancer Research**, v. 53, p. 1538-1545, 1993.
- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-2147, 1996.
- DROLLER, M. J., SCHNEIDER, M. U., PERLMANN, P. A possible role of prostaglandins in the inhibition of natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against tumor cells. **Cellular Immunology**, v. 39, p. 165-177, 1978.

- EHRlich, P., APOLANT, H. Beobachtungen iiber maligne Mauseumoren. **Berl. Klin. Wschr.**, v. 28, p. 871-874, 1905.
- EHRlich, P. Experimentally carcinomstudien na Mausen. Arb. **Inst. Exp. Ther. Frankfurt**, v. 1, p. 78-80, 1906.
- ELGERT, K. D., ALLEVA, D. G., MULLINS, D. W. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, p. 275-290, 1998.
- FAUVE, R. M., HEVIN, B., JACOB, H., GAILLARD, J. A., JACOB, F. Antiinflammatory effects of murine malignant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v. 71, p. 4052-4056, 1974.
- FAVALLI, C., GARACI, E., ETHEREDGE, E., SANTORO, M. G., JAFFE, B. M. Influence of PGE on the immune response in melanoma-bearing mice. **The Journal of Immunology**, v. 125, p. 897-902, 1980.
- FECCHIO., D., SIROIS, P., RUSSO, M., JANCAR, S. Studies on Inflammatory Response Induced by Ehrlich tumor in mice Peritoneal Cavity. **Inflammation**, v. 14, p. 125-132, 1990.
- GABRILOVICH, D. I., CORAK, J., CIERNIK, I. F., KAVANAUGH, D., CARBONE, D. P. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 3, p. 483-490, 1997.
- GEHARD, B. M., BAZAN, H. E. P., BAZAN, N. G. Ginkgolide BN-52021 blocks PAF-mediated supression of cellular immunity. In : BRAQUET, P. **Ginkgolides-chemistry, Biology, Pharmacology and clinical perspectives**. Prous,Sci. Publish., 1988. p. 703-729.

- GOOCH, J. L., LEE, A. V., YEE, D. Interleukin 4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 58, p. 4199-4205, 1998.
- GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de Ehrlich**. São Paulo, 1983. Tese (Doutoramento) - Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- HALAK, B. K., MAGUIRE, H. C. Jr., LATTIME, E. C. Tumor-induced Interleukin-10 Inhibits Type 1 Immune Responses Directed at a Tumor Antigen As Well As a Non-Tumor Antigen Present at the Tumor Site. **Cancer Research**, v. 59, p. 911-917, 1999.
- HIAL, V., HORAKOVA, Z., SHAFF, R. E., BEAVEN, M. Alteration to tumor growth by aspirin and indomethacin : studies with two transplantable tumors in mouse. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 37, p. 367-376, 1976.
- HIRANO, T. **Interleukin-6**, cap. 8, p. 145-168. In: THOMSOM A. The cytokine handbook, 2 ed., San Diego: Academic Press, 1994, p. 615.
- HU, Z. Q., ASANO, K., SEKI, H., SHIMAMURA, T. An essential role of prostaglandin E on mouse mast cell induction. **Journal of Immunology**, v. 155, p. 2134-2142, 1995.
- HU, Z. Q., KOBAYASHI, K., ZENDA, N., SHIMAMURA, T. Tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-6-triggered mast cell development from mouse spleen cells. **Blood**, v. 89, p. 526-533, 1997.

- HUMES, J. L., CUPO, J. J., STRAUSSER, H. R. Effects of indomethacin on Maloney Sarcoma virus-induced tumors. **Prostaglandins**, v. 6, p. 463-471, 1974.
- IEMMA, A. F. **Outros parâmetros e aplicações**, cap. 8, p. 123-136. In: IEMMA, A. F., Estatística Descritiva, 1 ed., Piracicaba: Fi-Sigma-Rô Publicações, 1992, 182 p.
- KANAI, T., WATANABE, M., HAYASHI A., NAKASAWA, A., YAJIMA, T., OKAZAWA, A., YAMAZAKI, M., ISHII, H., HIBI, T. Regulatory effect of interleukin-4 and interleukin-13 on colon cancer cell adhesion. **British Journal Cancer**, v. 82, p. 1717-1723, 2000.
- KIMURA, H., YAMASHITA, S., NAMBA, H., TOMINAGA, T., TSURUTA, M., YOKOYAMA, N., MOTOMORI, I., NAGATAKI, S. Interleukin-1 inhibits human thyroid carcinoma cell growth. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 75, p. 596-602, 1992.
- KLEIN, G., KLEIN, E. The transformation of a solid transplantable mouse carcinoma into an "ascites tumor". **Cancer Res.**, v.11, p. 466-469, 1951.
- KORNMANN, M., KLEEFF, J., DEBINSKI, W., KORC, M. Pancreatic cancer cells express interleukin-13 and -4 receptors, and their growth is inhibited by Pseudomonas exotoxin coupled to interleukin-13 and -4. **Anticancer Research**, v. 19, p. 125-131, 1999.

- KUNKEL, S. L., CHENSUE, S. W., PHAN, S. H. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. **The Journal of Immunology**, v. 136, p. 186- 192, 1986.
- LALA, P. K. Dynamics of leukocyte migration into the mouse ascites tumor. **Cell Tissue Kinet.**, v. 7, p. 293-304, 1974.
- LALA, P. K., PARHAR R. S. Cure of B16F10 melanoma lung metastasis in mice by chronic indomethacin therapy combined with repeated rounds of interleukin-2: characteristics of killer cells generated *in situ*. **Cancer Research**, v. 48, p. 1072-1079, 1988.
- LALA, P. K., PARHAR R. S., SINGH, P., LALA, P. K. Cure of murine Ehrlich ascites tumors with chronic oral indomethacin therapy combined with intraperitoneal administration of LAK cells and IL-2. **Cancer Letters**, v. 51, p. 27-35, 1990.
- LALA, P. K., SANTER, V., LIBENSON, H., PARHAR, R. S. Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. 1. Kinetics and “in vivo” significance. **Cell Immunology**, v. 93, p. 250-264, 1985.
- LEE, D. S., WHITE, D. E., HURST, R., ROSENBERG, S. A., YANG, J. C. Patterns of relapse and response to retreatment in patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma who responded to interleukin-2-based immunotherapy. **Cancer Journal Sci. Am.**, v. 4, p. 86-93, 1998.
- LILES, W. C., VAN BORIS, W. C. Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 1061-1075, 1995.

- LOEWENTHAL, H., JAHN, G. Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mause-ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen. **Z. Krebsforsch**, v. 37, p. 439-447, 1932.
- LOPEZ, M., AMORIM, L., GANE, P., CRISTOPH, A., BARDINET, D., ABINA A. M., MINTY, A., BERNARD, J. IL-13 induces CD34+ cells isolated from G-CSF mobilized blood to differentiate in vitro into potent antigen presenting cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 208, p. 117-129, 1997.
- LYNCH, N. R., CASTES, M., ASTION, M., SALOMAN, J. C. Mechanisms of inhibition of tumor by aspirin and indomethacin. **Brit. J. Cancer**, v. 38. p. 503-512, 1978.
- MAHONEY, M. J. & LEIGHTON, J. The inflammatory response to a foreign body within transplantable tumors. **Cancer Res.**, v. 22, p. 334-440, 1961.
- MANDA, T., SHIMOMURA, K., MUKUMOTO, S., KOBAYASHI, K., MIZOTA, T., HIRAI, O., MATSUMOTO, S., OKU, T., NISHIGAKI, F., MORI, J. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: evidence of an indirect mode of antitumor activity. **Cancer Research**, v. 47, p. 3707-3711, 1987.
- MARGOLIN, K. A. Interleukin-2 in the treatment of renal cancer. **Semin. Oncol.**, v. 27, p. 194-203, 2000.
- MARNETT, L. J. Aspirin and the Potential role of Prostaglandins in colon Cancer. **Cancer Research**, v. 52, p. 5575-5589, 1992.
- MARZO, A. L., LAKE, R. A., ROBINSON, B. W. S., SCOTT, B. T-Cell Receptor Transgenic Analysis of Tumor-specific CD8 and

- CD4 Responses in the Eradication of Solid Tumors. **Cancer Research**, v. 59, p. 1071-1079, 1999.
- MÉNÉTRIER-CAUX, C., BAIN, C., FAVROT, M. C., DUC, A., BLAY, J. Y. Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E₂ production by monocytes. **British Journal of Cancer**, v. 79, p. 119-130, 1999.
- MORECKI, S., YACOVLEV, E., GELFAND, Y., TREMBOVLER, V., SHOHAMI, E., SLAVIN, S. Induction of antitumor immunity by indomethacin. *Cancer Immunology*. **Immunotherapy**, v. 48, p. 613-620, 2000.
- NAKANO, Y., KOBAYASHI, W., SUGAI, S., KIMURA, H., YAGIHASHI, S. Expression of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Japanese Journal Cancer Research**, v. 90, p. 858-866, 1999.
- NATARAJAN, K., MORI, N., ARTEMOV, D., ABOAGYE, E. O., CHACKO, V. P., BHUJWALLA, Z. M. Phospholipid profiles of invasive human breast cancer cells are altered towards a less invasive phospholipid profile by the anti-inflammatory agent indomethacin. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 40, p. 271-284, 2000.
- NATHAN, C. F., BRUKNER, L. H., SILVERTESS, S. C., COHN, Z. A. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. I. Pharmacology triggering of effector cells and release of hydrogen peroxidase. **J. Exp. Med.**, v. 149, p. 84-92, 1979.

- NOGUCHI, M., ROSE, D. P., EARASHI, M., MIYAZAKI, I. The role of fatty acids and eicosanoid synthesis inhibitors in breast carcinoma. **Oncology**, v. 52, p. 265-271, 1995.
- NOZAKI, S., SLEDGE, G. W., NAKSHATRI, H. Cancer cell-derived interleukin-1 alpha contributes to autocrine and paracrine induction of pro-metastatic genes in breast cancer. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 275, p. 60-62, 2000.
- OGINO, M., HISATOMI, H., MURATA, M., HANAZONO, M. Indomethacin supresses the growth of colon 26, Meth-A and FM3A tumors in mice by reducing the prostaglandin E₂ content and telomerase activity in tumor tissues. **Jpn J Cancer Res**, v. 90, p. 758-764, 1999.
- ÖGMUNDSDÓTTIR, H. M., PÉTURSDÓTTIR, I., GUDMUNDSDÓTTIR, I. Interactions between the Immune System and breast cancer. **Acta Oncologica**, v. 34, p. 647-650, 1995.
- ONozAKI, K., MATSUSHIMA, K., AGGARWAL, B. B., OPPENHEIM, J.J. Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. **The Journal of Immunology**, v. 135, p. 3962-3968, 1985.
- ONozAKI, K., TAMATANI, T., HASHIMOTO, T., MATSUSHIMA, K. Growth inhibition and augmentation of mouse myeloid leukemic cell line differentiation by interleukin-1. **Cancer Research**, v. 47, p. 2397-2402, 1987.

- O'SULLIVAN, C., LEWIS, C. E. Tumor-associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 172, p. 229-235, 1994.
- PARHAR, R. S., LALA, P. K. Prostaglandin E₂-Mediated Inactivation of various Killer Lineage Cells by Tumor-Bearing Host Macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v.44, p.474-484, 1988.
- PATRIGNANI, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, COX-2 and colorectal cancer. **Toxicology Letters**, v. 112-113, p. 493-498, 2000.
- POOLE, T. J., ZETTER, B. R. Stimulation of rat peritoneal mast cell migration by tumor-derived peptides. **Cancer Research**, v. 43, p. 5857-5861, 1983.
- RAHAL, M. D., REINISH, E., OSMOND, D. G. Changes in the populations of null, NK 1.1+, and Thy 11o lymphocytes in the bone marrow of tumor-bearing mice: effect of indomethacin treatment. **Cell Immunol.**, v. 139, p. 218-228, 1992.
- RAZ, A, LEVINE, G, KHOMIAK, Y. Acute local inflammation potentiates tumor growth in mice. **Cancer Lett**, v. 148, p. 115-120, 2000.
- ROSENBERG, S.A., PACKARD, B.S., AEBERSOLD, P. M., SOLOMON, D., TOPALIAN, S.L., TOY, S. T., SIMON, P., LOTZE, M. T., YANG, J. C., SEIPP, C. A., SIMPSON, C., CARTER, C., BOCK, S., SCHWARTZENTRUBER, D., WEI, J. P., WHITE, D. E. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic

- melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 22, p. 1676-1680, 1988.
- ROTH, M. D., GITLITZ, B. J., KIERTSCHER, S. M., PARK, A. N., MENDENHALL, M., MOLDAWER, N., FIGLIN, R. A. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4 enhance the number and antigen-presenting activity of circulating CD14+ and CD83+ cells in cancer patients. **Cancer Research**, v. 60, p. 1934-1941, 2000.
- SANTORO, M. G., PHILPOTT, G. W., JAFFE, B. M. Inhibition of tumor growth “ in vivo “ and “in vitro “ by prostaglandin E. **Nature**, v. 263, p. 777-779, 1976.
- SANTORO, M. G., PHILPOTT, G. W., JAFFE, B. M. Inhibition of B-16 melanoma growth “ in vivo “ by a synthetic analogue of PGE₂. **Cancer Res.**, v. 37, p. 3774-3779, 1977.
- SATO, N. L., FUJISAWA, N., KATO, A., MAEDA, Y., YAMAMOTO, Y. Tumor Dormancy and the Effect of Selected Drugs on the Tumor-dormant State. **Laboratory Animal Science**, v. 42, p. 555-560, 1992.
- SEGURA, J. A., BARBERO, L. G., MARQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Letters**, v. 414, p. 1-6, 1997.
- SERVE, H., OELMANN, E., HERWEG, A., OBERBERG, D., SERVE, S., REUFI, B., MÜCKE, C., MINTY, A., THIEL, E., BERDEL, W. E. Inhibition of proliferation and clonal growth of human breast cancer cells by interleukin-13. **Cancer Research**, v. 56, p. 3583-3588, 1996.

- SHARMA, S., STOLINA, M., LIN, Y., GARDNER, B., MILLER, P. W., KRONENBERG, M., DUBINETT, S. M. T Cell-Derived IL-10 Promotes Lung Cancer Growth by Suppressing Both T Cell and APC Function. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 5020-5028, 1999.
- SHEU, B., HSU, S., HO, H., LIN, R., TORNG, P., HUANG, S. Reversed CD4/CD8 Ratios of Tumor-Infiltrating Lymphocytes are Correlated with the Progression of Human Cervical Carcinoma. **Cancer**, v. 86, p. 1537-1543, 1999.
- SIEGAL, C. B., SCHWAB, G., NORDAN, R. P., FITZGERALD, D. J., PASTAN, I. Expresión of the interleukin-6 receptor and interleukin-6 in prostate carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 50, p. 7786-7788, 1990.
- SILVA, R. J. **Perfil de Citocinas no Tumor Ascítico de Ehrlich tratado com veneno de *Bothrops jararaca***. Botucatu, 2000. Tese (Doutoramento) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- SNYDERMAN, R., PIKE, M. C., BLAYLOCK, B. L., WEINSTEIN, P. Effect of neoplams on inflammation: depression of macrophage accumulation after tumor implanton. **J. Immunol.**, v. 116, p. 585-589, 1976.
- SPRIGGS, D., IMAMMURA, K., RODRIGUEZ, C., HORIGUCHI, J., KUFU, D. W. Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 6563-6566, 1987.

- STRAUSSER, H. R. & HUMES, J. L. Prostaglandin synthesis inhibition : Effect on bone changes in sarcoma in BALB/c mice. **Int. J. Cancer**, v. 15, p. 724-730, 1975.
- SUGIURA, K. Tumor transplantation. In: GAY, W. I. **Methods of Animal Experimentation**. Acad. Press NY and London, 1965. vol. 2, cap. 3, p. 171-222.
- TILDEN, A. B., BALCH, C. M. Indomethacin enhancement of immunocompetence in melanoma patients. **Surgery**, v. 90, p. 77-84, 1981.
- TOWNSEND, S. E., ALLISON, J. P. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. **Science**, v. 259, p. 368-370, 1993.
- TRACEY, K. J. **Tumor necrosis factor-alpha**, cap. 16, p. 289-304. In: THOMSON A. The cytokine handbook, 2 ed., San Diego: Academic Press, 1994, p. 615.
- TREON, S. P., ANDERSON, K. C. Interleukin-6 in multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 5, p. 42-48, 1998.
- TUKEY, J. W. **Easy summaries numerical and graphical**, cap. 2, p. 27-56. In: TUKEY, J. W., Exploratory Data Analysis, 1 ed., USA: Addison-Wesley Publishing Company, 1977, 688 p.
- VAN DER POUW KRAAN, T. C., BOEIJE, L. C., SMEENK, R. J., WIJDENES, J., AARDEN, L. A. Prostaglandin-E₂ is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. **Journal Exp. Med.**, v. 181, p. 775-779, 1995.

- VANDERVEEN, E., GREKIN, R. C., SWANSON, N. A., KRAGBALLE, K. Arachidonic Acid Metabolites in Cutaneous Carcinomas. **Arch. Dermatol.**, v. 122, p. 407-412, 1986.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandins biosynthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature (New Biol.)**, v. 231, p. 232-235, 1971.
- VAN MEIR, E., SAWAMURA, Y., DISERENS, A. C., HAMOU, M. F. DE TRIBOLET, N. Human glioblastoma cells release interleukin-6 in vivo and in vitro. **Cancer Research**, v. 50, p. 6683-6688, 1990.
- WANG, Z., CHEN, Y., ZHENG, R., QIN, D., CHEN, X., WANG, Y., LIU, G. In vitro effects of prostaglandin E₂ or indomethacin on the proliferation of lymphokine-activated killer cells and their cytotoxicity against bladder tumor cells in patients with bladder cancer. **Prostaglandins**, v. 54, p. 769-779, 1997.
- WATSON, J. M., SENSINTAFFAR, J. L., BEREK, J. S., MATINEZ-MAZA, O. Constitutive production of interleukin-6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures. **Cancer Research**, v. 50, p. 6959-6965, 1990.
- WONG, P. Y., STAREN, E. D., TERESHKOVA, N., BRAUN, D. P. Functional Analysis of Tumor-Infiltrating leukocytes in breast cancer patients. **Journal of Surgical Research**, v. 76, p. 95-103, 1998.
- YAMAMURA, M., MODLIN, R. L., OHMEN, J. D., MOY, R. L. Local Expression of Antiinflammatory Cytokines in Cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 1005-1010, 1993.

- YU, C. L., HUANG, M. H., KUNG, Y. Y., TSAI, C. Y., TSAI, Y. Y., TSAI, S. T., HUANG, D. F., SUN, K. H., HAN S. H., YU, H. S. Interleukin-13 increases prostaglandin E₂ (PGE₂) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. **Inflammation Research**, v. 47, p. 167-173, 1998.
- ZEIDLER, R, WOLLENBERG B. Tumor cell-derived prostaglandin E₂ inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1. **FASEB J**, v. 14, p. 661-668, 2000.

Resumo

8. RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar o envolvimento das prostaglandinas no crescimento tumoral, influxo inflamatório e secreção de citocinas durante a evolução do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE). Para tanto, camundongos foram inoculados com 1×10^3 células tumorais (ip) e tratados com indometacina (1mg/Kg, 1x/dia, ip) ou com diluente (0,1 ml, 1x/dia, ip). Decorridos 1, 3, 6, 10 e 13 dias os animais foram sacrificados e avaliados quanto ao influxo inflamatório diferencial, secreção de TNF- α , IL-1- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 e níveis de PGE₂ no lavado peritoneal. Dois grupos controle adicionais foram constituídos de animais não portadores de TAE tratados com indometacina ou diluente, seguindo o mesmo protocolo. Os resultados obtidos demonstraram que o implante do TAE induz produção de PGE₂ durante toda sua evolução; aumento do número de células neoplásicas a partir do 10º dia e diminuição do influxo de células mesoteliais no 10º dia e de basófilos no 10º e 13º dia pós implante neoplásico. Em relação as citocinas o TAE induziu produção de IL-6 no 10º e 13º dia e de IL 2 no 13º dia, não alterando de modo significativo o perfil das outras citocinas estudadas. O tratamento de animais portadores de TAE com indometacina, foi eficaz em inibir o crescimento tumoral e a síntese de PGE₂ a partir do 10º dia de crescimento neoplásico, e promoveu aumento significativo no influxo de neutrófilos segmentados e de células nucleadas, apenas em tempos iniciais da evolução tumoral. Ainda, o tratamento com indometacina promoveu síntese de IL-13 e inibição significativa de IL-6 no 13º dia de crescimento tumoral, não alterando as outras

citocinas analisadas. No grupo não portador de tumor tratado com indometacina observamos aumento no influxo de neutrófilos segmentados no 1º dia, de linfócitos no 3º dia e de eosinófilos no 10º dia; não sendo detectada alteração na produção de nenhuma das citocinas em todos os tempos estudados. Tomados em conjunto, os resultados sugerem que a PGE₂ modula o crescimento do TAE e que a inibição do crescimento tumoral poderia ser estar em parte relacionada com supressão da liberação de IL-6 e estimulação da liberação de IL-13.

Palavras-chave: Tumor de Ehrlich; Indometacina; Leucócitos polimorfonucleares; Macrófagos; Linfócitos; Citocinas.

Abstract

9. ABSTRACT

The aim of the present study was investigate the prostaglandin involvement during the growth of Ehrlich Ascites Tumor (EAT), using as parameters: tumoral growth, inflammatory influx and cytokine profile. Mice were inoculated with 1×10^3 tumor cells (ip) and treated with indomethacin (1mg/Kg,1x/day,ip) or diluent (0,1ml,1x/day,ip). After 1, 3, 6, 10 and 13 days the animals were sacrificed and evaluated in relation to inflammatory influx, secretion of TNF $-\alpha$, IL1- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-13 and PGE₂ level, in peritoneal cavity. Two groups no bearing EAT were treated with indomethacina or diluent as control ,following the same protocol. The results demonstrated that EAT implant induces PGE₂ production during all evolution; increases tumoral cells number from the 10th day and decreases the mesotelial cells on 10th day and basophils cells on 10th and 13rd day. The cytokine profile showed EAT induces production of IL 6 from 10th day and of IL 2 on 13rd day, the other studied cytokines were not affected in a significant way. The indomethacin treatment of EAT bearing mice inhibited the tumoral growth and PGE₂ synthesis from the 10th day and promoted significant increase on the neutrophils influx and total inflammatory cells, just in initial times of the tumoral evolution. Indomethacin treatment also promoted IL-13 synthesis and significant inhibition of IL-6 on 13rd day of EAT growth, but did not altered the others cytokines. The indomethacin treatment of animals do not bearing EAT increases neutrophils influx on the 1st day, lymphocytes on the 3rd day, eosinophils on 10th day; and no detected alteration was detected on

cytokine profile Taken together, the results suggest that EAT growth is modulate by PGE₂ and the inhibition of the tumoral growth could be partly related with suppression of IL-6 and liberation of IL-13.

Key-words: Ehrlich Tumor; Indomethacin; Leukocytes; Mononuclear; Cytokines.