

**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara**

**Novas alternativas quimioterápicas para o tratamento do câncer através de
compostos organometálicos de paládio**

Tatiane Giraldi de Sá

Orientadora: Iracilda Zeppone Carlos

**Araraquara-SP
2011**

**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara**

**Novas alternativas quimioterápicas para o tratamento do câncer através de
compostos organometálicos de paládio**

Tatiane Giraldi de Sá

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação de Farmácia -Bioquímica
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, para obtenção do grau de
Farmacêutico-Bioquímico**

**Orientadora Iracilda Zeponne Carlos
Laboratório de Imunologia Clínica
Departamento de Análises Clínicas**

**Araraquara-SP
2011**

Dedicatória

Dedico esse trabalho à toda minha família.

Por ser minha base e meu porto seguro, acreditando que meu sonho seria sim possível, apesar das inúmeras dificuldades ao longo desses anos.

Tudo isso foi concretizado graças ao apoio incondicional de todos vocês, ao carinho e as palavras de otimismo e afeto nos momentos que precisei.

Dedico principalmente aos meus pais por tudo que fizeram e ainda têm feito por mim até hoje. Pelos sacrifícios em nome dos filhos, pela dedicação e pelo amor.

Dedico também ao meu irmão Alexandre, que sabe que sua ajuda teve um valor único e que, graças a ela, terei uma dívida de gratidão eterna com ele.

Ao Rafa pelo carinho e pela força que me tem dado desde sempre.

Agradecimentos

A Deus, por me dar forças nos momentos mais difíceis e angustiantes. Obrigada, Senhor, por cuidar de tua filha e não deixá-la desamparada.

A minha orientadora, Iracilda Zeppone Carlos, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório contribuindo, com o seu extenso conhecimento na área e muita paciência, para minha formação acadêmica e, principalmente, enriquecimento profissional.

A Má, pela ajuda que me deu durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Por todo o seu suporte e também pelos puxões de orelha, claro... Reconheço que o mérito desse trabalho é seu também, Má.

Agradeço muito aos colegas da imunologia clínica por darem uma ajuda sempre que precisei e, principalmente, a Marisa que é uma mãezona naquele laboratório.

A Karol e Felipe do Instituto de Química de Araraquara (departamento de organometálicos) pelos compostos utilizados no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao Michel por fazer parte da minha vida me dando apoio; todo carinho que preciso ao compartilhar tantas coisas comigo e, principalmente, por me fazer feliz. Obrigada, meu bem.

As companheiras da República Arruaça pela amizade sincera e pelas gargalhadas compartilhadas. Aos amigos da faculdade de farmácia da UNESP Araraquara que me deram força nos momentos difíceis.

A minha grande amiga Juliana que sempre se fez presente.

LISTA DE TABELAS/FIGURAS

Figura 1	Produção de óxido nítrico em culturas de células peritoneais aderentes.....	27
Figura 2	Produção de IL-12 nos sobrenadantes das culturas de células aderentes.....	28
Figura 3	Produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes.....	29
Tabela 1	Teste de viabilidade celular em macrófagos peritoneais de animais portadores e não portadores de tumor.....	26
Tabela 2	Teste de viabilidade celular em células tumorais de Ehrlich após 24 horas de exposição.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS/SÍMBOLOS

°C	Graus Célsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
BSA	Bovine Serum albumin
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme linked imunnosorbent assay
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IQ	Instituto de Química
IL-12	Interleucina 12
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	Mililitros
mM	Micromolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido nítrico
Pd	Paládio
Pt	Platina

PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura-série 1640)
Th1	Tipo de linfócito T helper
Th2	Tipo de linfócito T helper
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta
<i>xg</i>	Força centrifugada relativa

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	12
2.OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivos gerais.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Delineamento experimental.....	16
3.2 Compostos organometálicos.....	17
3.3 Animais.....	18
3.4 Linhagem celular tumoral utilizada e manutenção do tumor <i>in vivo</i>	18
3.5 Obtenção de células tumorais e peritoneais.....	18
3.5.1 Isolamento das células tumorais de Erhich para os ensaios <i>in vitro</i>	18
3.5.2 Obtenção de células peritoneais e dos sobrenadantes das culturas.....	19
3.6 Viabilidade celular pela técnica MTT (MOSSMAN, 1983).....	20
3.6.1 Ajuste das concentrações das suspensões de células tumorais e células peritoneais.....	20
3.6.2 Ensaio de viabilidade celular de células tumorais e de células aderentes.....	21
3.7 Ensaios para verificação da ativação de células aderentes <i>in vitro</i>	22
3.7.1 Óxido nítrico (NO).....	22
3.7.2 Quantificação de TNF- α e IL-12 por teste imunoenzimático (ELISA).....	23
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24

5. RESULTADOS.....	25
5.1 Avaliação da citotoxicidade de macrófagos peritoneais e células tumorais de Ehrlich pela técnica de MTT (MOSSMAN, 1983).....	25
5.2 Determinação da citocina IL-12 nos sobrenadantes das culturas de células aderentes.....	27
5.3 Determinação da produção de óxido nítrico.....	28
5.4 Determinação da produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes.....	29
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÕES.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

O câncer, manifestação originada pelo crescimento descontrolado de células, afeta milhões de indivíduos. Os macrófagos são as primeiras células a serem ativadas para participar de uma resposta imunológica propriamente dita, são células capazes de secretar mais de cem produtos biologicamente ativos, entre esses, espécies reativas de nitrogênio e citocinas que atuam no contexto da resposta imunológica e/ou inflamatória. Sabendo que compostos de paládio (II) podem apresentar potenciais atividades antitumorais, neste trabalho foram testados os compostos de fórmula geral PdI_2 (tdmPz) e $\text{Pd}(\text{SCN})_2$ (tdmPz), quanto a atividade anti-inflamatória e antitumoral. Como droga padrão das reações realizadas foi utilizada a cisplatina. Foi determinada a ação destes compostos frente ao sistema imunológico através, de ensaios de determinação de índice de citotoxicidade mediano (IC_{50}) pela técnica de MTT, óxido nítrico (NO) e determinação das citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$ e IL-12. Além disso, foi determinada a atividade antitumoral dos compostos frente à célula tumoral de Ehrlich. Os resultados não mostraram produção de NO e das citocinas IL-12 e $\text{TNF-}\alpha$ pelos macrófagos peritoneais de animais normais e animais portadores do tumor de Ehrlich na sua forma sólida. No que se referem à atividade tóxica dos compostos testados, estes mostraram efeito citotóxico sobre os macrófagos e sobre a linhagem tumoral testada. Sendo assim mesmo não havendo a produção de mediadores pró-inflamatórios, os compostos apresentaram uma considerável citotoxicidade frente às células tumorais de Ehrlich e macrófagos peritoneais.

Palavras chaves: câncer, macrófago, tumor de Ehrlich, paládio, cisplatina

1. INTRODUÇÃO

O câncer se refere a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, podendo se espalhar para outras regiões do corpo (INCA, 2010).

Entre os diversos tipos de câncer, o que mais causa temor entre as mulheres é o de mama, devido a sua alta frequência, taxa de mortalidade e efeitos psicológicos. O risco estimado de câncer de mama no Brasil no ano de 2011 foi de 49240 casos; sendo as regiões Sul e Sudeste portadoras do maior número de casos, regiões Norte e Nordeste com menores números e região Centro Oeste com número intermediário de casos (INCA, 2010).

Descoberta em 1960, a cisplatina (cis diaminodicloroplatina (II) ($\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$) e a *cis* diaminotetracloroplatina ($\text{cis[Pt Cl}_4(\text{NH}_2)_2]$), têm sido utilizadas como quimioterápicos de primeira linha contra diversos tipos de cânceres, como pulmão, cabeça, pescoço, ovário, esôfago, estômago, cólon, bexiga, testículos, cérvix (Stathopoulos et al., 1999; Boulikas e Vougiouka, 2004; Bradley et al., 2009) .

A cisplatina tem como alvo de ação direta o DNA, fazendo ligação com o Zn presente no DNA da polimerase. Sendo essa uma ligação 100 vezes mais forte do que a ligação da DNA polimerase com o N7 da cisteína do DNA. Porém seu uso clínico é bastante limitado, devido a severos efeitos adversos como ototoxicidade, neurotoxicidade e nefrotoxicidade (American Cancer Society 2006; Boulikas, 2004; Decatris et al., 2004) sendo a última o principal fator limitante (Hah SS et al., 2006). Estas e outras desvantagens associadas com a toxicidade da cisplatina, são as maiores motivações para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais contendo outros íons metálicos como o paládio(II) com intuito de se obter novas drogas que apresentem uma elevada atividade antitumoral além de reduzida citotoxicidade em comparação à

cisplatina e compostos análogos (Costa 2004; De Almeida et al., 2005; Navarro et al., 2006; Wong e Giandomenico, 1999).

O tumor de Ehrlich é um tipo de tumor transportável bastante utilizado em avaliações experimentais, descrito por Ehrlich em 1905. Trata-se de uma neoplasia de origem epitelial maligna mamária (adenocarcinoma) de camundongos fêmeas, podendo crescer tanto na forma sólida quanto na forma ascítica (Dagli 2004; Gomes, 2008) . É comumente utilizado como modelo no estudo da ação de componentes físicos, químicos e biológicos sobre crescimento, patenogênese, cinética, imunologia, bioquímica e terapêutica dos tumores (Palermo-Neto, 2008).

O câncer, tratando-se de um processo patológico, pode provocar uma resposta imunológica (Killon e Filfder, 1994; Erreni et al., 2009). As células do sistema imune do hospedeiro capazes de promover defesa contra os tumores são as células *natural killer* (NK) ativadas, células T e macrófagos ativados (Filep et al., 1996; Siveen e Kuttan, 2009).

Os macrófagos, quando não há processo inflamatório, têm a função de remover células mortas e danificadas. Existindo inflamação, podem exercer três funções: fagocitose, apresentação de antígenos e modulação da resposta imune. Durante a inflamação passam a ter capacidade fagocítica aumentada e habilidade de gerar metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio (Fujiwara e Kobayash, 2005). São responsivos a estímulos internos e externos, sendo o LPS, (lipopolissacarídeo), muito utilizado para essa finalidade. Entre os efeitos provocados pelo LPS, têm-se o aumento na produção de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-1, expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), secreção de óxido nítrico, reativos de oxigênio, além de regularem a expressão de moléculas de adesão na superfície de macrófagos (Eberhardet, 2001; Klimp et al., 2002; Mikulak et al., 2009).

O NO atua como modulador em algumas funções como agregação plaquetária, neuro transmissão, atividade tumoricida, microbicidas e imunossupressão (Garcia e Stain, 2006). Possui

atividade antitumoral, promovendo inibição da proliferação, promoção da diferenciação e redução da progressão metastásica em alguns tipos de células tumorais (Marcinkiewickz, 1997). A enzima óxido nítrico sintase, iNOS, através de oxidação da L-arginina, sintetiza NO (Palmer et al., 1998, Celada e Natan, 1994, Cerqueira, 2002). A ativação da iNOS, em macrófagos murinos, ocorre através de estímulos como IFN- γ (Ding et al., 2009) e TNF- α (Drappier et al., 1988).

O TNF- α é uma citocina produzida em resposta a numerosos estímulos, e induz a inflamação aguda pelo aumento da permeabilidade endotelial, recrutamento de células inflamatórias e estímulo para liberação de superóxido e citocinas pelas células polimorfonucleares. (Granell et al, 2004).

A IL-12 é uma citocina importante que exerce função central no início e na regulação das respostas imunes celulares. Detém a capacidade de promover a diferenciação de células de padrão Th1. A IL-12 estimula a produção de IFN- γ pelas células NK e linfócitos proporcionando um importante elo entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa. (Alber et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

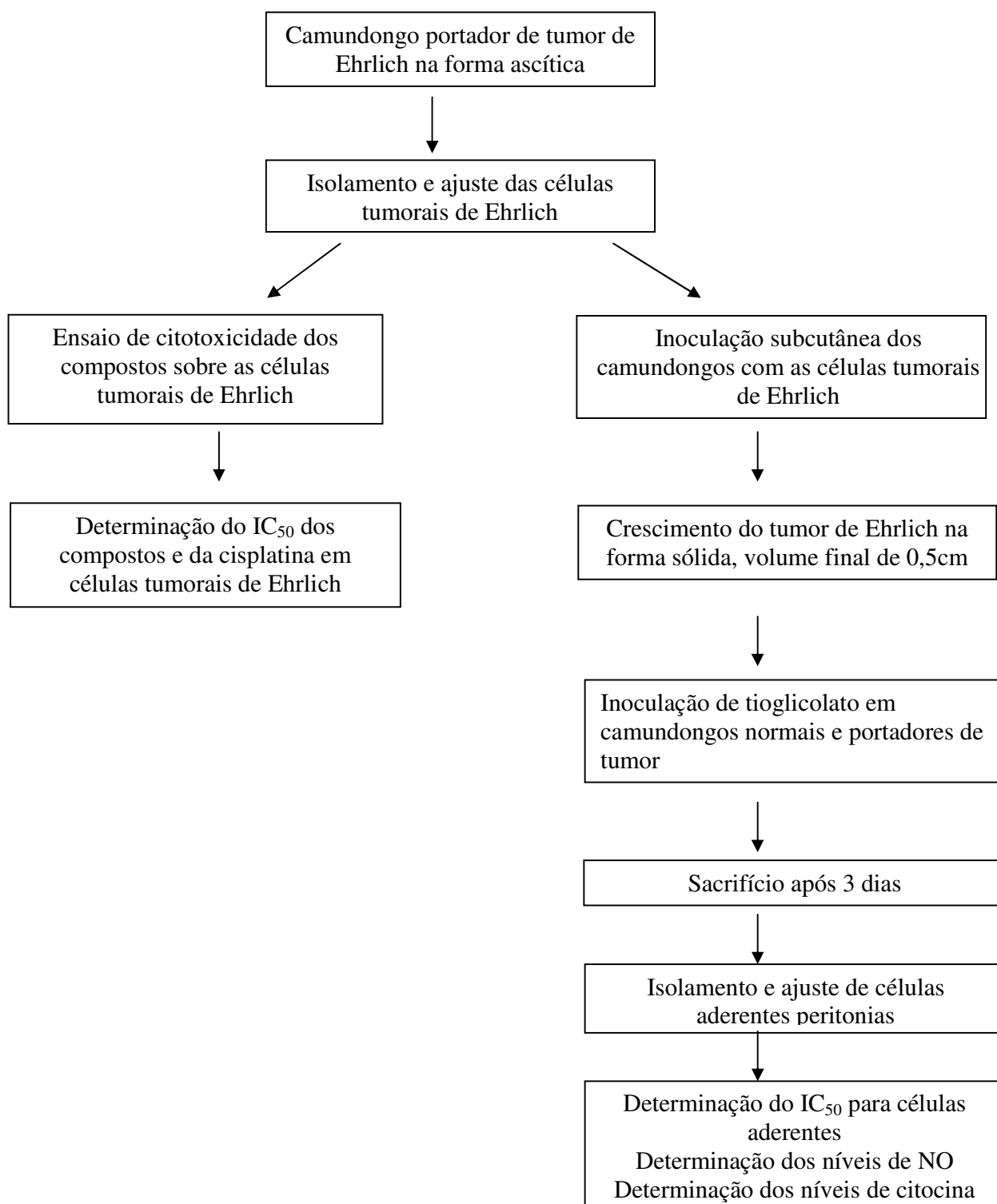
Sabendo que os compostos de paládio(II), de forma geral $[\text{PdI}_2(\text{tdmPz})]$ e $[\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{tdmPz})]$ podem apresentar potenciais atividades antitumorais, o presente trabalho avaliou a ação deles sobre as células da linhagem tumoral de Ehrlich e macrófagos *in vitro*.

2.2 Específicos

- a) O índice de citotoxicidade mediano (IC_{50}) dos organometálicos sobre as células estudadas;
- b) A produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos;
- c) A produção das citocinas tais como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-12 pelas células aderentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental



3.2 Compostos organometálicos

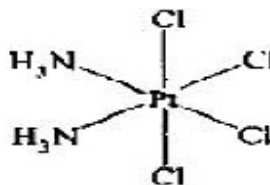
Os compostos organometálicos utilizados nesse trabalho foram sintetizados de Laboratório de Orgometálicos e Química de Coordenação pelo doutorando Felipe Vieira Rocha sob a supervisão do Prof. Dr. Adelino Vieira Godoy Netto, no Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química de Araraquara. Os métodos para obtenção dos complexos estão descritos na literatura (De Lucca Neto et al., 1999; Caíres et al., 1999; De Almeida et al., 2005).

Os compostos utilizados foram: $[\text{PdI}_2(\text{tdmPz})]$ diiodo 1tiocarbomoil 3,5dimetilpirazólico paladium e $[\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{tdmPz})]$ (1tiocarbomoil 3,5dimetilpirazólico) ditiocianatopaladium II .

Também foi utilizado a cisplatina (cis-PT), fabricada por F H Fsulding & Companhia Ltda Austrália como droga padrão.



cis diaminodicloroplatina (II)



cis diaminotetracloroplatina (II)

Quimica nova, 1989

3.3 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas de seis semanas, pesando entre 18 e 25 gramas, fornecidos pelo biotério central da faculdade de ciências farmacêuticas, UNESP, situado na cidade de Araraquara. Foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (purina) “ad libitum” em local climatizado ($23 \pm 2^\circ \text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar) com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas.

3.4 Linhagem celular tumoral utilizada e manutenção do tumor *in vivo*

Empregou-se modelo tumoral de Ehrlich na forma ascítica *in vivo* através de repiques semanais. Para manutenção do tumor *in vivo*, 1.10^7 células tumorais em volume de 0,2 ml foram inoculadas intraperitonalmente em camundongos receptores, a cada 7 dias, segundo metodologia descrita na literatura (Fecchio et al.,1990).

3.4.1 Inoculação das células tumorais

Os camundongos, após assepsia local com álcool, foram inoculados subcutaneamente com 0,25 ml da suspensão tumoral ajustada na concentração de 1.10^7 células tumorais/ml em PBS.

3.5 Obtenção de células tumorais e peritoniais

3.5.1 Isolamento das células tumorais de Erhich para os ensaios *in vitro*

Após 5 dias de evolução do tumor, período no qual não há influxo significativo de células inflamatórias (Feccchio et al.,1990), sacrificou-se os camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma ascítica em câmara de CO₂ e seus fluído ascítico foram retirados assepticamente em fluxo laminar Classe 100 (Veco, ind.Bras.).

Para o preparo da suspensão celular, esta foi centrifugada duas vezes com 5 volumes de cloreto de amônio (NH₄Cl), Labsynth Ind. Brás. Ltda) 0,17M (SLATER et al., 1982), e depois duas vezes com solução salina tamponada de fosfatos de pH 7,2 , estéril (PBS) a 200xg durante 5 minutos. Após esse procedimento, as células tumorais de Ehrlich sedimentadas forma ajustadas para o ensaio *in vitro* (Saad-Hossne et al., 2004).

As células tumorais sedimentadas foram ressuspensas em 1,0 ml de meio RPMI -1640-C para os ensaios de citotoxicidade e/ou viabilidade *in vitro*, sendo ajustadas à concentração de 1.10⁶ células/ml (Esteves-Souza et al., 2002). O número de células é determinado por contagem em câmara hemocitométrica do tipo Neubauer (Boeco, Alemanha) utilizando-se o corante azul de Tripan.

3.5.2 Obtenção de células peritoneais e dos sobrenadantes das culturas

Os animais inoculados com as células tumorais (volume tumoral= 0,5 cm³) e animais normais (não portadores de tumor) foram estimulados previamente pela inoculação intraperitoneal de 3,0ml de tioglicolato de sódio a 3,0% (Difco Lab. Ltda, EUA) três dias antes do sacrifício. Após o sacrifício em câmara de CO₂, os animais tiveram a pele abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (Veco, Ind. Brás.) e o peritônio exposto. Em seguida, foi inoculado intraperitonealmente 5,0 ml de PBS e, após massagem peritoneal para garantir a obtenção de células peritoneais, o líquido peritoneal resultante foi coletado com seringa

e agulha e transferido para um tubo cônico estéril (Coming, Inc., EUA) e centrifugado (Centrífuga Fanem, Ind. Brás.) a 200xg durante 5 minutos; o sedimento celular obtido será lavado três vezes com 3,0ml de PBS. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em RPMI-1640-C para a contagem em câmara hemocitométrica do tipo Neubauer (Boeco, Alemanha) e ajustadas às concentrações exigidas para a realização de cada teste imunológico.

Para a obtenção dos sobrenadantes das culturas (para dosagem das citocinas), 1,0ml das suspensões de células peritoniais ajustadas a 5.10^6 células/ml e meio RPMI-1640-C foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning Inc.,EUA) e acrescentado o mesmo volume das soluções dos diferentes compostos nas concentrações IC_{50} obtidas no período de 24 horas de incubação, LPS (Sigma Chemical Co.,EUA) (controle positivo) na concentração de 10µg/ml ou somente em meio de cultura RPMI-1640-C (controle negativo) e as placas serão incubadas a 37°C em estufa (Forma Scientific, EUA) com tensão constante de 7,5% de CO₂ por 24 horas de incubação. Os sobrenadantes das culturas foram então coletados, centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha) a 4° C , aliquotados em eppendorfs e estocados a -80°C para posterior dosagem das citocinas TNF- α e IL-12.

3.6 Viabilidade celular pela técnica MTT (MOSSMAN, 1983)

3.6.1 Ajuste das concentrações das suspensões de células tumorais e células peritoneais

Todas as suspensões celulares empregadas nos ensaios de viabilidade celular foram ajustadas em meio RPMI-1640-C, sendo que as suspensões de células tumorais foram ajustadas à concentração de 1.10^6 células/ml e as suspensões de células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5.10^6 células /ml.

3.6.2 Ensaio de viabilidade celular de células tumorais e de células aderentes

Alíquotas de 100 µl das suspensões celulares obtidas conforme item 3.5.2 ajustadas às concentrações previamente descritas no item 3.6.1, foram adicionadas em placas de 96 cavidades para cultivo de tecidos (Corning, Inc., EUA). Para as células peritoneais de animais normais e portadores do tumor sólido, assim como para células tumorais, as placas serão incubadas em estufas (Forma Scientific, EUA) a 37° C, com tensão constante de 7,5% de CO₂ por 1 hora para formação de tapete celular. Descartou-se o sobrenadante e, tanto sobre as células aderidas quanto sobre células tumorais sedimentadas, foram adicionados em triplicata 100µl dos compostos: [PdI₂(tdmPz)] e [Pd (SCN)₂(tdmPz)], além da cisplatina (padrão) nas diferentes concentrações ou ainda o mesmo volume de RPMI-1640-C como controle de células. A incubação das placas foi feita durante 24 horas em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37° C, com tensão constante de 7,5% de CO₂. Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram descartados e 100µl de uma solução de MTT [brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2-5-dineniltetrazólico, (Sigma)] diluído em tampão PBS a 5mg/ml e posteriormente em meio RPMI-1640-C na proporção 1:5 , foram adicionados á placa, sendo posteriormente incubada por 3h a 37°C, tensão de 7,5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). O sal de tetrazólio, nessas condições, sofre metabolização pelas proteinases mitocondriais das células vivas formando cristais de formazona. Após a incubação o sobrenadante foi desprezado e adicionado a 100µl de isopropanol (Mallinckrodt, México) para solubilizar os cristais. A leitura da absorbância realizou-se em espectofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystem, Finlândia) a 540nm com filtro de referência a 620nm.

A determinação de 50% da concentração inibitória do composto (IC_{50}), a concentração do agente que reduz em 50% a viabilidade celular, foi quantificada com auxílio gráfico (concentração x viabilidade celular) por regressão linear com limite de confiança de 95% e o IC_{50} definido através de equação da reta gerada (Microcal Software Origin tm versão 5,0).

3.7 Ensaios para verificação da ativação de células aderentes *in vitro*

3.7.1 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, sendo $NaNO_2$ utilizado como padrão de acordo com literatura (Grenn et al., 1982). A concentração celular do exsudato peritoneal obtido conforme item 3.5.2 foi ajustada a 4.10^6 células/ml em meio RPMI-1640-C para a detecção de NO nos sobrenadantes das culturas. Às placas de 96 cavidades (Corning Inc., EUA), foram acrescentados 100µl da suspensão celular e então incubadas em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37° C, com tensão constante de 7,5% de CO_2 por 1h para a formação do tapete celular. O sobrenadante foi descartado e, sobre esses tapetes de células aderidas, adicionou-se em triplicata 100µl dos compostos, ou cisplatina (padrão) na concentração de seu IC_{50} . Em algumas cavidades da placa, foi adicionado 100µl da solução de LPS à 10µg/ml (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma Chemical. Co, EUA) como agente estimulante (controle positivo). Em outras cavidades, foi adicionado 100µl de meio RPMI-1640-C à suspensão celular, como controle de células (controle negativo). A placa assim constituída foi incubada em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37°C com tensão constante de 5% CO_2 . Após incubação, foram retiradas alíquotas de 50µl dos sobrenadantes de cada amostra, transferidas para outra placa e adicionados 50µl/cavidade de reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina, 1% de

sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%. Após 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas com filtro de 540 nm. A concentração de NO foi calculada a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares de nitrito de sódio conhecidas em meio RPMI-1640-C. Os testes foram realizados em triplicata e os valores expressos em μmol de NO/ 5.10^5 células.

3.7.2 Quantificação de TNF- α e IL-12 por teste imunoenzimático (ELISA)

As citocinas TNF- α e IL-12 foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células aderentes, conforme descrito no item 3.5.2. Será utilizado o teste imunoenzimático ELISA de captura para cada citocina, utilizando o Kit Duocet®, BD , de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 orifícios (Corning Inc., EUA) foram adsorvidas com o anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em solução salina de fosfatos, pH 7,2 (PBS) (100 μl por cavidade) e incubadas por aproximadamente 18 hs à temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 , contendo 0,05% de Tween-20 [(PBS-T), Merck, Alemanha] e bloqueadas com 300 μl /cavidade de BSA (Sigma Chemical Co., EUA) a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 minutos. Após incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Após a última lavagem foi adicionada a cada cavidade 100 μl do padrão de citocinas ou mesmo volume dos sobrenadantes da cultura de células a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 3 vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 μl /cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina, diluído à concentração adequada de cada citocina em

diluyente de reagente (1% BSA, 0,05% de Tween 20 em PBS, pH 7,2– 7,4). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T. A seguir foram adicionados 100µL/cavidade da placa do conjugado peroxidase–estreptavidina diluído 1/200 em diluyente de reagente, as placas foram incubadas novamente á temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e em seguida adicionadas de 100µl de substrato (10mM de tampão citrato-fosfato,contendo 0,4mM de tetrametilbenzidina e 1,2mM de H₂O₂) em cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50µl de H₂SO₄ 2N a cada cavidade. A absorbância foi lida a 450nm em espectofotômetro UV/Vsível para microplacas (Multiskan Ascent Labsystems, Finlândia), e as concentrações foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecidas com quantidades conhecidas dos padrões de cada citocina. Os resultados foram expressos em pg/ml.

4. ANÁLISE ESTÁTISTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Graph Pad Instat aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância a 5 % através de comparações múltiplas pelo teste de Tukey.

5.RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade de macrófagos peritoneais e células tumorais de Ehrlich pela técnica de MTT (MOSSMAN, 1983)

Os ensaios para determinação de citotoxicidade demonstraram que os macrófagos obtidos de animais não portadores e animais portadores do tumor de Ehrlich sólido são sensíveis ao potencial tóxico dos compostos, assim como da droga padrão cisplatina, quando incubados por 24h.

A atividade citotóxica dos compostos de paládio II assim como a da cisplatina para macrófagos peritoneais estão representados na Tabela 1. Observou-se que, tanto para animais não portadores de tumor de Ehrlich quanto para animais portadores, o composto $[\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{tdmPz})]$ apresentou um maior potencial citotóxico ($11,86 \pm 8,12$ e $20,53 \pm 0,64$, respectivamente).

A tabela 2 apresenta a atividade citotóxica dos compostos de paládio II assim como a cisplatina para célula tumoral de Ehrlich. De acordo com a tabela, o composto $[\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{tdmPz})]$ apresentou o maior potencial citotóxico para célula tumoral de Ehrlich ($11 \pm 1,09$).

Após a definição do índice de toxicidade mediano IC_{50} para animais portadores e não portadores do tumor de Ehrlich, utilizou-se esses valores para a realização dos testes propostos no estudo.

Tabela 1- Teste de viabilidade celular em macrófagos peritoneais de animais portadores e não portadores de tumor

Compostos	IC₅₀^{1,2}	IC₅₀^{1,2}
[PdI₂(tdmPz)]	20,44 ± 8,67	49,35 ± 1,9
[Pd(SCN)₂(tdmPz)]	11,86±8,12	20,53 ± 0,64
Cisplatina	71,69 ± 2,15	113,21 ± 0,28

¹⁻ 5.10⁶ células / cavidade.

²⁻ Os valores acima são dados como média ± DP de cinco animais em triplicata, valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em µM.

Tabela 2- Teste de viabilidade celular em células tumorais de Ehrlich após 24 horas de exposição

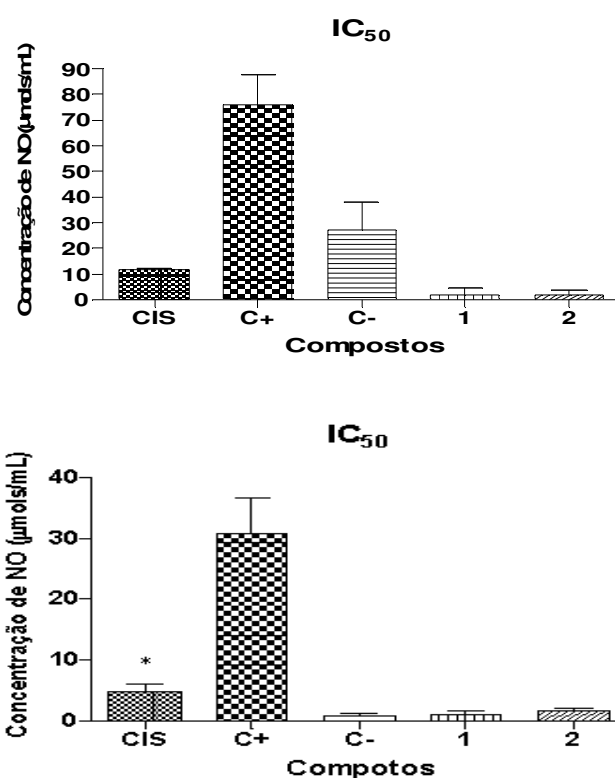
IC₅₀^{1,2}	Célula Tumoral de Ehrlich
[PdI₂(tdmPz)]	20 ± 2,0
[Pd(SCN)₂(tdmPz)]	11 ± 1,09
Cisplatina	40,28 ± 2,97

¹⁻ 5.10⁶ células / cavidade.

²⁻ Os valores acima são dados como média ± DP de cinco animais em triplicata, valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em µM.

5.2 Determinação da produção de óxido nítrico

No exudato de células peritoneais murinas de animais não portadores de tumor não houve produção significativa de óxido nítrico. Nos animais portadores de tumor também não houve produção significativa deste mediador pelos compostos testados. A droga padrão mostrou uma pequena produção deste ($p < 0,05$), quando testada em animais portadores de tumor, comparada com o controle negativo.

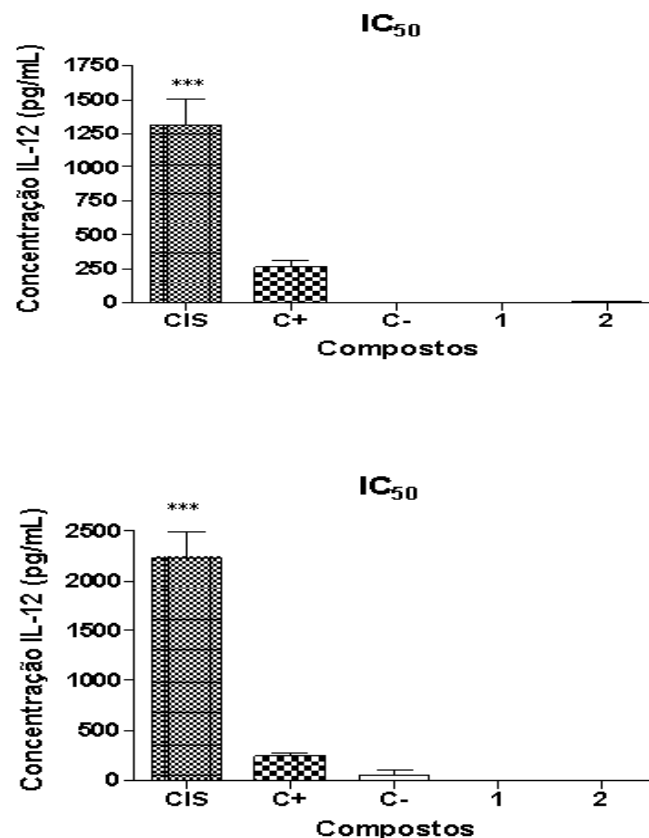


Figs 1. Produção de óxido nítrico em culturas de células peritoneais aderentes. As células aderentes de animais não portadores (1) e portadores do tumor sólido de Ehrlich (2) foram incubadas com os compostos e a cisplatina por 24 h de incubação em estufa de CO₂ a 37°C. Foi utilizado RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e LPS (controle positivo, C+). O composto 1 é o PdI₂(tdmPz) e o composto 2 é o Pd(SCN)₂(tdmPz). As concentrações de NO liberadas foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI-1640. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão de duplicatas de 6 animais.

* $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo.

5.3 Determinação da citocina IL-12 nos sobrenadantes das culturas de células aderentes

Nos macrófagos peritoneais murinos de animais portadores e não portadores do tumor de Ehrlich na sua forma sólida não houve uma produção significativa de IL-12 para nenhum dos compostos. Houve uma produção significativa de IL-12 quando tratadas com cisplatina ($p < 0,001$).

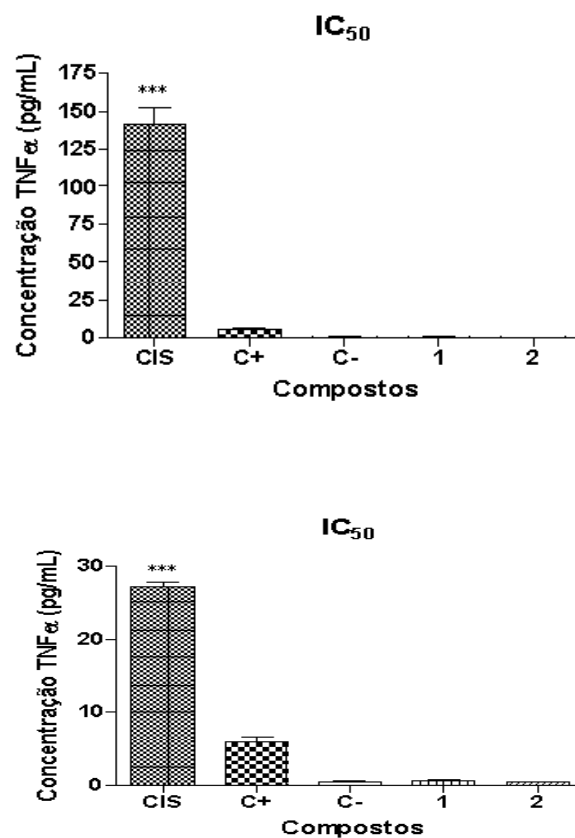


Figs 2. Produção de IL-12 nos sobrenadantes das culturas de células aderentes. As células aderentes de animais não portadores (1) e portadores do tumor sólido de Ehrlich (2) foram incubadas com os compostos e a cisplatina por 24 h de incubação em estufa de CO₂ a 37°C. Foi utilizado RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e LPS (controle positivo, C+). O composto 1 é o PdI₂(tdmPz) e o composto 2 é o Pd(SCN)₂(tdmPz). A determinação desta citocina foi realizado através do ensaio de ELISA. As concentrações de IL-12 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-12. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão de duplicatas de 6 animais.

* $p < 0,001$ quando comparado ao controle negativo.

5.4 Determinação da produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes

Nos macrófagos peritoneais murinos de animais não portadores de tumor e de animais portadores não houve uma produção significativa de TNF- α para nenhum dos compostos. Houve a produção desta citocina frente a droga padrão ($p < 0,001$).



Figs 3. Produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes. As células aderentes de animais não portadores (5) e portadores do tumor sólido de Ehrlich (6) foram incubadas com os compostos e a cisplatina por 24 h de incubação em estufa de CO₂ a 37°C. Foi utilizado RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e LPS (controle positivo, C+). O composto 1 é o PdI₂(tdmPz) e o composto 2 é o Pd(SCN)₂(tdmPz). A determinação desta citocina foi realizada através do ensaio de ELISA. As concentrações de TNF- α foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão de duplicatas de 6 animais.

*** $p < 0,001$ quando comparado ao controle negativo.

6. DISCUSSÃO

O paciente com câncer em processo de tratamento passa a sofrer perdas em sua qualidade de vida pelos sintomas da doença, mas também em consequência dos efeitos adversos do tratamento quimioterápico e radioterápico (Sawada et al, 2009).

Os três principais tipos de tratamento do câncer são a radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia. Sendo esse último objeto de estudo nas últimas quatro décadas (A. P. S et al., 2005).

Na medicina os complexos, ou melhor, quelatos, podem ser aplicados em quimioterapia. Um quelato é uma molécula em que o metal de transição se liga com uma molécula orgânica, chamada de ligante que funciona como base de Lewis, e o metal funciona como ácido de Lewis. O complexo mais usado em quimioterapia é a cisplatina, mas já existem pesquisas com outros íons: Rutênio, Titânio, Ouro, Ródio. O complexo através do íon metálico se liga as bases nitrogenadas do DNA da célula tumoral causando a sua morte, e impedindo que o tumor cresça (Farrel, 2002).

Os primeiros complexos de paládio, preparados com o intento de combater o câncer, datam de 1970. Em trabalhos recentes, compostos de paládio fazem parte de complexos que se destacam por serem mais potentes do que a cisplatina. (Zhang, 2003; Friebohn et al., 2005). A aplicação dos compostos de paládio II é proveniente da analogia químico-estrutural com a cisplatina, complexo utilizado como tratamento de escolha de vários tumores como cabeça ovariano e testicular (Cowan, 1997). Estudos sobre o mecanismo de ação da cisplatina apontam que, ao entrar na célula, esse fármaco sofre sucessivas reações de hidrólise para formar as espécies ativadas $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ e $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)]_2^+$ que reagem mais rapidamente com os alvos celulares. (Klein, 2009; Cepeda, 2007). O presente trabalho utilizou os compostos $[\text{PdI}_2(\text{tdmPz})]$ e $\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{tdmPz})$.

Os macrófagos possuem uma marcante capacidade de distinguir células neoplásicas em relação às normais provavelmente via moléculas de superfície. A expressão ótima da atividade tumoricida dos macrófagos geralmente requer contato entre o alvo celular e a célula efetora, exceto no caso de células tumorais susceptíveis a lise por mediadores solúveis liberados por fagócitos mononucleares. A citotoxicidade mediada por macrófago pode, portanto, depender de mecanismos envolvendo as membranas das células alvo, dos macrófagos ou de ambos. O contato entre células alvo e macrófagos representa uma firme ligação entre essas células e provavelmente é o primeiro passo para a destruição citolítica dessas. (Mantovani, 1989).

Inicialmente foi calculada a toxicidade dos compostos de paládio sobre macrófagos peritoneais de animais portadores e não portadores de tumor de Ehrlich sólido como também células tumorais ascíticas em um tempo de incubação de 24 horas para garantir a viabilidade dessa células. De acordo com a Tabela 1 e 2, todas as células testadas demonstraram possuir sensibilidade ao potencial tóxico dos compostos, assim como à droga padrão utilizada, cisplatina.

Muitas células são capazes de sintetizar NO através de heme proteínas da família citocromo P-450 like, chamados de NO sintase (NOS). Até o momento foram isoladas três isoenzimas, sendo duas constitutivas e uma induzível em determinadas células, recebendo as siglas respectivas de cNOS e iNOS. Todas as três isoenzimas são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7, 12 e 17; isoformas I, II e III respectivamente, (Wang Y, 1995). A iNOS ou isoforma II não é expressa constitutivamente, sendo induzidas nos macrófagos e outras células por lipopolissacárides bacterianos e/ou citocinas (Stuehr et al., 1991). Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos/neutrófilos ou outras

células ativadas que deveria ser tóxico para micro-organismos, parasitas ou células tumorais, podem lesar células saudáveis vizinhas, sendo esse mecanismo responsável pelos processos inflamatórios e autoimunes (Filho,2000).Sabendo que os macrófagos quando ativados liberam diversas substâncias como enzimas, fatores de coagulação , espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Stites et al., 2000), a atividade dos compostos sobre a imunidade inata foi avaliada através da determinação da produção de óxido nítrico, tanto para macrófagos peritoneais de animais portadores de tumor de Ehrlich sólido quanto para animais não portadores. De acordo com o gráfico 1 não houve produção significativa de NO frente aos compostos de paládio, apenas com a utilização de cisplatina houve produção de NO.

De acordo com Foss,1997, a interleucina IL-12 é produzida por macrófagos e atuam sobre linfócitos T, que passam a produzir suas próprias citocinas. A IL-12 estimula diretamente a célula NK, induzindo a produção de IFN- γ , com função de potencializar a ativação do macrófago. Como citado anteriormente, macrófagos estimulados produzem espécies reativas oxigênio e nitrogênio, sendo que a produção excessiva dessas substâncias pode levar a lise de células saudáveis vizinhas, resultando em uma resposta imune amplificada. Para avaliar a produção de IL-12, foi feito um ensaio de ELISA, cujos resultados apresentados no gráficos 2, demonstram não haver produção de IL-12 em animais portadores e não portadores de tumor sólido de Erlich quando tratados com compostos de paládio, entretanto com a droga padrão houve produção de IL-12.

O TFN- α é uma citocina pró-inflamatória podendo ser liberados por macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células NK, linfócitos, células do sistema nervoso, linfócitos Th 1, a síntese é induzida também por outras citocinas e mediadores da inflamação tais como IL-1, IL-2, IFN- γ e o próprio TFN- α (Zangh, Tracey, 1998).

As células tumorais também secretam o TFN- α , tendo papel pró e antitumoral. No caso de pró-tumoral é feito por via de indução de apoptose (Mocellin, Nitti, 2008) e no caso de atividade antitumoral é feito por estimulação de fatores angiogênicos, quimiocinas, entre outros (Yan et al., 2006). A atividade do TFN- α está relacionado com o receptor de membrana ao qual irá se ligar. Quando ligado ao TNFR1 (mais abundante) há estímulo da migração de neutrófilos e quando ligado ao TNFR2 há indução de apoptose e necrose (Al-Lamk et al., 2005; Jaruga-Killeen, Rayford, 2005). Para avaliar a produção de TFN- α , foi feito um ensaio de ELISA, os resultados, apresentados no gráfico 3, demonstram não haver produção de TFN- α em animais portadores e não portadores de tumor sólido de Erlich quando tratados com compostos de paládio, entretanto quando tratados com a droga padrão, cisplatina, houve produção de TFN- α .

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, os macrófagos peritoneais murinos assim como as células tumorais de Ehrlich na sua forma ascítica demonstraram sensibilidade ao potencial tóxico dos compostos $\text{PdI}_2(\text{tdmPz})$ e $\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{tdmPz})$, assim como ao da droga padrão. Os compostos não contribuíram para a produção de NO, assim como para a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- α , tanto em animais não portadores como animais portadores de tumor de Ehrlich na sua forma sólida.

Isso é um indicativo que os compostos não estimulam a produção de mediadores pró-inflamatórios diferente da droga padrão utilizada. Sugerimos que tais compostos possam então ser inibidores de tais mediadores, ou seja, podem assim possuírem uma atividade anti-inflamatória, o que seria mais interessante na contenção do desenvolvimento tumoral, necessitando assim de pesquisas futuras para a verificação desses dados.

Por fim, vale salientar que os compostos possuíram alta citotoxicidade frente a célula tumoral testada, conferindo assim uma atividade antitumoral considerável, e pertinente para realização de novos experimentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-LAMK,R.;WANG J.;VANDENABEELE P.;BRADLEY J.;THIRU S.;Luo D et al TNFR-1 and TNFR-2 mediated signaling pathwaysin human kidneys are cell type-specific and diferentially contribute to renal injury. **FASEB J.** ,116(3):213-9, 2005

ALBER, G., AL-ROBAIY, S., KLEINSCHEK, M., KNAUER, J., KRUMBHOLZ, P., RICHER, J., SCHOENEBERGER, S., SCHUETZE, N., SCHULZ, S., TOEFER, K.,VOIGLAENDER, R., LEHMANN, J., MUELLER, U. Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members. **J Allergy Clin Immunol.** 117(2 Suppl MiniPrimer):S441-5, 2006.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures 2004. Atlanta, 2004. p.60. Disponível em : www.cancer.org.

A. P. S.; BERALDO, H. de O.; CESAR, E. T. A Química Inorgânica na terapia do câncer. **Química Nova**, n. 6, p. 13-18, 2005.

BOULIKAS, T., VOUGIOUKA, M. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs. **Oncol. Rep.**, v.11, p.559-595, 2004

BRUNDA. M.J.; LUISTRO L.; WARRIER, R.R. Antitumor and antimetastatic activityof interleukin12 against murine tumor. **J. Exp. Med.**,v.30, p.178-223, 1993.

CAIRES, A.C.F.; ALMEIDA, E.T.; MAURO, A.E. Compostos ciclometalatos de coordenação intramolecular. **Quím. Nova**, v.19, p.59-72, 1999

CELADA A.; NATHAN, C. Macropage activation revisited. **Immunol. Today** p.100-102, 1994.

CEPEDA, V.; Fuertes, M. A.; Castilla, G.; Alonso, C.; Quevedo, C.; Pérez, J. M. **Anticancer Agents Med. Chem.** 7,3 2007.

CERQUEIRA, N.F. Óxido nítrico, revisão **Acta Cir. Bras.** vol.17 no.6 São Paulo 2002

COSTA, F.R. **Avaliação dos efeitos de compostos organometálicos de Paládio (II)** em culturas de células. 2004. 74 f. Dissertação (Mestrado em análises clínicas)-Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

COWAN, J.A **Inorganic Biochemistry: an introduction** 2nd ed New York:Wiley-VCH, p.342 1997.

DAGLI, M.L.Z, GUERRA, J.L.; SALDIVA P.H.N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid tumor ehrlich ascites tumor in mice. **Brazilian journal of veterinary research and animal science** p. 29, p97-103, 2004.

DE ALMEIDA, E.T.; MAURO, A.E.; SANTANA, A.M.; NETO, A.V.G.; CARLOS, I.Z. Emprego de compostos organometálicos mononucleares de paládio (II) na ativação de macrófagos peritoniais de camundongos. **Quím. Nova**, v.28, p. 405-408, 2005

DE LUCA NETO, V.A.; MAURO, A.E.; CAIRES, A.C.F.; ANANIAS, S.R.; DE ALMEIDA, E.T. Synthesis, characterization and thermal behaviour of cyclomapped compounds. **Polyedron**, v.18, p. 413-417, 1999.

DECATRIS, M.P.; SUNDAR, S.; O'BYRNE, K.J. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. **Cancer treat. Rev.**, v.4, p.53-81, 2004.

DING, A.H., NATHAN, C.F., and STUEHR, D.J., Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activated cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.** p.2407-2412, 1988.

DING, Y. The regulation of inflammatory cytokine secretion in macrophage cell line by the chemical constituents of *Rhus sylvestris*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 12ed., v.19, Issue 12, p. 3145-3350, 2009.

DRAPPIER, J.C., WIETZERBIN, J. and HIBBS, J.B. Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.** p.1587-1592, 1988.

EBERHARDET, M. K. **Reactive oxygen metabolites**: chemistry and medical consequences.

Boca Raton: CRC Press, p.590, 2001.

ERRENI M., BIANCHI P., LAGHI L., MIROLO M., FABBRI M., LOCATI M., MANTOVANI A., ALLAVENA P. Expression of Chemokines and Chemokine Receptors in Human Colon Cancer. **Methods in Enzymology**, v. 460 p.105-121, 2009

ESTEVEZ-SOUZA, A.; SILVA, T.M.S.; ALVES, C.C.F.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO,

R.; ECHEVARRIA, A. Citotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human k562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* espécies. **J. Braz. Chem. Soc.** v.13, p.838-842, 2002.

FARRELL, N. Biomedical uses and applications of Inorganic Chemistry. **An overview. Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, p. 1-4, 2002.

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.

FILEP, J.G.; BARON C.; LACHANCE S.; PERREAULT, C.; CHAN, J.S. Involvement of nitric oxide in target cell lysis and DNA fragmentation induced by murine natural killer cells. **Blood**, v.87, p.5136-5143, 1996.

FILHO, R.F. Óxido nítrico o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e função. **Rev Ass Med Brasil**, 46(3):265-271, 2000.

FOSS, N.T. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE ,30: 335-339, jul./set. 1997

FRIEBOLIN, W. SCHILLING, G.; ZOLLER M.; AMTMANN, E. Antitumoral activity of non-platinum xanthate complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, n.25, p.7925-7931, 2005.

FUJIWARA, N., KOBAYASHI, K. Macrophages and inflammation. **Curr Targets Inflamm allergy**, p. 281-286, 2005.

GARCIA, X., STEIN, F. Nitric oxide. **Semin Pediatr Infect Dis**.p.55-57, 2006.

GRANELL, S. Circulating TNF- α and its soluble receptors during experimental acute pancreatitis. **Cytokine**, San Diego, v.25, p.187-191, 2004.

GOMES, N.M. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**., v.119, p.179-184, 2008.

GREEN, L. C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKKIPER, P. L.; WISHNOK, J. S.;

TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. **Anal.biochem.**, v.126, p. 131-139, 1992.

HAH SS, STIVERS KM, DE VERE WHITE RW, HENDERSON PT: Kinetics of carboplatin-

DNA binding in genomic DNA e bladder cancer cells as determined by accelerator mass spectrometry. **Chem. Res Toxicol**, p. 19, 622-626, 2006.

INCA_Instituto Nacional do Câncer. www.inca.gov.br

JARUGA-KILEEN, E; RAYFORDW. TNF1 is involved in the induction of apoptosis by the cyclin dependent kinase inhibitor p27kip1 in the prostate cancer cell line PC-3. **FASEB J.** 19 (1):139-41, 2005.

KILLON, J.; FIDLER, I.J. Systemic targeting of liposome-encapsulated immunomodulators to macrophages for treatment of cancer metastasis. **Immunomethods**, v.4, p.273-279, 1994.

KLEIN, A. V.; Hambley, T. W. **Chem. Rev.** p. 109, 2009.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMENT, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol./Hematol.**, v.44, p. 143-161, 2002.

MARCINKIEWICKS, J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. **Immunopharmacol.**, v.37, p. 35-41, 1997.

MANTOVANI, A. ; DEJANA E. Cytokines as communication signal between leukocytes and endothelial-cells. **Immunology Today**, Oxon, v.10, n.11, p.370-375, 1989.

MOCELLIN S., NITTI D. TNF and cancer The two sides of the coin. **Front Biosci.** 13:2774-83, 2008.

MIKULAK J.; GIANOLINI M.; VERSMISSE P.; PANCINO G.; LUSO P.; VERANI A.

Biological and physical characterization of the X4 HIV-1 suppressive factor secreted by LPS-stimulated human macrophages, **Virology** 2009 v. 388, ed.2, p. 231-362, 2009.

NAVARRO, M.; PENA, N. P.; COLMENARES, I.; GONZÁLES, T.; ARSENAK, M.;

TAYLOR, P. Syntheses and characterization of the new paladium-clotrimazole and paladium-chloroquine complexes showing cytotoxicity for tumor cell lines *in vitro*. **J.Inorg. Biochem.** V.100, p.153-157, 2006.

PALERMO-NETO, J.; FONSECA E.S.M.; QUINTEIRO-FILHO W.M.; CORREIA C.S.C.;

SAKAI M. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor of growth in mice. **Physiology & Behavior**., 2008.

PALMER, R M., ASHON, D. S., MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L arginine. **Nature** p. 664-666, 1988.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R.G. **Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich: estudo experimental in vitro.** **Acta Cir. Bras.** V.19, p.210-220, jan-fev. 2004.

SAWADA, N.O., Nicolussi, A.C., Okino L., Cardozo, F.M., Zago, M.M.. Quality of life evaluation in cancer patients to submitted to chemotherapy. **Revista Escola Enfermagem USP**, 43(3), 581-587, 2009.

SIVEEN, K.S.; KUTTAN G. Role of macrophages in tumour progression. **Immunology letters** v.123 2 ed. 2, p. 97-102, 2009

STATHOPOULOS G.P., RIGATOS,;MALAMOS,N.A. Paclitaxel combined with cisplatin as second line treatment in patients with advanced non small cell lung cancers refractory to cisplatin. **Oncol.Rep.**,v.6, p.797-800, 1999.

STUEHR, D.J.; CHO, H.J; KWON,N.S.;WEISE,M.F.;NATHAN, C.F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD and FMN containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7773-7777, 1991.

TAHARA, H.; ZE, H.; STORKUS,W.J. Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin-12 can suppress tumor growth in vivo and induce antitumor immunity to a murine melanoma. **Cancer Res.**, v9, p 54: 182, 1994.

WANG. Y.; MARDESEN, P.A. Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation.**Curr OpinNephrol Hypert**, 4:12-22, 1995.

WONG, E.; GIANDOMENICO, C.M. Current status of platinum-based antitumor drugs. **Chem. Rev.**, v.99, p. 2451-2466, 1999.

YAN, L.; ANDERSON, G. DeWitte M. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. **Eur J Cancer** 42 (6):793-802, 2006.

ZHANG,C.X; LIPPARD, S.J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.7, p 481-489, 2003.

ZHANG, M. ;TRACEY,K. Tumor necrosis factor In Thomson AW, editor.**The cytokine handbook** San Diego, Ca: Academic Press p.517-548, 1998.