

MARIZE CAMPOS VALADARES

***AVALIAÇÃO DE ALGUNS ASPECTOS DA RESPOSTA
IMUNE TIPO CELULAR EM ANIMAIS PORTADORES
DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH E TRATADOS
COM TITANOCENOS***

CAMPINAS

2002

MARIZE CAMPOS VALADARES

***AVALIAÇÃO DE ALGUNS ASPECTOS DA RESPOSTA
IMUNE TIPO CELULAR EM ANIMAIS PORTADORES
DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH E TRATADOS
COM TITANOCENOS***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

CAMPINAS

2002

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

V23a Valadares, Marize Campos
Avaliação de alguns aspectos da resposta imune tipo celular em animais portadores do tumor ascítico de ehrlich e tratados com titanocenos / Marize Campos Valadares. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Célula Killer. 2. Tumor ascítico de Ehrlich. 3. Hematopoese.
3. Perinatologia. I. Mary Luci de Souza Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Profa. Dra. Mary Luci deSouza Queiroz

Membros:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Prof. Dr. Szulim Ber Zyngier

Prof. Dr. Ramon Kaneno

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Prof. Dr. Gilberto de Assunção Fernandes

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07/03/02

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, pelo estímulo e apoio ao meu desenvolvimento científico, assim como pela grande amizade;

Ao Prof. Dr. Stanley Ivair Klein, pelo incentivo, pela dedicação, amizade e pelo auxílio técnico, o qual foi imprescindível para a realização deste trabalho;

À minha família;

Aos amigos do laboratório CFU-C, pela amizade e cooperação no decorrer das minhas atividades de doutoramento, assim como pelo ambiente de trabalho profundamente agradável e estimulante que me proporcionaram;

Aos profissionais do Departamento de Comunicação Social, Hemocamp;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Hemocamp, pelo auxílio financeiro;

Ao Departamento de Farmacologia, que possibilitou a realização deste trabalho;

A muitas outras pessoas que me auxiliaram na realização desta tese e não estão aqui mencionadas;

	PÁG.
RESUMO	<i>viii</i>
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. A quimioterapia no câncer.....	12
1.2. Potencial terapêutico dos compostos titanocenos.....	14
1.3. Biologia de formação das células imunocompetentes.....	18
1.4. Tumor ascítico de Ehrlich.....	19
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Compostos testes.....	25
3.2. Animais.....	25
3.3. Tumor ascítico de Ehrlich.....	25
3.4. Tratamento.....	26
3.5. Padronização da metodologia de cultura clonal de precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C).....	27
3.6. Meio condicionado de células esplênicas.....	28
3.7. Obtenção do soro de animais tratados com BCDT para avaliação da presença de fator estimulador de colônias (CSF).....	29
3.8. Efeito direto do BCDT sobre progenitores hematopoiéticos.....	29
3.9. Celularidade da medula óssea.....	30
3.10. Atividade das células “natural killer”.....	30

3.11. Dosagem de citocinas.....	32
3.12. Avaliação de sobrevida.....	38
3.13. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Efeitos do composto BCDT sobre o número de progenitores hematopoiéticos para granulócito e macrófago da medula óssea e do baço (CFU-GM).....	40
4.2. Efeito do composto BCDT sobre a sobrevida após inoculação tumoral....	45
4.3. Efeito do composto BCDT sobre a produção de fatores estimuladores de colônias “CSFs”.....	47
4.4. Efeito do composto BCDT sobre a celularidade da medula óssea.....	48
4.5. Efeitos dos tratamentos com DDCT e BCDT sobre a atividade das células “natural killer”.....	48
4.6. Efeitos dos tratamentos com DDCT e BCDT sobre os níveis de produção das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-4.....	51
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	64
7. SUMMARY.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
9. APÊNDICE.....	78

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1	17
Figura 2	29
Figura 3	30
Figura 4	34
Figura 5	35
Figura 6	36
Figura 7	37
Figura 8	41
Figura 9	42
Figura 10	43
Figura 11	44
Figura 12	45
Figura 13	46
Figura 14	47
Figura 15	49
Figura 16	50
Figura 17	53
Figura 18	54
Figura 19	55
Figura 20	56



RESUMO

Neste trabalho, dando prosseguimento a estudos prévios realizados em nosso laboratório investigamos os efeitos do composto dicitlopentadienildiclorotitânio IV, DDCT, (15 mg/kg/dia/ dois dias) sobre a capacidade funcional das células “natural killer” (NK) e a produção das citocinas do perfil Th1 [interleucina (IL)-2 e interferon- γ (IFN- γ)] e do perfil Th2 (IL-4 e IL-10) de animais normais e portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Além disso, para efeito comparativo, acrescentamos ao nosso estudo o dicitlopentadienilditiocianatotitânio IV, BCDT, o qual é um derivado do DDCT com substituições dos radicais halogênicos do DDCT por pseudo-halogênicos. Com o composto BCDT, além dos parâmetros imunológicos acima mencionados, avaliamos, os efeitos do tratamento com uma, duas e três doses de BCDT (10, 15 ou 30 mg/kg/dia) sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos [Células formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM)], de animais normais e portadores do TAE, os quais foram previamente realizados com o DDCT. Nestes animais, avaliamos ainda a celularidade da medula óssea, a presença de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSFs) e a sobrevida. Nossos resultados demonstraram uma maior eficácia do composto DDCT em relação ao BCDT. No entanto, apesar das diferenças encontradas, verificamos que estes titanocenos compartilham a habilidade de regular positivamente os desequilíbrios hematopoiéticos e imunológicos envolvidos na evolução temporal do TAE. Como já esperado, o TAE produziu, concomitante à mielossupressão, um aumento no número de CFU-GM esplênico e uma diminuição da celularidade da medula óssea. O tratamento dos animais portadores do TAE com o BCDT produziu, de forma dose-dependente, paralelamente a um aumento na sobrevida, um aumento da mielopoiese, uma redução no número de colônias esplênicas e uma restauração no número total e diferencial da medula óssea. A maior eficácia foi encontrada com a dose de 10 mg/kg/dia/três dias, a qual, em animais normais, produziu melhor recuperação no número de CFU-GM na medula óssea e estimulou a produção de CSFs. Efeitos tóxicos foram observados nas maiores doses do composto associado à presença de hematopoiese esplênica e uma menor sobrevida dos animais. Quanto à produção das citocinas, o tratamento com os compostos impediu a polarização Th1-Th2 encontrada nos animais portadores do TAE. Neste sentido, o tratamento destes animais com o DDCT (15 mg/kg/dia/por dois dias) ou com o BCDT (10 mg/kg/dia/por 3dias), aumentou os níveis

de secreção de IL-2, regulou positivamente a secreção atípica de IFN- γ e reduziu os níveis de IL-10 aumentados durante a evolução temporal do TAE. O estudo da atividade funcional das células NK em animais portadores do TAE e tratados com os titanocenos demonstrou, especialmente com o DDCT, um aumento na capacidade citotóxica das células NK, a qual se encontrava reduzida. Estes resultados são encorajadores, uma vez que favorecem a utilização dos titanocenos em combinações terapêuticas com outros quimioterápicos visando reduzir a mielotoxicidade e suplementar a eficácia tumoricida destes agentes.



INTRODUÇÃO

1.1. A QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER

O Brasil apresenta hoje um quadro sanitário em que se combinam doenças ligadas à pobreza, típicas de países em desenvolvimento, e doenças crônico-degenerativas, características dos países mais afluentes. Essa situação reflete, inquestionavelmente, as condições do processo de desenvolvimento do País.

Analisando a incidência das principais doenças e taxas de mortalidade, o câncer é a segunda causa de morte por doença no Brasil. No último ano, os neoplasmas foram responsáveis por 10,86% dos 887.594 óbitos registrados.

Mundialmente, 10 milhões de novos casos de pacientes com câncer são diagnosticados por ano. Estima-se que, em duas décadas, este número atinja a casa de 20 milhões de novos casos de câncer diagnosticados (SIKORA, 2000). Estes dados não permitem dúvidas quanto a grande importância do planejamento estratégico da pesquisa e desenvolvimento de novas terapias mais seguras e eficazes no tratamento dos diversos tipos de câncer.

Em termos gerais, o câncer é definido como um comportamento celular anormal, incluindo uma proliferação celular irregular e descontrolada. Na maioria dos casos, é causado por mutação nos genes que controlam o crescimento, a divisão e a apoptose celular (morte celular programada) (BAKHTIAR & OCHIARI, 1999). Progressos científicos no campo da biotecnologia e da biologia molecular vêm proporcionando significativos avanços no entendimento dos processos neoplásicos e, por consequência, avanços na prevenção e tratamento do câncer. Espera-se que a total complementação do Projeto do Genoma Humano disponibilize terapias genéticas sofisticadas para o tratamento do câncer. Entretanto, as limitações encontradas hoje na prática de terapias gênicas, como exemplo, os efeitos imunotóxicos dos vetores adenovirais, indicam que esta modalidade terapêutica ainda possui um longo caminho a ser percorrido (SIKORA, 2000; MILLER, 2000).

Evoluções tecnológicas no campo da radioterapia e da quimioterapia têm aumentado sensivelmente a sobrevivência dos pacientes e, em alguns casos, o número de curas.

Porém, ainda assim, os cientistas, pesquisadores e médicos se deparam com problemas como a resistência às drogas e a falta de toxicidade seletiva dos quimioterápicos, o que dificulta o tratamento de indivíduos com câncer.

Drogas antitumorais são frequentemente tóxicas para células que apresentam alto metabolismo, como células do epitélio intestinal, folículos pilosos e células da medula óssea, em função da inespecificidade das drogas sobre tecidos neoplásicos e da ausência de diferenças bioquímicas fundamentais entre as células tumorais e as células do hospedeiro (GUEST & UETRECHT, 2001). Toxicidade para a medula óssea constitui um grave problema causando severa morbidade e/ou mortalidade. Várias alternativas para tratamentos e/ou procedimentos terapêuticos vêm sendo empregadas com intuito de evitar ou minimizar esta ação tóxica dos quimioterápicos. Limitações hematológicas desta modalidade terapêutica têm sido vencidas por meio de técnicas de coleta e criopreservação de células progenitoras hematopoéticas da medula óssea. Estas células são capazes de reconstituir a hematopoiese após tratamentos quimioterápicos mieloablativos. (POLONI *et al.*, 1999; GUEST & UETRECHT, 2001). Dentre as abordagens terapêuticas estão a co-administração de compostos hematoprotetores endógenos como a glutatona, que protege rins e fígado com questionável benefício à hematopoiese, e de fatores de crescimento hematopoiéticos com a finalidade de reduzir a incidência e a duração de neutropenia. Dentre as substâncias exógenas utilizadas, está a amifostina, inicialmente desenvolvida como protetor contra radiação e que vem sendo empregada com o objetivo de prevenir os efeitos tóxicos associados à terapia de drogas mielossupressoras como a cisplatina, protegendo as células-tronco hematopoéticas pluripotenciais pela ação estimuladora direta sobre estas células, sem interferir na ação antineoplásica do quimioterápico (GUEST & UETRECHT, 2001).

Na atualidade, um alvo atraente para a pesquisa quimioterápica é o desenvolvimento de novas substâncias dotadas de alta seletividade aos tecidos neoplásicos em associação a uma maior atividade e espectro de ação. Uma destas estratégias está no desenvolvimento dirigido de novos fármacos por intermédio da manipulação química de compostos com ação antitumoral comprovada com o objetivo de intensificar a atividade e o potencial de cura destas drogas. Uma outra abordagem é a síntese de substâncias de baixa

toxicidade e com potencial farmacológico para modificar a resposta das células imunocompetentes. A atividade antitumoral destas drogas é determinada pela sua capacidade de induzir ou modular a resposta imune contra as células malignas. Neste sentido, resultados encorajadores têm sido obtidos pelo nosso grupo com a classe de compostos organometálicos titanocenos, mais precisamente o diclorotitanoceno, o qual apresentou potente atividade antitumoral em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), produzindo, ao mesmo tempo, reversão da atividade mielossupressora induzida pelo tumor e aumento na sobrevivência dos animais tratados (VALADARES *et al.*, 1998). Estes resultados positivos tornaram este composto, bem como os da classe dos titanocenos, substâncias bastante promissoras para maiores investigações.

1.2. POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS COMPOSTOS TITANOCENOS

O uso terapêutico de compostos metálicos iniciou-se por volta de 2000 a 2500 a.C., na China, onde o ouro já era utilizado medicinalmente. Paracelsus (1493-1541), que alguns consideram o ‘Pai da metaloterapia moderna’ (WILLIAMS, 1974), era fascinado por alquimia e usava misturas alquímicas de vários metais pesados para tratar pacientes com diferentes doenças, inclusive o câncer.

A quimioterapia moderna do câncer iniciou-se após a Primeira Guerra Mundial, em decorrência de observações sobre a exposição de indivíduos ao gás mostarda, o qual causava leucemia e aplasia medular (KRUMBHAAR & KRUMBHAAR, 1919; KOPF-MAIER, 1994). A citotoxicidade do enxofre, contido no gás mostarda, sobre os tecidos linfóides, foi confirmada em investigações experimentais durante as décadas de 20 e 30. Além disso, estudos clínicos, iniciados em 1942, mostraram atividade antineoplásica do grupo funcional sulfeto para leucemias humanas e carcinomas.

O descobrimento acidental das propriedades antitumorais de complexos de platina, relatados por ROSEMBERG *et al.* (1969), levou à comprovação da alta efetividade destes complexos, disparando o início da ‘era dos complexos inorgânicos com ação citostática’ (KOPF-MAIER, 1994). Dentre os complexos de platina, a cisplatina tornou-se

nos últimos trinta anos uma das drogas antitumorais mais amplamente utilizadas no tratamento do câncer. Sua importância foi atribuída à eficácia terapêutica nos tratamentos do câncer ovariano, uterino, de bexiga, pescoço e cabeça (CALVERT, NEWELL, TILBY, 1995; CHRISTODOULOU *et al.*, 1998).

Entretanto, os notáveis efeitos antitumorais da cisplatina coincidiram com marcante neurotoxicidade, nefrotoxicidade e severa êmese, porém, o maior problema no seu uso clínico está relacionado com o aparecimento de resistência tumoral ao medicamento. A eficácia desta droga contra diversos tumores humanos, bem como suas limitações, despertou o interesse no desenvolvimento de novos complexos organometálicos com menor toxicidade e maior atividade e espectro de ação.

Apesar de grandes esforços, poucos foram os progressos obtidos no desenvolvimento de complexos de platina com os requisitos mencionados acima. Até o presente momento, o composto de segunda geração mais efetivo é a carboplatina. A vantagem na utilização da carboplatina em relação à cisplatina é a presença de menor nefrotoxicidade (CHRISTODOULOU *et al.*, 1998). Importância crescente está sendo atribuída à atividade antitumoral de outros complexos metálicos como o vanádio, ródio e em particular o titânio (CLEARE *et al.*, 1980; KOPF-MAIER 1980; KOPF-MAIER *et al.*, 1981; KOPF-MAIER & KOPF, 1987; KOPF-MAIER, 1999; MROSS *et al.*, 2000; HARDING & MOKDSI, 2000; HARDING & MOKDSI, 2001). Estes complexos metálicos (metallocenos) consistem de um átomo central circundado por ligantes puramente orgânicos ou inorgânicos (KOPF-MAIER & KOPF, 1987). Outra característica geral destes complexos é sua neutralidade elétrica. Acredita-se que esta característica seja um importante pré-requisito para a atividade antitumoral, pois permite a passagem das moléculas do composto através das camadas hidrofóbicas das membranas celulares (ROSENBERG, 1973; LEH, & WOLF, 1976). Quanto ao titânio, foram encontrados diferentes compostos (titanocenos) com ação citostática, entre eles, o dicitlopentadienilditiocianatotitânio IV (BCDT) e o dicitlopentadienildiclorotitânio IV (diclorotitanoceno) (KOPF-MAIER *et al.*, 1981; KOPF-MAIER, 1994; KOPF-MAIER, 1999; MROSS *et al.*, 2000). As estruturas químicas dos dois compostos estão apresentadas na Fig. 1.

Estes compostos têm demonstrado expressiva atividade contra tumores de Ehrlich; carcinoma pulmonar de Lewis; sarcoma 180; melanoma B16; adenocarcinoma de cólon; linhagens de células leucêmicas L1210 e P388 (KOPF-MAIER *et al.*, 1986; KOPF-MAIER *et al.*, 1989; KOPF-MAIER, 1999).

Estudos comparativos realizados em ratos e camundongos sobre os efeitos tóxicos do diclorotitanoceno mostraram que este complexo, embora não produza nefrotoxicidade, a qual é evidente quando se utilizam compostos de platina, cisplatina ou carboplatina é caracterizado por apresentar hepatotoxicidade dose-limitante (KOPF-MAIER & GERLACH, 1986). Entretanto, em contraste com a característica geral da maioria destes agentes antitumorais, o diclorotitanoceno não apresenta mielossupressão, produzindo apenas efeitos hematológicos considerados leves, como uma ligeira diminuição no número de plaquetas (KOPF-MAIER & GERLACH, 1986).

Atualmente, o diclorotitanoceno se encontra em fase de triagens clínicas com resultados promissores em pacientes com câncer em estágio avançado (CHRISTODOULOU *et al.*, 1998; MROSS *et al.*, 2000; HARDING & MOKDSI, 2000; HARDING & MOKDSI, 2001). Nestes estudos, ficou confirmada a ausência de mielossupressão do composto. No entanto, os autores detectaram a presença de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade dose-limitante após o tratamento. A farmacocinética do diclorotitanoceno parece bastante complexa e foi descrita por CHRISTODOULOU *et al.* (1998), pelo modelo dos três compartimentos para o titânio total.

Apesar do mecanismo de ação e propriedades *in vitro* do diclorotitanoceno não estarem totalmente elucidados, já se sabe que o principal alvo da ação desta droga é o DNA (KOPF-MAIER, 1980; MROSS *et al.*, 2000; HARDING & MOKDSI, 2001). Estudos da literatura demonstraram que o titânio interage com a transferrina sérica, a qual, após reconhecimento do receptor, entra na célula tumoral ligando-se ao DNA (GUO *et al.*, 2000). Outros estudos do mecanismo de ação deste composto realizados por CHRISTODOULOU *et al.* (1998), demonstraram que o diclorotitanoceno bloqueia o início da fase S e a fase G₂ do ciclo celular e induz apoptose celular na linhagem tumoral ovariana A2780.

A atividade inibidora *in vitro* do crescimento celular, induzida pelo titanoceno diclorotitanoceno, é moderada, quando comparada àquela produzida por outros compostos organometálicos (KOPF-MAIER & HESSE, 1984; CHRISTODOULOU *et al.* 1998). Devido a este fato, tem-se considerado a importância de outros fatores adicionais, tais como ativação metabólica e suporte imunológico na indução de atividade citotóxica *in vivo* destes compostos.

Investigações sobre a atividade citotóxica de diferentes metallocenos considerando a relação estrutura-atividade realizadas por KOPF-MAIER *et al.*, (1981) demonstraram que a atividade antitumoral dos metallocenos é completamente dependente do tipo de metal central e que a substituição dos radicais halogênicos, na fórmula molecular geral, não afeta a atividade antitumoral. Por outro lado, os mesmos autores observaram que modificações realizadas nos anéis ciclopentadienos (Cp) diminuem a atividade antitumoral destes compostos. Em contrapartida, ensaios *in vitro* realizados por BOYLES *et al.*, (2001), demonstraram que a introdução de grupamentos carboxilas na estrutura molecular do diclorotitanoceno, mais precisamente nos anéis ciclopentadienil, aumenta a atividade antitumoral destes compostos. Estes autores sugerem ainda que modificações nos radicais halogênicos podem ser possivelmente modificadores do potencial antitumoral desta classe de compostos.

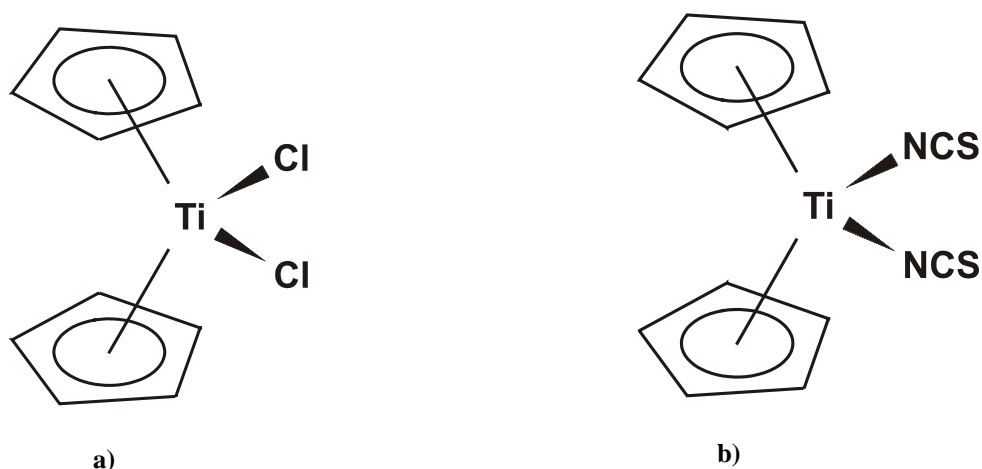


Figura 1: Estrutura química do DDCT, dicitoclopentadienildiclorotitânio IV (a) e do BCDT, dicitoclopentadienilditiocianatotitânio IV (b).

1.3. BIOLOGIA DE FORMAÇÃO DAS CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES

Todas as células de defesa especializadas possuem dois aspectos comuns: passam parte de suas vidas na corrente sanguínea e originam-se de uma única célula indiferenciada comum pluripotencial denominada célula-tronco hematopoiética (“HSC-Hematopoietic Stem Cell”) presente na medula óssea (LORD & TESTA, 1988; GUEST & UETRECHT, 2001). Tais células possuem a capacidade única de auto-renovação e diferenciação nos diversos tipos sanguíneos, sendo classicamente identificadas pela presença ou ausência de antígenos de superfície celular. Por exemplo, uma designação para células-tronco é Thy-1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺, ou seja, uma baixa expressão de antígenos de linfócito tímico (Thy)-1, ausência de marcadores de antígenos Lin e a presença de antígenos de células pluripotenciais (Sca)-1 (SPANGRUDE, HEIMFELD, WEISSMAN, 1988). Outra caracterização comumente empregada inclui as proteínas de superfície celular denominadas “CD” CD34⁺, CD33⁻, CD38⁻ e c-kit (OKADA *et al.*, 1992; OSAWA *et al.*, 1996).

Dentro da medula óssea as células do estroma que são constituídas de células endoteliais, células acumuladoras de lipídeos, macrófagos e células fibroblásticas, regulam a maturação e diferenciação dos precursores hematopoiéticos. Esta regulação é mediada tanto por contato direto, envolvendo moléculas de adesão entre as células do estroma/células hematopoiéticas, quanto indiretamente via fatores de crescimento (GORDON *et al.*, 1987; GUPTA *et al.*, 2000).

A adesão de células pluripotenciais com o estroma ocorre por meio de várias interações entre receptores-moléculas, como as integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e CD44, presentes nas células hematopoiéticas e moléculas de adesão celular presente nas células do estroma (WILLIAMS *et al.*, 1991).

Adicionalmente aos mecanismos de adesão, fatores de crescimento (citocinas) estimuladores e inibidores regulam a maturação das células pluripotenciais e progenitoras comprometidas com uma linhagem celular específica. A ação dos estímulos, positivos: fator estimulador de células tronco (SCF), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas-(IL)-1, 3 e 6, e o fator estimulador de colônias de

granulócitos/macrófagos(GM-CSF), juntamente com estímulos negativos: SCF, IL-1, TNF- α e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), é dependente tanto da localização da citocina quanto do estágio de maturação das células hematopoiéticas (AXELRAD, 1990; FLEMING *et al.*, 1993; OWEN-LYNCH *et al.*, 1998; GUEST & UETRECHT, 2001).

A progenia das células-tronco hematopoiéticas compromete-se com uma das três linhagens: eritróide, mielóide e linfóide, originando os eritrócitos, linfócitos e células mielóides, respectivamente. As células mais primitivas em cada linhagem, denominadas progenitoras de linhagem específica, não podem ser identificadas morfológicamente, entretanto, sua existência e parte de suas propriedades são deduzidas pela capacidade de produzir tipos particulares de células maduras em sistema de ensaio biológico específico. As células maduras mielóides compreendem os neutrófilos, monócitos, mastócitos, eosinófilos, basófilos e megacariócitos. As células linfóides são constituídas de linfócitos B, linfócitos T e possivelmente as células “natural killer” (NK). Em conjunto, estas duas linhagens mielóides e linfóides, de suma importância, abrangem todas as células de defesa do hospedeiro responsáveis para o estabelecimento de resposta imune efetiva (STITES, ABBA, TRISTRAM, 2000).

A capacidade proliferativa e de diferenciação das células hematopoiéticas é tipicamente avaliada *in vitro* por ensaios padrão de cultura denominados ensaios formadores de colônias e os progenitores freqüentemente descritos como unidades formadoras de colônias (CFU). Esta técnica para cultura de células progenitoras da medula óssea em meio semi-sólido permitiu a compreensão da biologia de formação da célula sanguínea, sendo hoje amplamente empregada no auxílio diagnóstico e como ferramenta de estudo dos efeitos de agentes químicos exercidos sobre a formação das células imuno/hematopoiéticas.

1.4. TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

Os modelos tumorais experimentais são instrumentos laboratoriais que, sob condições adequadas, facilitam a compreensão da imunologia tumoral e possibilitam a avaliação de atividade e mecanismo antitumoral de diferentes compostos. O tumor ascítico

de Ehrlich tem sido amplamente utilizado por oferecer inúmeras vantagens como modelo tumoral experimental. Além de apresentar inespecificidade diante das diferentes linhagens murinas, é facilmente transplantável (com porcentagem de ‘pega’ de 100%) e possibilita a inoculação por diferentes vias permitindo o crescimento de tumores sólidos e em suspensão. Uma outra característica que favorece o uso deste modelo tumoral na avaliação do potencial terapêutico de novos quimioterápicos consiste no fato da imunossupressão produzida por este modelo tumoral estar associada ao sistema hematopoiético (PESSINA *et al.*, 1982 a e b; VALADARES *et al.*, 1998). O tumor de Ehrlich, um tumor não-metastático, produz alterações severas no sistema hematológico do hospedeiro, sendo freqüentemente associado com imunossupressão, anemia, trombocitopenia e leucocitose granulócito-dependente (KEEB & LALA, 1978; WHITNEY, KELLY, LEVY, 1978; PESSINA *et al.*, 1982 a; RUIZ DE MORALES, VÉLEZ, SUBIZA, 1999).

A proteção durante a progressão tumoral é oferecida principalmente pela resposta imunológica tipo celular, pelo envolvimento de macrófagos, linfócitos Th e células NK (PARHAR & LALA, 1988; SEGURA, BARBERO, MARQUES, 1997). O estabelecimento do tumor diante do sistema imune é associado à supressão destas células mediante a produção de citocinas imunossupressoras, regulação negativa de fatores de crescimento e de indução de macrófagos e células T com propriedades supressoras (PARHAR & LALA, 1988; MANTOVANI *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1995; ELGERT, ALLEVA, MULLINS, 1998).

Estudos em nosso laboratório e outros na literatura têm demonstrado a influência do TAE sobre o crescimento e diferenciação de progenitores hematopoiéticos. Neste aspecto, uma severa mielossupressão em paralelo com esplenomegalia e hematopoiese extramedular têm sido observada. Os mecanismos sugeridos envolvem fatores solúveis produzidos pela interação tumor-hospedeiro, a presença de prostaglandinas E₂ e migração celular (JUSTO, DURÁN, QUEIROZ, 2000; JUSTO, SILVA, QUEIROZ, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2001).

Diante do exposto, neste trabalho investigamos os efeitos do composto diciclopentadienilditiocianato titânio IV, BCDT, um derivado do diclorotitanoceno, o qual possui os radicais halogênicos substituídos por pseudo-halogênicos, sobre o crescimento e

diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço para a série granulócito e macrófago (CFU-GM), a celularidade da medula óssea, e a sobrevida no modelo experimental do tumor ascítico de Ehrlich. Ainda utilizando este modelo tumoral, avaliamos os efeitos do DDCT e do BCDT sobre a atividade citotóxica das células “natural killer” e sobre a produção das citocinas do perfil Th1 [(IL-2, interferon- γ (IFN- γ)] e do perfil Th2 (IL-10 e IL-4).



OBJETIVOS

Diante de evidências de ação imunomoduladora de compostos titanocenos o presente trabalho possui os seguintes objetivos:

- Investigar os efeitos do composto diciticlopentadienilditiocianatotitânio IV, BCDT, sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço para a série granulócito e macrófago (CFU-GM) e sobre a celularidade da medula óssea em animais normais e portadores do tumor ascítico de Ehrlich;
- Verificar a presença de fatores estimuladores de colônias (CSFs) hematopoiéticos no soro de animais tratados com o BCDT;
- Avaliar o efeito do BCDT sobre a sobrevivência de camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich;
- Investigar os efeitos do DDCT e do BCDT sobre a atividade das células NK em animais normais e portadores do tumor;
- Avaliar os níveis de produção das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-4 em animais normais e portadores do tumor tratados com o DDCT e o BCDT.



***MATERIAS E
MÉTODOS***

3.1. COMPOSTOS TESTES

Os trabalhos de síntese e análise dos compostos dicitropentadienildiclorotitânio IV e dicitropentadienilditiocianatotitânio IV foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Stanley Ivair Klein, do Instituto de Química de Araraquara, SP, segundo protocolo estabelecido na literatura (PEREIRA, KLEIN, DIAS, 2000; BIRMINGHAM & WILKINSON, 1954).

As substâncias foram administradas intraperitonealmente. O veículo de administração utilizado foi dimetilsulfóxido (DMSO)/solução fisiológica estéril 1:9 (V/V). As drogas foram preparadas diariamente antes da administração.

3.2. ANIMAIS

Para realização dos experimentos *in vivo* utilizamos camundongos BALB/c, com idade de 8 a 10 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas em sala climatizada com ciclos claro-escuro de 12 h. Ração comercial e água foram fornecidos aos animais *ad libitum*. O protocolo experimental foi submetido à comissão de ética em pesquisa animal desta universidade.

3.3. TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

A linhagem tumoral de Ehrlich foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Szulim Ber Zyngier, do Departamento de Farmacologia do ICB-USP, sendo originalmente obtida de uma linhagem do Hospital do Câncer, São Paulo. Ela é mantida nas dependências do laboratório através de passagens sucessivas intraperitoneais entre animais.

As células tumorais de Ehrlich crescem como células ascíticas na cavidade peritoneal do camundongo. Para o desenvolvimento do tumor de Ehrlich, camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 0,1 ml de uma suspensão de células tumorais contendo 6×10^6 células/ml, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos doadores.

Após a retirada do líquido ascítico do peritônio de camundongos doadores, o número e a viabilidade das células tumorais foram determinados pela exclusão do corante azul-tripan, em câmara de Neubauer.

3.4. TRATAMENTO

O tratamento com o diclorotânio consistiu de duas administrações de 15 mg/kg/dia em dois dias consecutivos. A escolha da dose do composto e do protocolo de tratamento se deve a trabalhos realizados anteriormente (VALADARES *et al.*, 1998). Os animais foram sacrificados no primeiro, quinto e décimo dias após o término dos tratamentos.

Já o tratamento com o composto BCDT foi realizado com três diferentes concentrações da droga, a saber: 10, 15 e 30 mg/kg/dia. Para cada concentração realizamos três diferentes administrações: tratamento com uma única administração, com duas ou com três administrações da droga em dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24h após o término do tratamento.

Para realização das metodologias os animais foram distribuídos em quatro grupos discriminados abaixo:

- Grupo I: animais-controle receberam somente o veículo da droga intraperitonealmente, ip., (1:9 de DMSO/salina);
- Grupo II: animais somente portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE, 6×10^6 células /ml inoculadas intraperitonealmente);
- Grupo III: animais que somente receberam a droga, ip, nos diferentes esquemas de tratamentos;
- Grupo IV: animais inoculados com o TAE e 24 h após tratados com os diferentes esquemas de tratamento.

3.5. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOIÉTICOS DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO DE CAMUNDONGOS (CFU-C)

Após sacrificar-se o animal por meio de deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool iodado. Após a exposição do fêmur, removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior. A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI-1640 (Sigma Chemical, St. Louis. MO, USA). Os baços foram removidos assepticamente, lavados com salina estéril e preparados como suspensões celulares em meio RPMI com o auxílio de um macerador. As suspensões foram mantidas no gelo.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em eosina 10%.

Preparou-se o meio mais ágar (Bacto-ágar, Difco™), o qual consiste de:

- 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Difco™) 2x concentrado;
- 20% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab®);
- 50% de ágar (0,6%, Bacto-ágar Difco™);

A seguir, adicionou-se o volume apropriado de células da medula (1×10^5 células/ml) ou do baço (2×10^5 células/ml) quando o meio mais ágar estava a 37°C. Ressuspenderam-se as células e distribuíram-se volumes de 2,0 ml em cada placa de Petri, as quais já continham o estímulo apropriado (100 µL de SCM). Distribuiu-se o conteúdo por toda a superfície da placa de Petri e deixou-se geleificar. Incubou-se por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ no ar e a seguir contou-se o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40 x. Para o estudo morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/hematoxilina (METCALF, 1984).

3.6. MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

Baços de camundongos BALB/c foram removidos sob condições assépticas e delicadamente passados em peneira de aço inoxidável estéril. Em seguida preparou-se uma suspensão contendo 2×10^6 células/ml de meio RPMI (Sigma™) contendo 10% de soro humano inativado (30 minutos a 56°C). A este meio adicionou-se 5×10^{-5} mol/L de 2-mercaptanol (concentração final) e 0,05ml de Pokeweed mitogen (Gibco™, Grand Island, NY. USA)/ ml de meio. Incubou-se por sete dias a 37°C em estufa de CO_2 . Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em filtro membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore™).

A atividade funcional do CSF foi determinada mediante os estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas de animais normais em meio semi-sólido. A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 fornece resultados que estão dentro dos níveis de resposta supermáxima. Os resultados, em duplicata, da titulação realizada em cultura de sete dias estão apresentados na tab. 1. O estudo morfológico das colônias após a coloração indicou o predomínio de colônias de granulócito e macrófago.

De acordo com VAN DEN ENGH & BOL (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias é considerada como 1 unidade de CSF. A curva obtida mostrando a capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades por ml deste lote de SCM está apresentada na Fig. 2.

Tabela 1: Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c.

DILUIÇÃO SCM	CFU-C x 10^2 #
1:1	109,2 ± 4,2
1:2	102 ± 3,5
1:4	105,6 ± 5,1
1:8	75,6 ± 4,2
1:16	57,6 ± 4,0
1:32	34,8 ± 3,0
1:64	7,2 ± 1,2
1:168	0

#Número total de colônias por 1×10^5

Resultados obtidos em duplicata por diluição

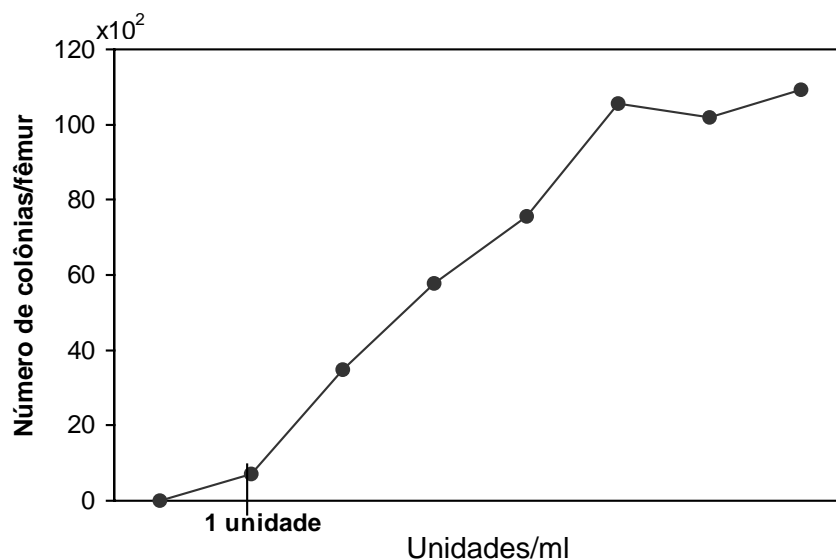


Figura 2: Curva de capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades por ml

3.7. OBTENÇÃO DO SORO DE ANIMAIS TRATADOS COM BCDT PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS (CSF)

O sangue dos animais tratados com três administrações de 10 mg/kg/dia do composto BCDT foi coletado por punção cardíaca e centrifugado para obtenção do soro. A atividade estimuladora de colônias neste soro foi avaliada pela capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais normais.

3.8. EFEITO DIRETO DO BCDT SOBRE PROGENITORES HEMATOPOIÉTICOS

O composto BCDT foi diluído em DMSO/salina 1:9 (v/v). Diferentes concentrações, 0,3; 0,2; 0,1 e 0,05mg de BCDT/placa de Petri, num volume final de 100 µl/placa, foram adicionadas em culturas de células progenitoras de medula óssea de animais normais. Culturas-controle receberam somente o solvente da droga.

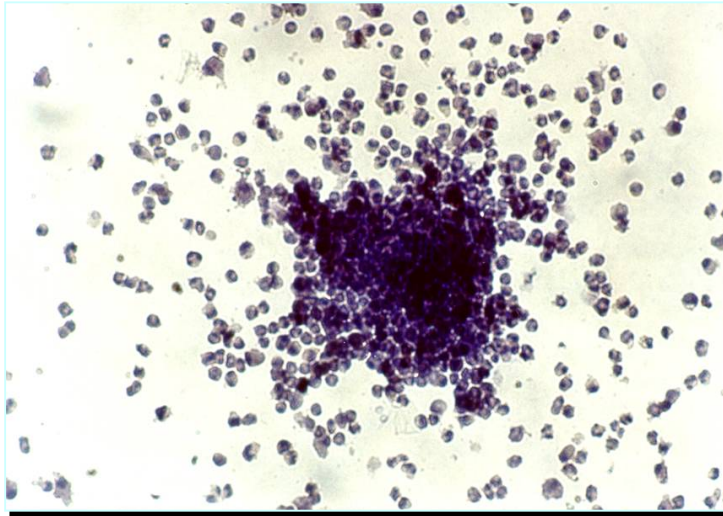


Figura 3: Fotomicrografia de uma colônia de células progenitora hematopoiética da medula óssea (CFU-C) de animal normal. A colônia foi fixada com glutaraldeído (2,5%) e corada com Luxol Fast Blue/hematoxilina. Aumento de 200X.

3.9. CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA

As células da medula óssea foram assepticamente coletadas de um fêmur e preparadas como suspensões celulares em 2 ml de meio RPMI. O número de células progenitoras mielóides por fêmur foi calculado a partir da frequência destas células por célula nucleada e da celularidade. A contagem diferencial foi realizada em preparações em citocentrífuga (800 rpm durante 5 minutos) das suspensões celulares, coradas com May-Grunwald-Giemsa. Foram contadas 100 células em objetiva de 40X.

3.10. ATIVIDADE DE CÉLULAS “NATURAL KILLER”

Para este método foram utilizadas células tumorais YAC-1. Esta linhagem utilizada *in vitro* é uma sublinhagem do linfoma de Células T murino YAC (induzido pelo vírus Moloney), adaptado para crescer em cultura líquida (CIKES, FRIBERG, KLEIN,

1973). Células YAC-1 incorporam o isótopo crômio-51 (^{51}Cr), que se liga a proteínas. As células NK (células efetoras) ao serem colocadas em contato com as células-alvo (YAC-1) promovem a lise e a liberação do crômio para o sobrenadante da cultura. A atividade citotóxica das células NK é proporcional à quantidade de crômio liberada no meio.

Preparação das células efetoras

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o baço foi removido e macerado cuidadosamente.

As células mononucleares foram separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (Ficoll- Sigma; Hypaque-Pharmacia, Piscataway, USA) e lavadas em RPMI contendo 10% de soro bovino fetal. A seguir, as células foram ressuspensas em 10 ml de meio RPMI e incubadas em placas de Petri por 90 minutos a 37°C em estufa de CO_2 5%. As células-não aderentes foram lavadas com RPMI e ressuspensas a uma concentração de 5×10^6 células/ml.

Distribuíram-se 0,1ml da suspensão em placas de microcultura fundo em forma de U (Corning, New York, USA), fazendo-se diluições seriadas em triplicatas e com reserva de três orifícios para a lise máxima (0,1ml de detergente diluído 1:2) e outros três para a lise espontânea (0,1ml de SBF).

As células-alvo previamente marcadas foram distribuídas (0,1ml) nos orifícios de reação e controles. As placas foram centrifugadas por 5 minutos, a 800 rpm e em seguida incubadas a 37°C , por 4 h em estufa de CO_2 5%. Após este período de incubação, centrifugou-se por 10 minutos a 1.500 rpm e transferiu-se 0,1 ml do sobrenadante para tubos plásticos. A leitura foi feita em contador gama (Gamma Counter 5500B-BeckmannTM, Irvine, USA).

Cálculo da porcentagem de lise específica:

% lise específica = $\frac{\text{lise teste} - \text{lise espontânea}}{\text{lise máx.} - \text{lise espontânea}}$

lise máx. - lise espontânea

Preparação de células-alvo

A linhagem tumoral YAC-1 foi mantida em meio RPMI-1640 enriquecido com 20% de SBF, penicilina (100µg/ml), hepes 25 mmol/L, 2-mercaptoetanol (1:100) e L-glutamina (216mg/ml), a 37⁰C e 5% de CO₂.

Para o ensaio, 5 x 10⁶ células YAC-1 foram lavadas duas vezes com meio RPMI. Ressuspendeu-se o precipitado com 0,2 ml de SBF. A seguir, adicionou-se 100µCi de cromato de sódio marcado (IPEN) e incubou-se em banho-maria a 37⁰C sob agitação periódica por 90 minutos. Lavou-se duas vezes e ressuspendeu-se em meio RPMI suplementado a uma concentração final de 1 x 10⁵ células/ml.

3.11. DOSAGEM DE CITOCINAS

As concentrações de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN-γ foram dosadas no sobrenadante de culturas de células esplênicas pelo método imunoenzimático ELISA (ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para cada citocina (Pharmingen™, San Diego, CA, USA).

Baços de camundongos foram coletados assepticamente e homogeneizados utilizando-se meio RPMI. Células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise ao botão celular previamente concentrado. Após lavagem em meio RPMI, as células foram ajustadas a uma concentração de 1 x 10⁶ células/ml em meio RPMI suplementado com 5% de soro bovino fetal.

Nos poços da placa de cultura (24 wells, maxisorb, NUNC, Roskilde, DM) contendo 800 µL de meio RPMI enriquecido com 5% de SBF, foram adicionados 200 µl da suspensão celular e 50 µl de solução de Con A (2,5 µg/ml). Concomitantemente também foram incubadas células de cada amostra sem Con A. Desta forma foram preenchidos seis orifícios da placa de cultura para cada animal, sendo que o mitógeno é adicionado apenas a cinco deles, cada qual correspondendo a uma citocina a ser dosada.

As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37⁰C e 5% de CO₂. Após 24 h, o sobrenadante foi coletado do orifício correspondente para dosagem de IL-2. Após 40 h, foram coletados os sobrenadantes correspondentes às IL-4 e IL-10. O sobrenadante para dosagem de IFN- γ foi coletado após 60 h de incubação.

As citocinas foram dosadas pelo do método imunoenzimático, utilizando-se os anticorpos monoclonais correspondentes.

Nos poços de uma placa de microcultura para ELISA (“maxi sorp” - 96 wells, NUNCTM) foram adicionados 100 μ l do anticorpo monoclonal de captura anti-citocina (0,5-4 μ g/ml). A placa protegida adequadamente foi incubada “overnight” a 4⁰C. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com solução PBS/Tween (0,5 ml de Tween-20 em 1 L de PBS). A solução permaneceu em contato com a placa por um período de pelo menos 1 minuto antes do descarte. Em seguida, 200 μ l de PBS contendo 10% de SBF, foram adicionados por orifício e a placa foi mantida à temperatura ambiente por 2h. Lavou-se novamente duas vezes com solução PBS/Tween.

As amostras (sobrenadante proveniente das culturas) e os padrões (anticorpo monoclonal recombinante diluído em PBS enriquecido com 10% de SBF) foram adicionados a um volume de 100 μ l por poço e a placa foi incubada novamente “overnight”, à temperatura ambiente. Seguiram-se quatro lavagens utilizando-se solução PBS/Tween.

O anticorpo monoclonal de detecção anti-citocina, marcado com biotina, foi diluído em PBS enriquecido com 10% de SBF (0,5-4 μ g/ml) e 100 μ l foram adicionados por orifício. Incubou-se à temperatura ambiente por 45 minutos e em seguida lavou-se seis vezes com solução PBS/Tween.

Adicionou-se 100 μ l de uma solução de avidina-peroxidase diluída em PBS contendo 10% de SBF (1:400 de uma solução 1 mg/ml, Sigma). Incubou-se por mais 30 minutos à temperatura ambiente e lavou-se oito vezes com solução PBS/Tween.

Nesta etapa, o substrato foi preparado adicionando-se 10 µl de H₂O₂ 30% e 1 comprimido de OPD (diidrocloreto de o-fenilenodiamina, Sigma) a 10 ml de tampão citrato, pH 5,6. Adicionou-se 100 µl do substrato por orifício até o desenvolvimento da cor por um período de 10 - 80 minutos, à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (λ = 492 nm) (Labsystems, Finland). A concentração da citocina nas amostras foi expressa em pg/ml calculada por meio de uma curva-padrão realizada com concentrações conhecidas da citocina recombinante.

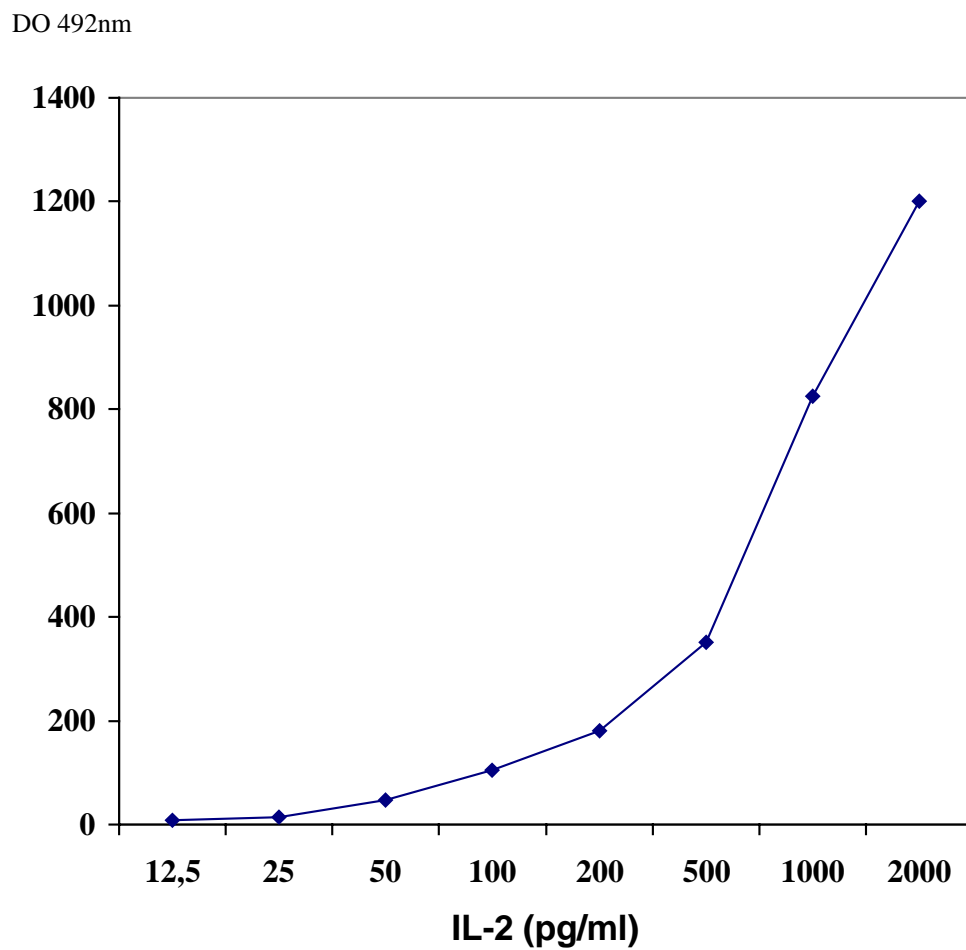


Figura 4: Curva-padrão da interleucina-2 obtida pelo do uso de IL-2 recombinante de camundongos

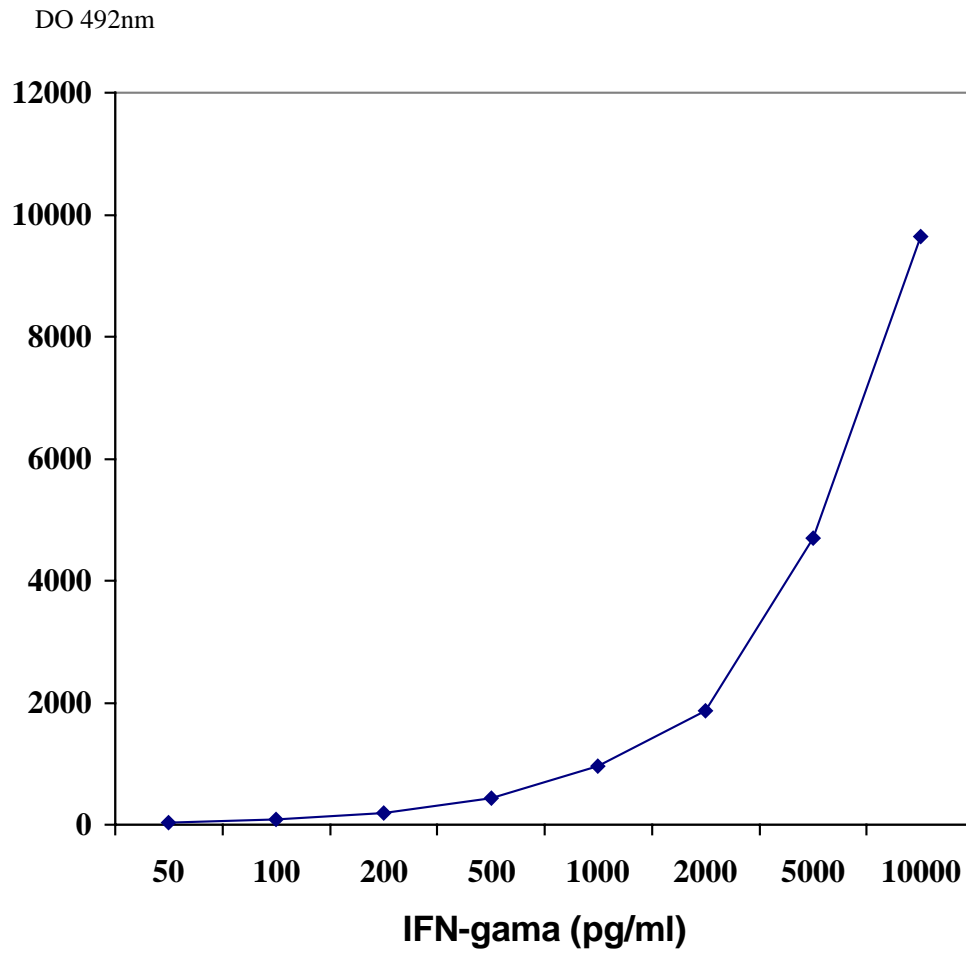


Figura 5: Curva-padrão do interferon-gama obtida pelo uso de IFN-gama recombinante de camundongos.

DO 496 nm

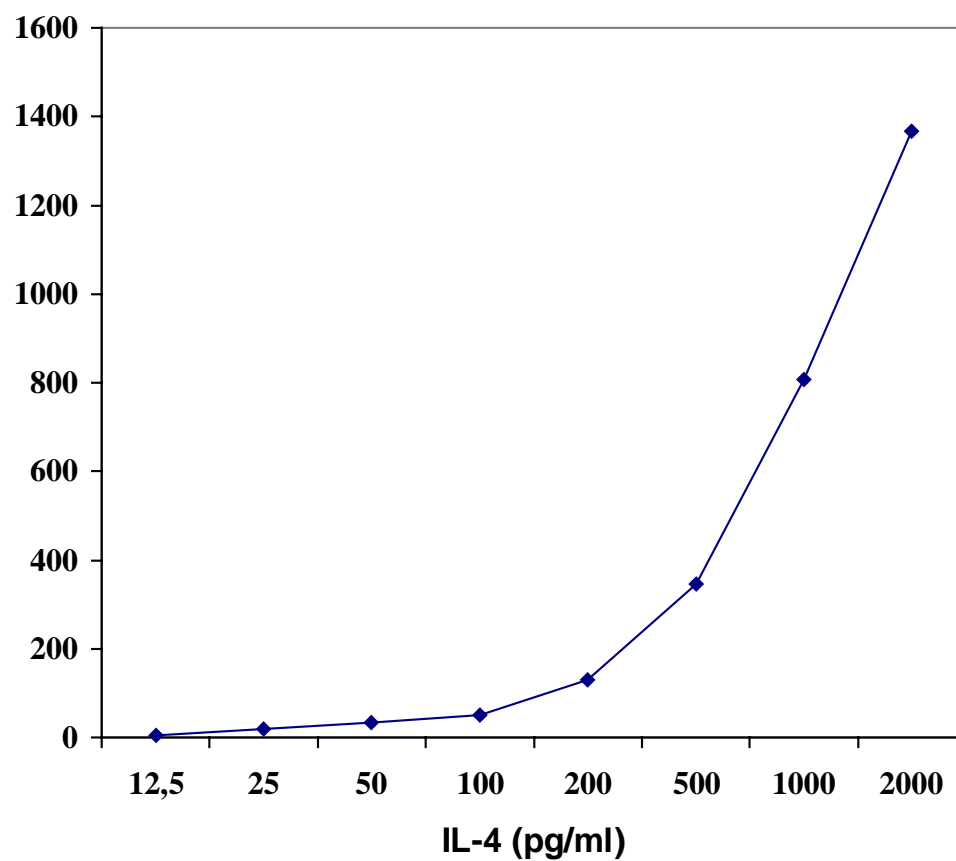


Figura 6: Curva-padrão da interleucina-4 obtida pelo uso de IL-4 recombinante de camundongos.

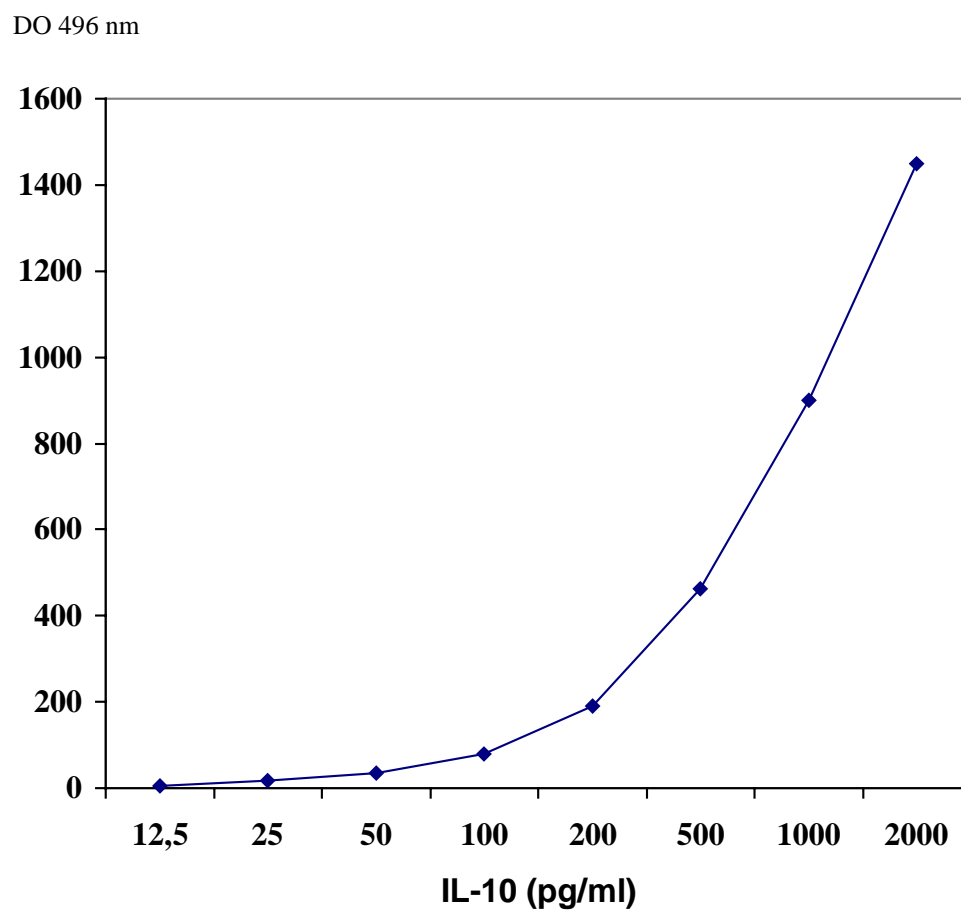


Figura 7: Curva-padrão da interleucina-10 obtida pelo uso de IL-10 recombinante de camundongos

3.12. AVALIAÇÃO DE SOBREVIDA

Para avaliarmos os efeitos do BCDT na sobrevivência de animais portadores do TAE, doses de 10, 15 ou 30 mg/kg/dia foram administradas por um, dois ou três dias após a inoculação tumoral. Grupos de 20 animais foram observados diariamente até o óbito.

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação estatística dos resultados foi realizada pelo Teste de Análise de Variância (ANOVA) e, quando significativo, através do Teste de Comparação Tukey. As diferenças entre os grupos para as citocinas foram verificadas utilizando-se ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon. As curvas de sobrevivência foram realizadas utilizando a Curva de Kaplan-Meier e Teste Cox-Mantel.



RESULTADOS

4.1. EFEITOS DO COMPOSTO BCDT SOBRE O NÚMERO DE PROGENITORES HEMATOPOIÉTICOS PARA GRANULÓCITO E MACRÓFAGO DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO (CFU-GM)

Os efeitos dos tratamentos com uma, duas, ou três injeções de 10, 15 ou 30 mg/kg/dia de BCDT sobre o número de CFU-GM da medula óssea de animais normais e inoculados com o TAE estão apresentados na Fig. 8, Tab. 2, e na Fig. 9, Tab. 3, respectivamente. Em animais normais, os esquemas terapêuticos correspondentes à administração de três injeções de 10 ou 15 mg/kg/dia aumentaram 50% e 38%, respectivamente, o número de CFU-GM da medula óssea ($P < 0,001$, ANOVA, Teste Tukey) sem produzir alterações no número de colônias esplênicas. Por outro lado, exposição às maiores doses (uma e três injeções de 30 mg/kg) produziu um aumento significativo no número de colônias esplênicas, sem alterações no número de CFU-GM da medula óssea ($P < 0,001$, ANOVA, Teste Tukey) (Fig. 10, Tab. 4).

Nos animais portadores do TAE, a mielossupressão induzida por este modelo tumoral e expressa pela drástica redução no número de CFU-GM foi restaurada a valores normais após os tratamentos com BCDT. Além disso, nestes animais a colônia produzida é maior e com um núcleo mais denso (Fig. 12). Entretanto, a recuperação no número de colônias produzida com as três administrações de 30 mg/kg foi significativamente inferior em relação aos demais grupos ($P < 0,001$, ANOVA, Teste Tukey). Além disso, neste último protocolo de tratamento, nos animais não-portadores, verificamos a morte de 33% dos animais tratados, deixando evidente a toxicidade do composto quando utilizado nesta doses.

Em relação à hematopoiese extramedular, o TAE produz um aumento expressivo no número de CFU-GM no baço, quando comparado ao grupo-controle ($P < 0,001$; ANOVA, Teste Tukey). O tratamento destes animais com BCDT reduziu significativamente o número de colônias esplênicas em todos os grupos avaliados ($P < 0,001$; ANOVA, Teste Tukey). No entanto, somente nos animais tratados com 10 e 15 mg/kg/dia esta redução atingiu valores próximos aos observados no grupo-controle, Fig. 11, Tab. 5.

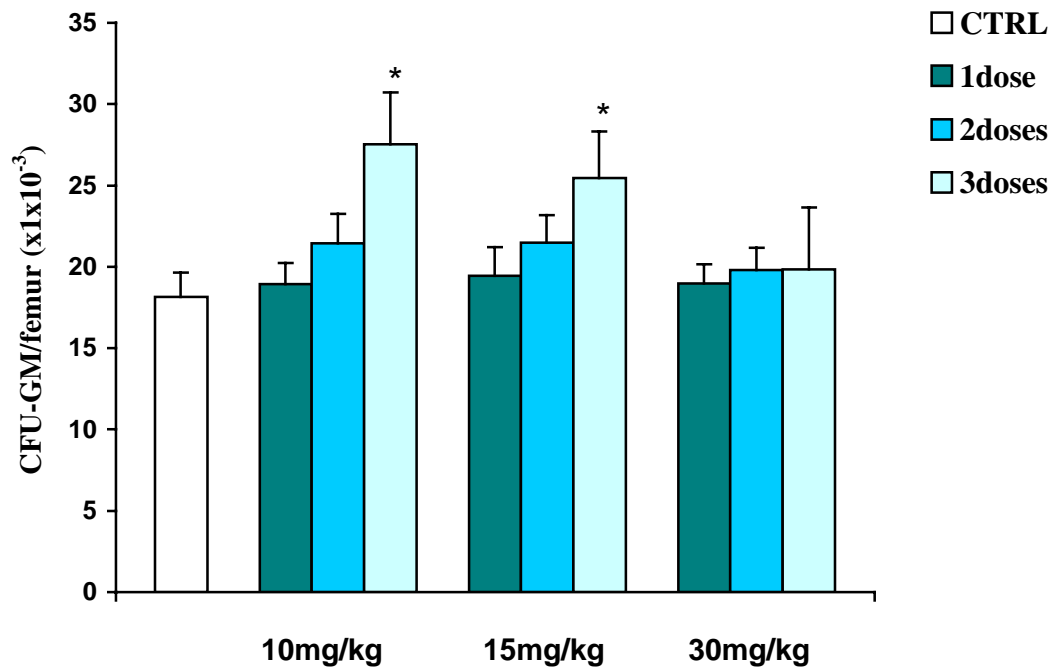


Figura 8: Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais tratados com 1, 2 ou 3 injeções de diferentes doses do BCDT (10, 15 e 30 mg/kg/dia). Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de sete animais. ANOVA, Teste Tukey. * $P < 0,001$ comparado ao controle

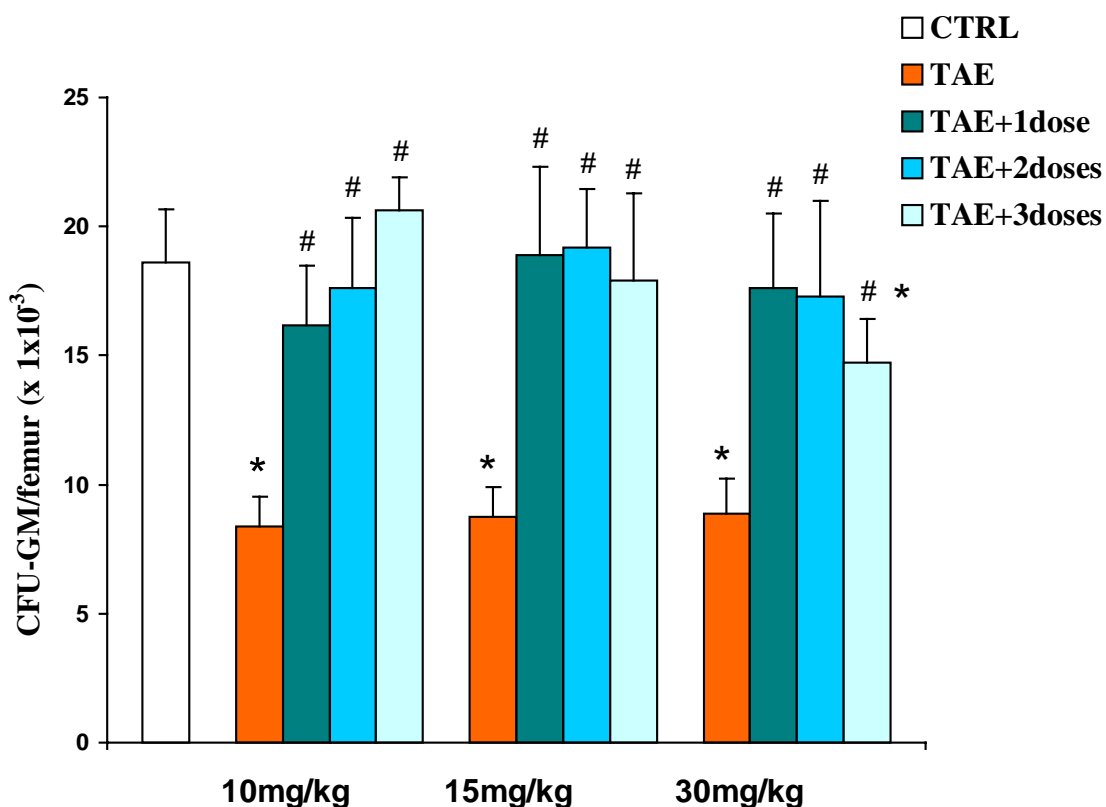


Figura 9: Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais inoculados com o TAE (6×10^6 cel/ml) e tratados com 1, 2 ou 3 injeções de diferentes doses do BCDT (10, 15 e 30 mg/kg/dia). Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de sete animais. ANOVA, Teste Tukey. * $P < 0,001$ comparado ao TAE; # $P < 0,05$ comparado ao controle

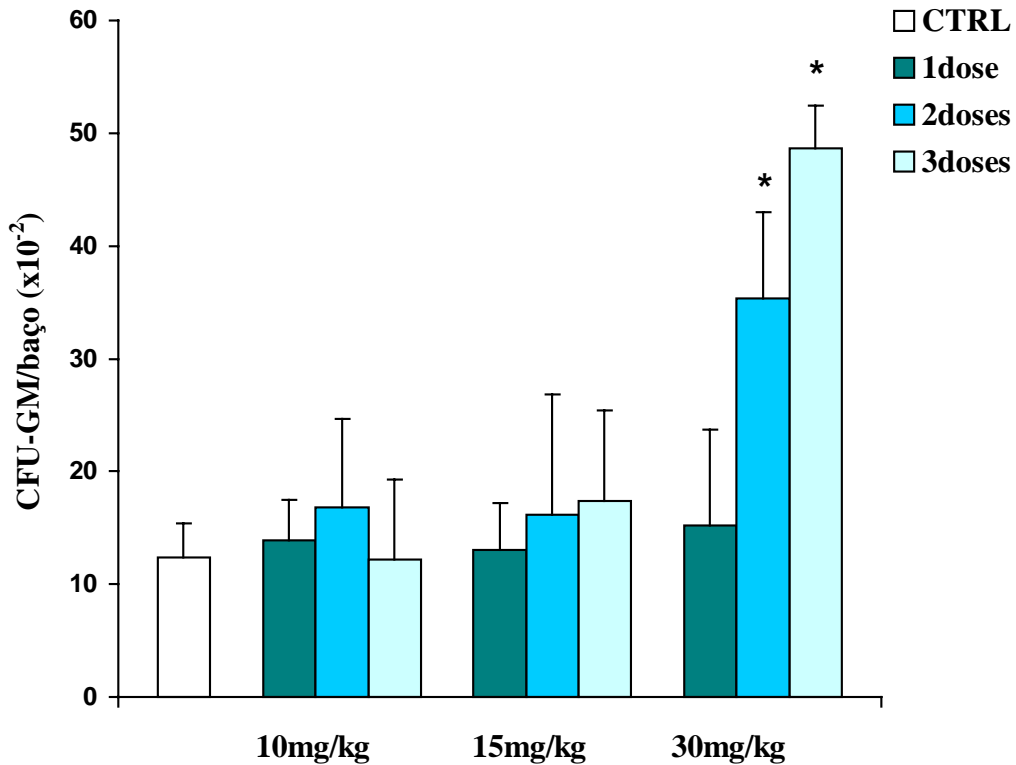


Figura 10: Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais normais tratados com 1, 2 ou 3 injeções de diferentes doses do BCDT (10, 15 e 30 mg/kg/dia). Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. Os resultados representam a média ± D.P.M. de sete animais. ANOVA, Teste Tukey. * $P < 0,001$ comparado ao controle

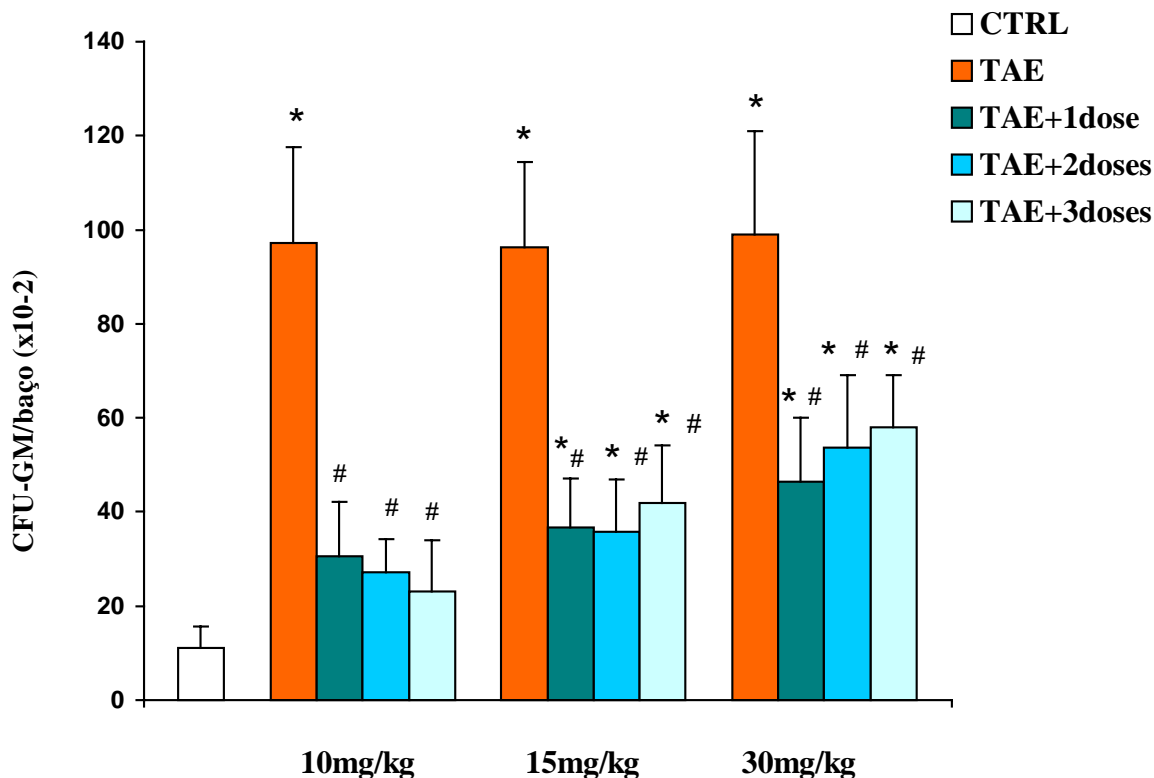


Figura 11: Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais inoculados com o TAE (6×10^6 cel/ml) e tratados com 1, 2 ou 3 injeções de diferentes doses do BCDT (10, 15 e 30 mg/kg/dia). Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de sete animais. ANOVA, Teste Tukey. * $P < 0,001$ comparado ao controle; # $P < 0,001$ comparado ao TAE

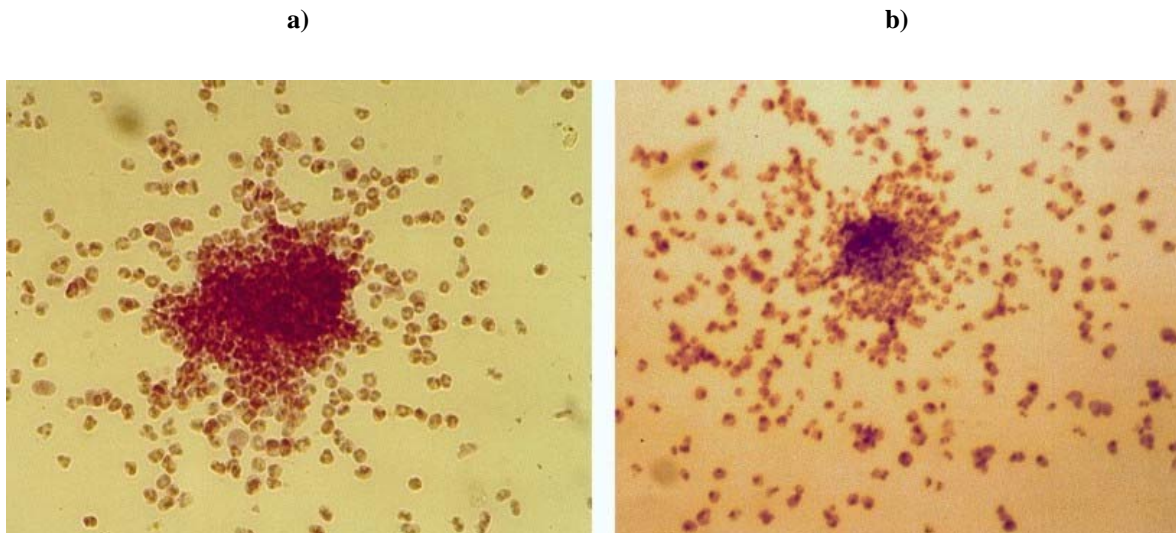


Figura 12: Fotomicrografia de uma colônia de CFU-GM (a) de animal portador do TAE e tratado com 10 mg/kg/dia de BCDT, por três dias e (b) de animal portador do TAE que não recebeu o tratamento. As colônias foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) e coradas com Luxol Fast Blue/hematoxilina. Aumento de 20X

4.2. EFEITO DO COMPOSTO BCDT SOBRE A SOBREVIDA APÓS INOCULAÇÃO TUMORAL

Como demonstrado na Fig. 13, Tabs. 6 e 7, os tratamentos com 10 e 15 mg/kg/dia produziram aumentos significativos na sobrevida dos animais nos seis grupos avaliados ($P < 0,05$, Kaplan-Maier, Teste de Cox-Mantel). Todos os animais portadores do TAE que não receberam tratamento morreram em até 20 dias após a inoculação tumoral. Nos animais tratados, os resultados mais favoráveis foram obtidos com o tratamento por três dias com 10 mg/kg/dia (sobrevida de até 41 dias), seguido pelo tratamento por três dias com 15 mg/kg (sobrevida de até 38 dias). Por outro lado, os tratamentos de duas e três administrações de 30 mg/kg/dia não produziram qualquer proteção nos animais portadores do tumor (Tab. 8). Diante destes dados, adotamos o esquema terapêutico de três administrações de 10 mg/kg/dia nos ensaios subseqüentes para avaliação dos mecanismos imunológicos subjacentes à ação antitumoral do composto BCDT.

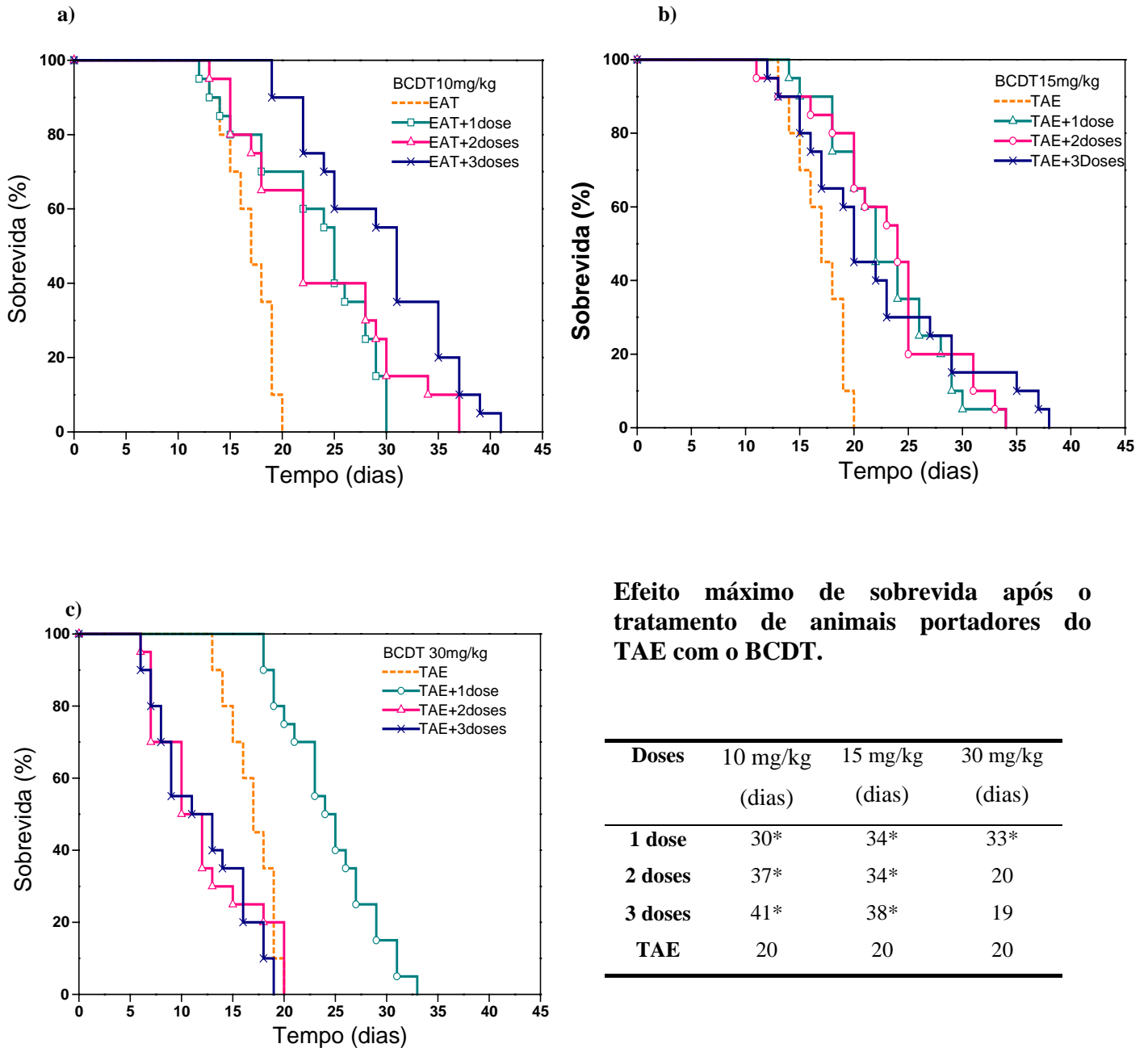


Figura 13: Curva de sobrevivência (Kaplan- Maier) de animais inoculados com TAE e tratados com 1, 2 ou 3 doses de 10 (a), 15 (b) ou 30 (c) mg/kg/dia de BCDT. Os tratamentos com o BCDT iniciaram-se 24 h após a inoculação das células tumorais. * $P < 0,05$; Teste Cox-Mantel

4.3. EFEITO DO COMPOSTO BCDT SOBRE A PRODUÇÃO DE FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS “CSFS”

A avaliação da presença de fatores estimuladores de colônias (CSFs) no soro de animais normais expostos ao protocolo terapêutico de 3 administrações de 10 mg/kg/dia demonstrou um efeito estimulador do soro destes animais sobre o crescimento e diferenciação de células progenitoras da medula óssea de animais normais ($P < 0,001$; Fig. 14, Tab. 9). O estudo morfológico das colônias produzidas nestes ensaios evidenciou o predomínio de granulócitos e macrófagos.

Em contrapartida, a adição *in vitro* do BCDT em diferentes concentrações às culturas de células hematopoiéticas da medula óssea de animais normais não produziu nenhum efeito sobre a formação de CFU-GM.

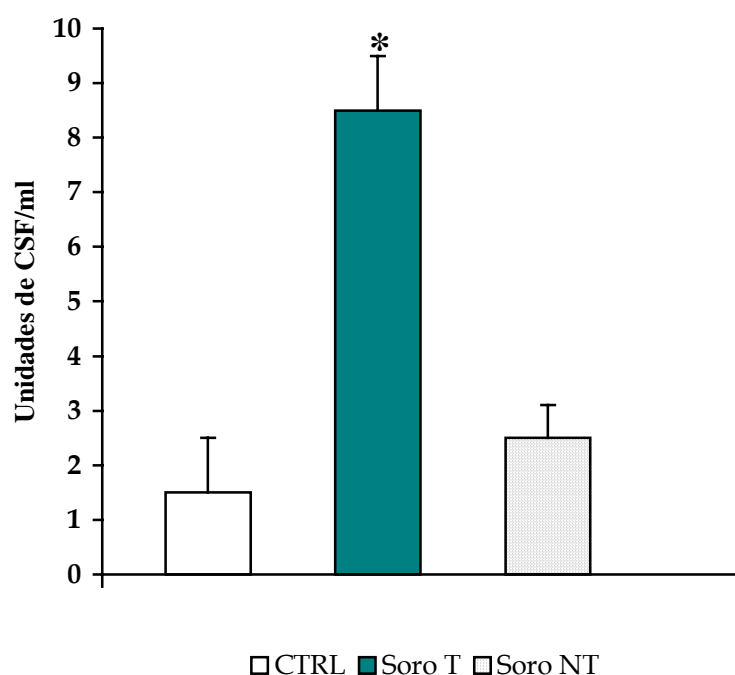


Figura 14: Efeitos da incubação de células progenitoras hematopoiéticas de animal normal com o soro de animais tratados com BCDT (Soro T) e com o soro de animais que não receberam tratamento (Soro NT) diretamente na cultura clonal. O controle (CTRL) foi incubado sem a presença de estímulos. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de quatro animais por grupo. ANOVA, Teste Tukey, * $P < 0,005$ comparado ao controle

4.4. EFEITO DO COMPOSTO BCDT SOBRE A CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA

Os resultados apresentados na Tab. 10, referentes ao quarto dia após inoculação tumoral, demonstram uma redução significativa ($P < 0,001$) no número total e diferencial de células mielóides nos animais portadores do TAE. A redução nos subtipos celulares foi estatisticamente significativa para os linfoblastos, promielócitos/mielócitos e mieloblastos. Por outro lado, o tratamento destes animais por três dias com 10 mg/kg/dia de BCDT preveniu a redução no número de células mielóides observada com a presença do TAE. No grupo de animais normais expostos ao tratamento com o BCDT, não observamos alterações no número total e relativo das células medulares.

4.5. EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM DDCT E BCDT SOBRE A ATIVIDADE DE CÉLULAS “NATURAL KILLER”

A cinética temporal das alterações produzidas na atividade citotóxica das células NK, avaliada no 4^o, 9^o e 14^o dias após inoculação tumoral, demonstrou um declínio progressivo na atividade das células NK em função do crescimento do tumor, culminando, no último dia de avaliação, com uma capacidade citotóxica de apenas 3,8% (razão 50:1), contrastando com os 24,7% do grupo-controle ($P < 0,05$ ANOVA, Teste Tukey). A redução na capacidade funcional das células NK produzidas pela presença do tumor foi completamente restabelecida após tratamento com 15 mg/kg de DDCT por dois dias consecutivos, sendo que não observamos qualquer regressão nesta resposta nas avaliações realizadas ao longo do crescimento tumoral ($P < 0,05$ ANOVA, Teste Tukey) (Fig. 15, Tab. 11). Em animais normais, não portadores do TAE, a administração de DDCT não produziu qualquer alteração na atividade citotóxica destas células.

Em relação aos efeitos do composto BCDT, a administração de 10 mg/kg/dia/3 dias, da mesma forma que com o composto DDCT, não produziu alterações na atividade funcional das células NK em animais normais (Fig. 16, Tab. 12). No entanto, em animais portadores do TAE, embora uma recuperação na atividade funcional das células NK tenha sido observada nas primeiras 24 horas após o término do tratamento ($P < 0,05$ ANOVA, Teste Tukey), nas avaliações subseqüentes, o aumento produzido pelo BCDT na atividade das células NK, ainda que significativo em relação ao portador do TAE, não atingiu a capacidade funcional observada no grupo-controle ($P < 0,05$ ANOVA, Teste Tukey).

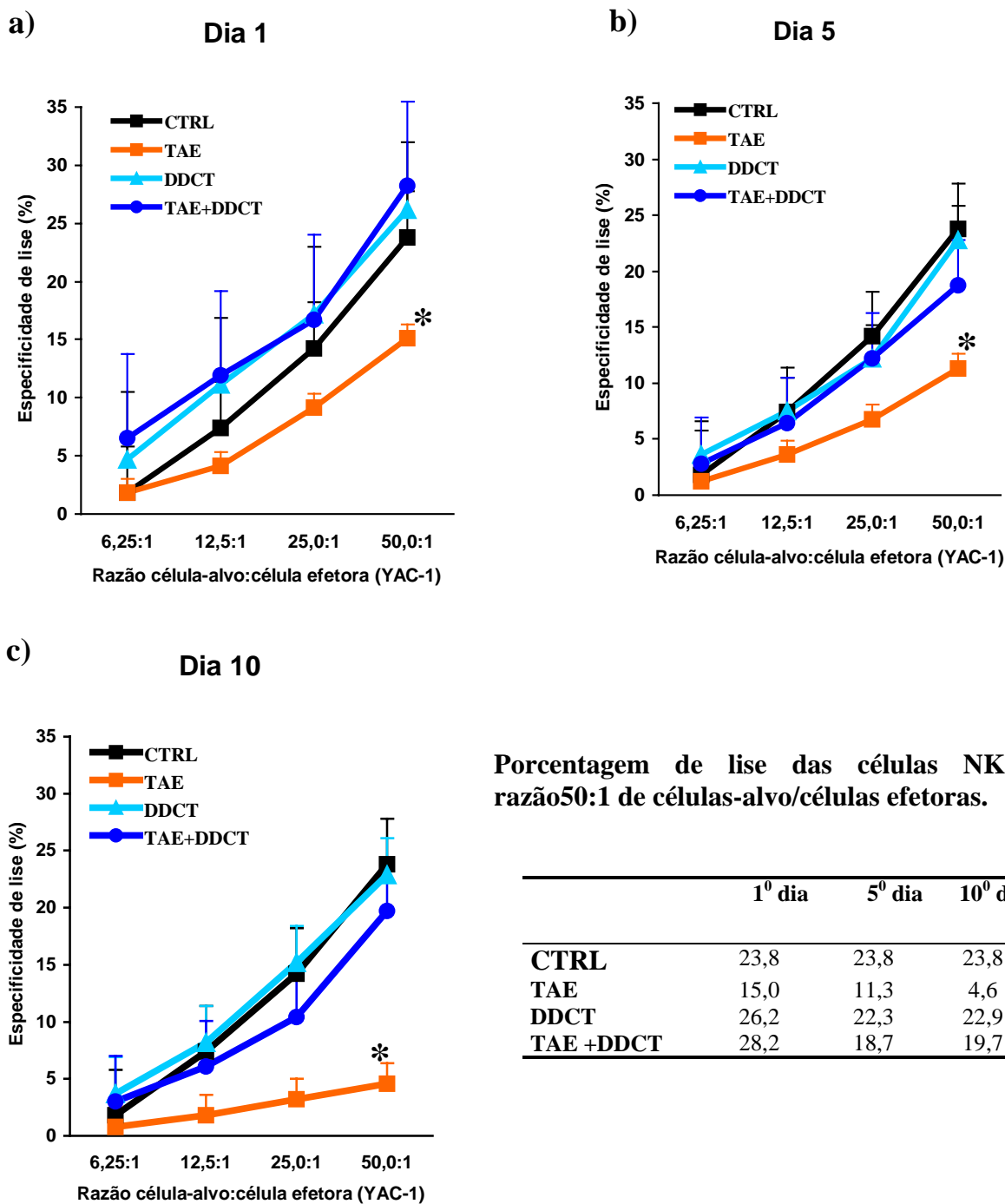


Figura 15: Atividade das células NK em animais portadores do TAE e tratados por dois dias com 15 mg/kg/dia de DDCT. Os animais foram sacrificados no 1^o (a), 5^o (b) e 10^o (c) dias após o término do tratamento. Os valores representam a média \pm D.P.M. para as diferentes razões de células-alvo:células efetoras (YAC-1). ANOVA, Teste Tukey, * $P < 0,001$ comparado ao controle

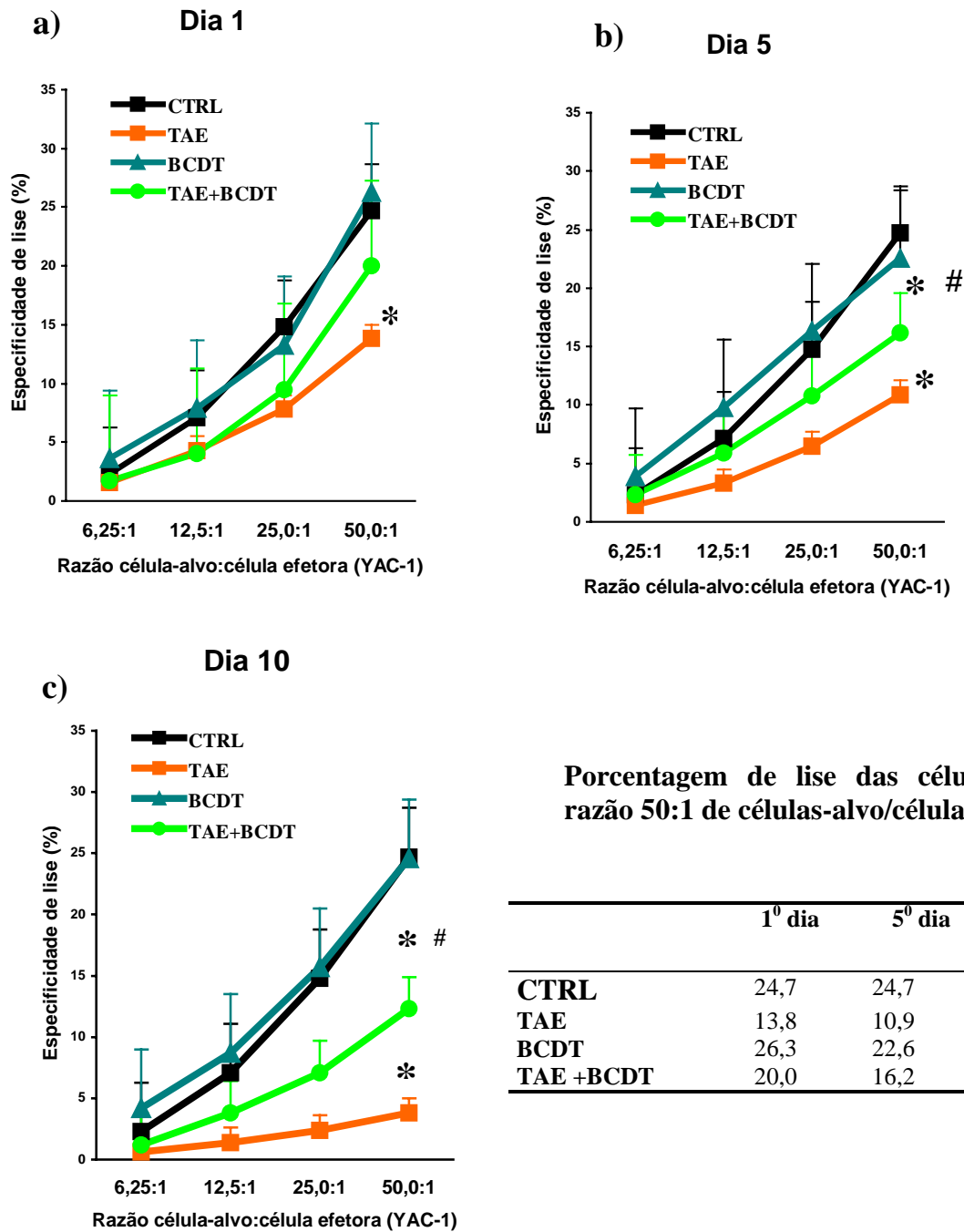


Figura 16: Atividade das células NK em animais portadores do TAE e tratados por três dias com 10mg/kg de BCDT. Os animais foram sacrificados no 1^o (a), 5^o (b) e 10^o (c) dias após o término do tratamento. Os valores representam a média ± D.P.M. para as diferentes razões de células-alvo:células efetoras (YAC-1). ANOVA, Teste Tukey, **P* < 0,05 comparado ao controle. #*P* < 0,05 comparado ao TAE

4.6. EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM DDCT E BCDT SOBRE OS NÍVEIS DE PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IL-2, IFN- γ , IL-10 E IL-4

Durante a fase inicial da progressão tumoral (por volta do 4^o dia após o inóculo), observamos um drástico aumento nos níveis de produção de IFN- γ , sem que qualquer alteração tenha sido detectada nos níveis de produção de IL-2. No entanto, nas avaliações realizadas por volta do 9^o e 14^o dias de crescimento tumoral, período este no qual se observa uma fase exponencial de crescimento do tumor, detectamos uma redução progressiva na secreção destas citocinas, atingindo valores inferiores aos níveis basais do grupo-controle ($P < 0,05$ Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon). Paralelamente, a avaliação da produção de IL-10 revelou que na fase exponencial de crescimento tumoral ocorre um aumento significativo nos níveis de produção desta citocina ($P < 0,05$ Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon). Por outro lado, nenhuma alteração foi detectada nos níveis de secreção de IL-4 após o implante do tumor.

Enquanto que no animal normal a única alteração observada após tratamentos com os dois compostos em estudo foi um aumento acentuado nos níveis de IL-2 produzido pelo composto DDCT, nos animais portadores do TAE, que foram tratados com os titanocenos, verificamos uma inibição na mudança de perfil Th1 (INF- γ e IL-2) para Th2 (IL-10 e IL-4) induzida pela evolução tumoral, a qual foi mais acentuada com o DDCT. Nesse sentido, a produção comprometida de IL-2 na fase exponencial do crescimento tumoral foi totalmente revertida após tratamento com DDCT. Mesmo na fase inicial da progressão do tumor, quando os níveis de IL-2 não estavam ainda alterados, o tratamento com DDCT já produziu um aumento significativo em relação ao controle, nos níveis de produção desta citocina. Em relação ao tratamento com o BCDT, observamos que, embora haja uma recuperação nos níveis de IL-2 por volta do 9^o dia de evolução tumoral, este efeito não se manifesta em estágios avançados de evolução da doença (14^o dia), quando os níveis desta citocina se apresentam similares aos observados no animal portador do TAE, não-tratado (Fig. 17, Tabs. 13 e 17).

Em relação aos níveis de IFN- γ , observamos que o tratamento com os compostos impede o aumento acentuado nos níveis desta citocina observados na fase inicial do desenvolvimento tumoral (por volta do 4^o dia). Com a progressão da doença, o

tratamento com o composto DDCT impediu a progressiva redução, produzida pelo tumor, nos níveis desta citocina, mantendo-os equivalentes aos observados no grupo-controle durante os estágios avaliados de progressão tumoral (Fig. 18, Tabs. 14 e 18). Por outro lado, com o composto BCDT, a recuperação nos níveis desta citocina foi apenas observado no 9^o dia de evolução tumoral, sendo que no 14^o dia os níveis de secreção de IFN- γ eram equivalentes nos animais portadores do tumor tratados e não-tratados.

Em relação ao aumento progressivo nos níveis de produção de IL-10 (Fig. 19, Tabs. 15 e 19) observado no 9^o e 14^o dias de evolução tumoral, o tratamento com os dois titanocenos proporcionou níveis de IL-10 equivalentes aos verificados nos controles.

Nenhuma alteração foi registrada nos níveis de secreção de IL-4 em todos os grupos avaliados (Fig. 20, Tabs. 16 e 20).

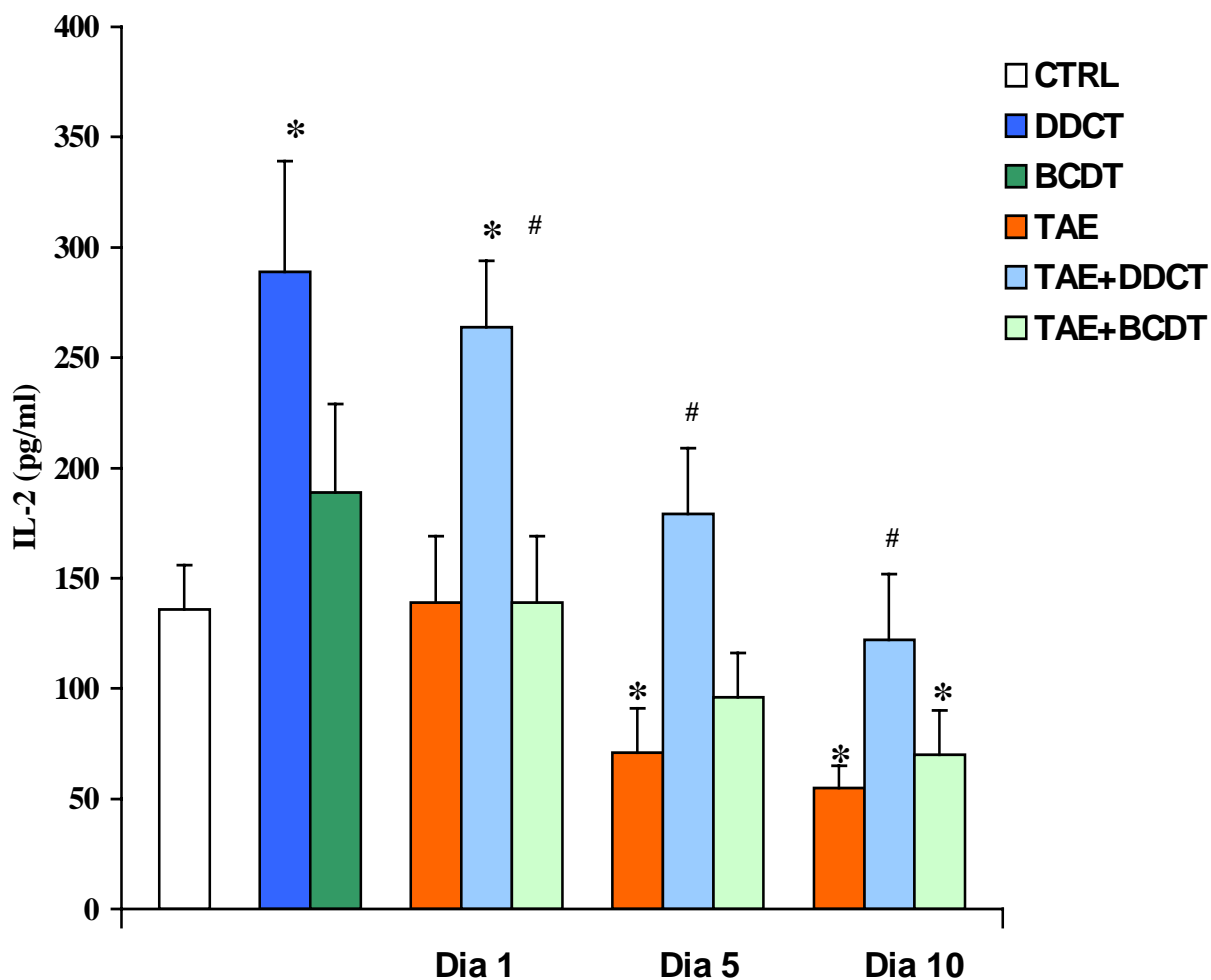


Figura 17: Concentração de IL-2 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados por dois dias com 15 mg/kg/dia de DDCT ou com 10 mg/kg/dia de BCDT durante três dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 8 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon, * $P < 0,05$ comparado ao controle; # $P < 0,05$ comparado ao TAE

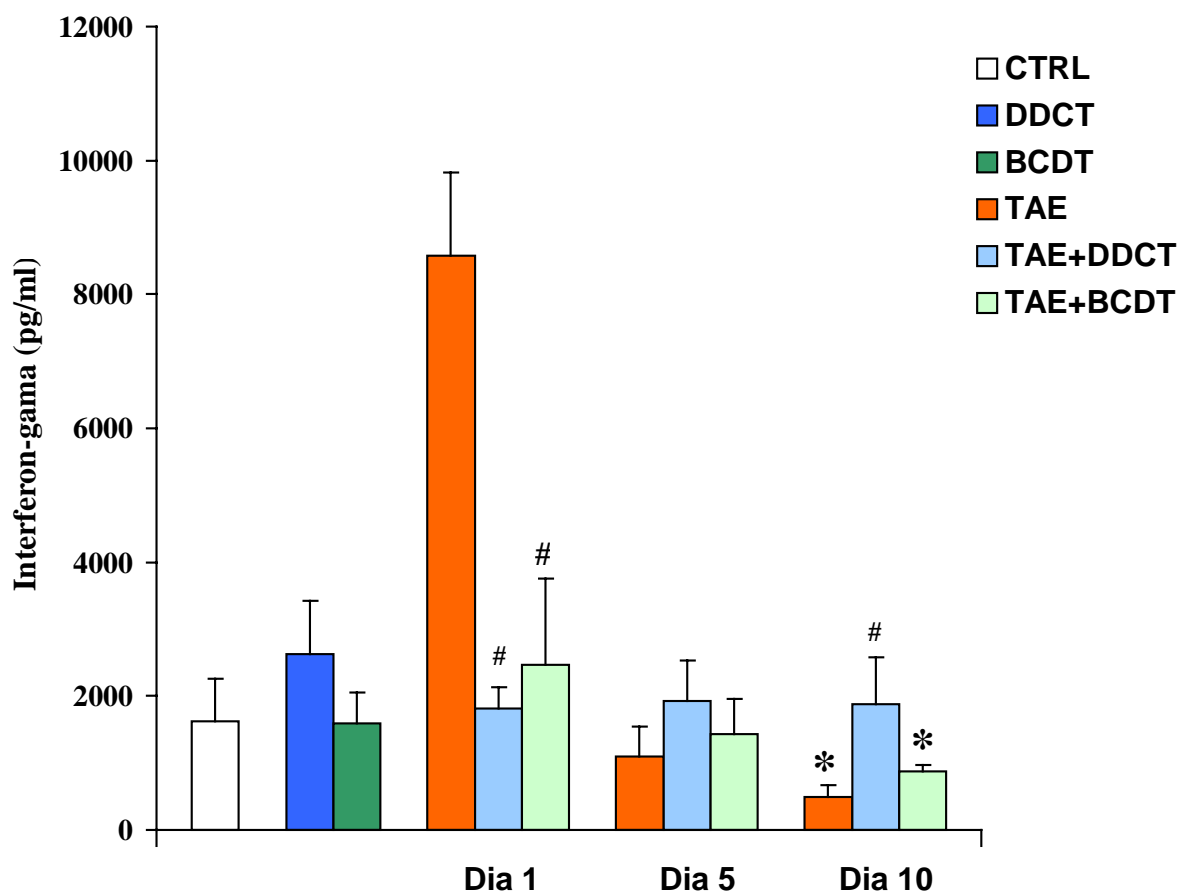


Figura 18: Concentração de IFN- γ (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados por dois dias com 15 mg/kg/dia de DDCT ou com 10 mg/kg/dia de BCDT durante três dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 8 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon, * $P < 0,05$ comparado ao controle; # $P < 0,05$ comparado ao TAE

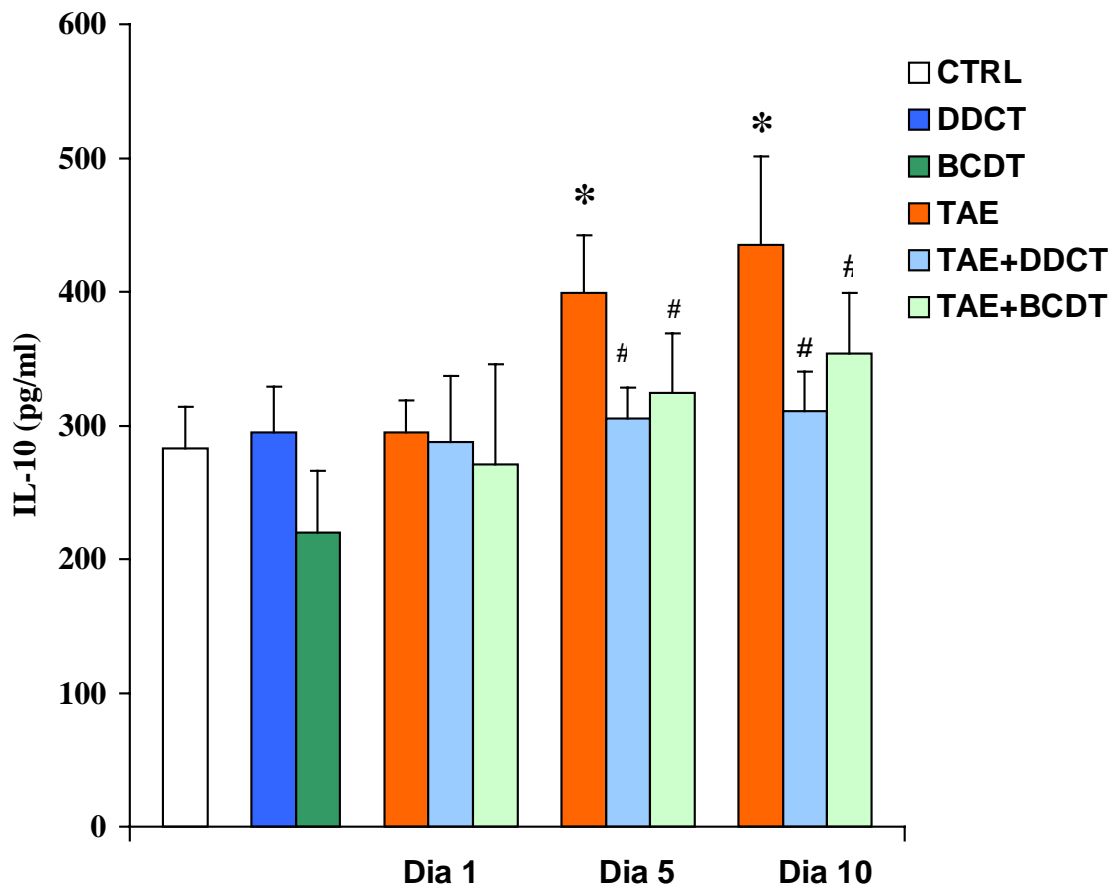


Figura 19: Concentração de IL-10 determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados por dois dias com 15 mg/kg/dia de DDCT ou com 10 mg/kg/dia de BCDT durante três dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 8 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $P < 0,05$ comparado ao controle; # $P < 0,05$ comparado ao TAE

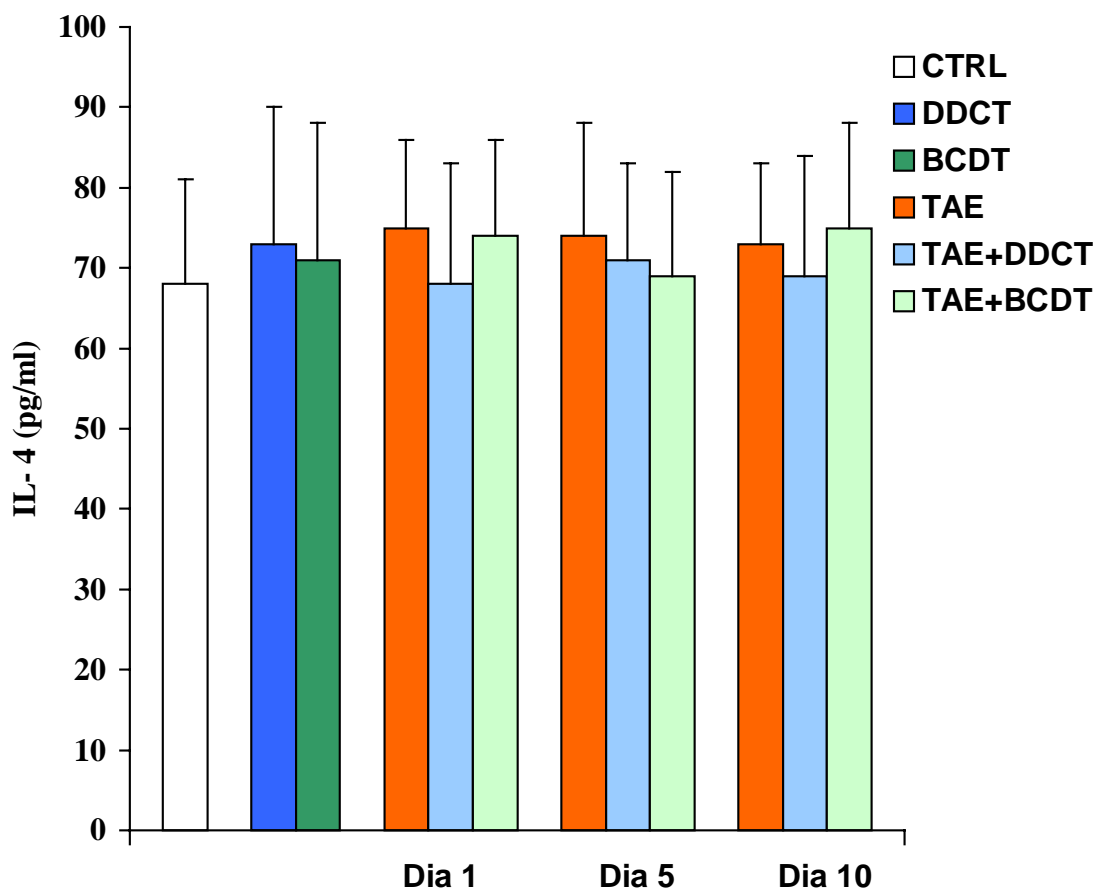


Figura 20: Concentração de IL-4 (pg/ml) Concentração de IL-2 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados por dois dias com 15 mg/kg/dia de DDCT ou com 10 mg/kg/dia de BCDT durante três dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 8 animais



DISCUSSÃO

Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que, no processo de mielossupressão induzido pelo desenvolvimento do TAE, o tratamento com o DDCT produz reversão deste quadro através do aumento tanto no número de precursores de granulócitos e macrófagos da medula óssea, quanto nos níveis séricos de fatores estimuladores de colônias hematopoiéticas. Esta reversão na capacidade hematopoiética foi acompanhada de um aumento significativo na sobrevida dos animais portadores do tumor (VALADARES *et al.*, 1998). Dando prosseguimento a estes estudos, neste trabalho, investigamos alguns aspectos da resposta imunológica subjacentes à atividade antitumoral deste titanoceno. Além disso, para efeito comparativo e maior entendimento do mecanismo de ação desta classe de compostos, acrescentamos aos nossos estudos o composto BCDT, o qual é um derivado do DDCT. A diferença estrutural entre os dois compostos consiste da substituição dos radicais halogênicos presentes no DDCT por pseudo-halogênicos na fórmula do segundo composto. Com o BCDT, além dos parâmetros imunológicos mencionados acima, investigamos também as alterações hematopoiéticas estudadas anteriormente com o composto original. Nossos resultados demonstraram uma maior eficácia antitumoral para o composto DDCT em relação ao BCDT. Neste sentido, a maior capacidade de sofrer hidrólise *in vitro*, proporcionada pela presença dos radicais cloreto no DDCT, parece estar diretamente associada com a eficácia antitumoral apresentada desse titanoceno (KOPF-MAIER, 1980; BAKHTIAR & OCHIARI, 1999; HARDING & MOKDSI, 2000; HARDING & MOKDSI, 2001).

Além da fórmula estrutural, um outro aspecto importante envolvido na eficácia antitumoral dos titanocenos diz respeito à dose do composto utilizada. A este respeito, trabalhos recentes da literatura demonstram que compostos classicamente imunossupressores podem apresentar ação imunoestimuladora quando utilizados em doses inferiores àquelas empregadas na terapêutica convencional (MIHICH & EHRKE, 2000; ZAGOZDZON & GOLAB, 2001). Os nossos resultados também ilustram a estreita margem de segurança existente entre as doses, muitas vezes, bastante próximas. Com o DDCT, por exemplo, a diferença entre ausência de efeitos, resposta efetiva e toxicidade acompanhada de redução na sobrevida está no prolongamento de apenas um dia na duração do tratamento (VALADARES *et al.*, 1998). Da mesma forma, com o composto BCDT, a eficácia antitumoral decresceu com aumentos na dose. Nesse sentido, a melhor resposta foi

obtida com três administrações de 10mg/kg, enquanto que protocolos de três doses de 15 mg/kg ou 30 mg/kg produziram, respectivamente, perda na eficácia e toxicidade evidente. Além disso, a presença de hematopoiese extramedular nos animais normais expostos a este protocolo de maior dose torna evidente a presença de um efeito colateral grave indicativo de um prognóstico pouco favorável (ABDEL- DAYEM *et al.*, 1999).

Apesar das diferenças encontradas na eficácia destes dois compostos, nossos resultados ilustram que a classe antitumoral dos titanocenos compartilha da habilidade de regular positivamente os desequilíbrios hematopoiéticos e imunológicos envolvidos na evolução temporal do TAE. Nesse sentido, a eficácia antitumoral dos dois compostos é dependente da recuperação no equilíbrio da resposta hematopoiética, da reversão na tendência de polarização Th1-Th2 produzida pelo tumor e do aumento na atividade funcional das células NK, conforme discutiremos a seguir.

Os efeitos sobre a hematopoiese observados com o BCDT foram semelhantes aos produzidos pelo composto original DDCT, publicados anteriormente (VALADARES *et al.*, 1998). Com os dois compostos, uma recuperação no número de progenitores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos foi observada em animais portadores do TAE. Além disso, o soro destes animais apresentou uma atividade estimuladora de CFU-GM equivalente a 8,5 unidades/ml para o BCDT e 24 unidades/ml para o DDCT. Este efeito estimulador do soro sobre a hematopoiese parece ocorrer por um mecanismo indireto, uma vez que a incubação *in vitro* com o DDCT (VALADARES *et al.*, 1998) e o BCDT, de células da medula óssea de animais normais, não produziu qualquer efeito estimulador sobre a hematopoiese.

Está bem estabelecido na literatura que células tumorais possuem a habilidade de produzir continuamente fatores estimuladores de colônias (CSFs), assim como receptores para estes CSFs (SUBIZA *et al.*, 1989). As propriedades fisiológicas dos CSFs de origem tumoral não estão totalmente elucidadas, embora sejam reconhecidos efeitos locais e sistêmicos relacionados à presença destes fatores. Os efeitos sistêmicos incluem uma diminuição na resposta blastogênica de linfócitos T a mitógenos, esplenomegalia associada à hematopoiese extramedular (esplênica) e desenvolvimento de células supressoras, as quais pertencem a uma linhagem monocítica indiferenciada ou são

macrófagos residentes no baço com capacidade de secretar moléculas imunossupressoras. Por outro lado, em nível local, os CSFs podem agir de forma autócrina promovendo o crescimento tumoral ou reduzindo a tumorigenicidade por meio de estímulo na resposta imunológica do hospedeiro (DEDHAR *et al.*, 1988). Neste sentido, RUIZ de MORALES *et al.*, (1999), utilizando duas variantes de células de Ehrlich, uma secretora do fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e do fator estimulador de granulócitos (G-CSF) e uma outra não-secretora, demonstraram que as alterações hematopoiéticas encontradas neste modelo tumoral não estão restritas à capacidade das células de Ehrlich de produzir GM-CSF e G-CSF. Estes autores sugerem que, embora ocorra produção de CSFs neste modelo tumoral, as quantidades secretadas *in vitro* são insuficientes para reduzir a tumorigenicidade. Os autores sugerem ainda que a presença de fatores imunossupressores produzidos pelo TAE se contrapõem à resposta imunológica apropriada e, desta forma, antagonizam os efeitos dos CSFs.

Estudos prévios realizados em nosso laboratório e outros (KEEB & LALA, 1978; HARDY & BALDUCCI, 1985; VALADARES *et al.*, 1998; JUSTO *et al.*, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2001) demonstraram que, durante o desenvolvimento do TAE, ocorre drástica redução no número de CFU-GM e na celularidade da medula óssea, efeitos estes que concorrem para a falência na defesa do hospedeiro. Nesse sentido, a reversão destes efeitos, após o tratamento com as menores doses do BCDT, foi acompanhada de aumento na sobrevida dos animais portadores de tumor. Da mesma forma, a menor capacidade de restabelecer o equilíbrio no número de CFU-GM e de prolongar a sobrevida foi observada nos portadores do TAE tratados com as maiores doses do composto. Portanto, com base no exposto, podemos afirmar que a capacidade dos titanocenos de induzir recuperação hematopoiética constitui um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da eficácia antitumoral destes compostos.

A expansão do TAE, associada a uma diminuição tanto no número de CFU-GM da medula óssea, quanto no progressivo aumento destes precursores no baço, tem sido atribuída principalmente a fatores como migração de células da medula óssea para o baço, depósito no tecido hematopoiético de substâncias de origem tumoral, as quais produzem um bloqueio funcional nos receptores dos macrófagos do estroma e, nas células

progenitoras, e mais recentemente, à presença do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o qual, através de modulação na produção de citocinas pelas células endoteliais, aumenta a angiogênese tumoral e atua como promotor de um desequilíbrio hematopoiético similar ao ocorrido durante a evolução temporal do TAE (RAHAL, REINSH, OSMOND, 1992; SEGURA, *et al.*, 1997; ELGERT *et al.*, 1998; GABRILOVICH *et al.*, 1998; RUIZ de MORALES *et al.*, 1999). Neste sentido, foi demonstrado que os titanocenos possuem a capacidade de modular a ativação funcional de células endoteliais, no sentido de bloquear a angiogênese tumoral (BASTAKI *et al.*, 1994,).

Além dos fatores imunossupressores acima mencionados, merecem destaque o TGF- β e as prostaglandinas (PAHAR & LALA, 1988; BETZ & FOX, 1991; HILKENS *et al.*, 1995). O aumento de prostaglandina E₂ (PGE₂), característico da evolução do TAE, está associado a um fraco influxo de células inflamatórias na cavidade peritoneal e a uma inibição da liberação das citocinas IL-2 e IFN- γ pelos linfócitos T (FECHIO *et al.*, 1990). Nesse sentido, nossos resultados sobre os níveis de produção das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-4 em animais portadores do TAE, corroboram resultados na literatura que demonstram uma migração do fenótipo Th1 para o Th2, no processo de evolução tumoral (YAMAMOTO *et al.*, 1995; SEGURA *et al.*, 1997). Neste sentido, detectamos reduções significativas nos níveis de produção de IFN- γ e IL-2, nos estágios mais avançados da evolução tumoral, apesar do drástico aumento observado nos níveis de IFN- γ na fase inicial do desenvolvimento do tumor. A este respeito, foi demonstrado que o aumento na frequência de células CD4⁺ que expressam IFN- γ , observada nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, não levam à dominância da resposta Th-1 (SEGURA *et al.*, 1997). Além disso, este parece ser um dos mecanismos tumorais de escape à vigília tumoral do hospedeiro, uma vez que níveis aumentados de IFN- γ tendem a reduzir a sensibilidade do sistema imunológico a esta citocina. A este respeito, nos estágios avançados da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), níveis plasmáticos de IFN- γ se encontram elevados sensivelmente, sendo provavelmente responsáveis pelos sintomas de fadiga, febre e mialgia observados na doença. No entanto, foi demonstrado que este aumento não se dá à custa de um interferon normal, mas de um interferon atípico, provavelmente produzido por células NK e/ou células CD8⁺ (DREW, 1990; HUDSON *et al.*, 2001). Em relação às citocinas representativas do fenótipo Th2, verificamos um

aumento progressivo nos níveis de secreção da IL-10, a qual apresenta função inibidora sobre a síntese das citocinas com perfil Th1 e, através de sua ação supressora, promove o crescimento tumoral. Por outro lado, não observamos alterações nos níveis de IL-4 em todos os grupos avaliados.

A administração dos compostos titanocenos modulou o perfil de produção destas citocinas no animal portador do TAE. Tanto o DDCT quanto o BCDT aumentaram a secreção da IL-2, sendo este aumento mais expressivo com o DDCT. A IL-2 foi inicialmente identificada como um fator de crescimento de células T, as quais estão diretamente envolvidas no desenvolvimento e na atividade citotóxica das células NK. Receptores de IL-2 se distribuem não somente em células NK, mas também em monócitos e células progenitoras mielóides (MISAWA *et al.*, 2000). Além disso, IL-2 *in vivo* leva à produção de citocinas secundárias, incluindo IL-1, TNF- α , IL-6, GM-CSF, M-CSF e IFN- γ , sendo utilizada no tratamento do câncer por aumentar a atividade celular e citotóxica das células efectoras. Em relação aos níveis de IFN- γ , verificamos que os tratamentos com os compostos modulam positivamente a produção atípica desta citocina durante o crescimento do tumor. Com o composto DDCT houve completa normalização nos níveis desta citocina, enquanto que com o BCDT, apesar de normalização nos níveis iniciais de IFN- γ , uma recuperação apenas parcial nos níveis desta citocina foi produzida nos estágios avançados de evolução tumoral.

Quanto ao aumento na produção de IL-10, os tratamentos com os dois compostos reduziu os níveis desta citocina no animal portador do tumor, favorecendo a polarização para a resposta imune tipo Th1. IL-10 é uma citocina produzida por células Th2, a qual não apenas inibe a síntese das citocinas do perfil Th1, mas também a função apresentadora de antígeno às células T promovida pelos macrófagos (CHOUAIB *et al.*, 1997). Portanto, o favorecimento da resposta Th1 parece constituir mais um dos mecanismos envolvidos na resposta antitumoral dos titanocenos.

Células NK, principalmente pela capacidade de produzir citocinas, particularmente o IFN- γ , possuem um papel primordial na rejeição dos tumores. Está bem estabelecido na literatura que o IFN- γ ativa as funções fagocíticas de macrófagos e potencializa a reatividade das células NK (MISAWA *et al.*, 2000, MILLER *et al.*, 2001). A

avaliação da atividade funcional das células NK, na fase inicial do crescimento do TAE, demonstrou que, apesar do drástico aumento nos níveis de IFN- γ , mencionado anteriormente, não ocorreu qualquer aumento na capacidade citotóxica destas células, a qual se encontra reduzida já na fase inicial de crescimento do TAE, corroborando as evidências anteriores da presença de um IFN- γ atípico induzido pelo tumor que é incapaz de restabelecer a imunidade celular. Evidências na literatura atribuem esta supressão na atividade das células NK à presença de células supressoras geradas durante o desenvolvimento do tumor, as quais são mediadas principalmente por fatores como prostaglandina E₂, IL-6, TGF- β e IL-10 (PARHAR & LALA, 1988; RAHAL, REINSH, OSMOND, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1995; SEGURA *et al.*, 1997; ELGERT *et al.*, 1998, SEGURA, *et al.*, 2000).

O tratamento com DDCT de animais portadores do tumor produziu um aumento significativo na função citotóxica das células NK, atingindo valores equivalentes aos encontrados no grupo-controle. Quanto ao composto BCDT, um efeito restaurador sobre a ação citotóxica de células NK foi observado apenas nos estágios iniciais da doença. Com a evolução tumoral, embora a atividade funcional das células NK não tenha sido restaurada aos níveis observados nos animais controle, o aumento produzido pelo composto BCDT na atividade citotóxica destas células foi significativo quando comparado ao efeito observado no animal portador do TAE. Neste sentido, MILLER *et al.* (2001) descreveram que em pacientes portadores de câncer a presença de um infiltrado tumoral rico em células NK proporciona uma maior inibição na progressão da doença. Ademais, segundo os autores, o aumento de células NK correlaciona-se com uma diminuição de metástases e com uma menor invasão linfática.

Embora o mecanismo pelo qual os titanocenos exercem suas atividades antitumorais não tenha sido totalmente elucidado, os mecanismos aqui mencionados como o aumento de da atividade lítica das células NK, o favorecimento da resposta Th1 e o controle sobre a hematopoiese, são de fundamental importância na ação antitumoral destes compostos. Em conjunto, os dados aqui apresentados são encorajadores e favorecem novas abordagens terapêuticas dos titanocenos em combinações com outros quimioterápicos visando reduzir a mielotoxicidade e suplementar a eficácia tumoricida dos quimioterápicos utilizados na clínica médica.



CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu concluir:

- Os titanocenos DDCT e BCDT possuem propriedades hematomoduladoras em paralelo à atividade antitumoral;
- Estes compostos induzem de forma indireta a produção de CSFs em animais normais;
- O protocolo terapêutico mais efetivo com o BCDT foi o tratamento por três dias com a dose de 10 mg/kg/dia de BCDT;
- Embora não apresentem mielotoxicidade, o protocolo de 30 mg/kg/dia de BCDT por três dias demonstrou efeito tóxico;
- O equilíbrio hematopoiético é fundamental para bloquear a progressão do TAE;
- Os dois compostos aumentam a capacidade citotóxica de células NK reduzida na presença do TAE;
- O composto DDCT aumenta os níveis de produção da IL-2;
- Os dois compostos protegem contra a polarização Th1-Th2 desenvolvida neste modelo tumoral;

O DDCT é mais efetivo que o BCDT;



SUMMARY

In this work, as a continuation of previous studies in our laboratory, we investigated the effects of the titanocene dicyclopentadienyldichlorotitanium IV compound, DDCT, (15 mg/kg/day/ per two days) on the natural killer cell activity (NK) and on Th1 [interleukin (IL)-2 and interferon- γ (IFN- γ)] and Th2 (IL-4 and IL-10) responses in normal and Ehrlich ascites tumor (EAT)-bearing mice. Moreover, for comparative effect, we also studied the dicyclopentadienyldithiocyanatetitanium IV, BCDT. The structural difference between these compounds is the substitution of the halides halogens present in DDCT by pseudo halogens in BCDT. With the BCDT compound, besides the immunological parameters mentioned above, we evaluated the effect of the treatment using one, two or three doses of BCDT (10, 15 or 30 mg/kg/day) on the growth and differentiation of granulocyte-macrophage progenitor cells [colony-forming units of granulocyte-macrophage (CFU-GM)], of normal and EAT-bearing mice. As studied previously with the DDCT compound, we also evaluated the bone marrow cellularity, the presence of colony stimulating factors (CSFs) and survival of these animals. Our results demonstrated that the DDCT compound is more effective than the BCDT one. In despite of the differences found, we observed that these compounds share the ability of regulating positively the hematopoietic and immunologic unbalance during the EAT evolution. As expected for the EAT-model, concomitant myelosuppression, increased number of spleen CFU-GM and changes in bone marrow cellularity were observed. The treatment of EAT-bearing mice with BCDT produced a dose-dependent increase in myelopoiesis, a reduction in splenic colonies and a restoration of the total and differential marrow cell counts. In addition, BCDT treatments also increased the survival of these animals. The most effective dose schedule was 10 mg/kg/day/per three days, which, in normal animals, also produced increased bone marrow CFU-GM numbers along with a CSF production boost. High doses of BCDT cause toxic effects and induced extramedullary hematopoiesis. Regarding the production of cytokines, the treatment with the titanocene compounds blocked the Th1-Th2 polarization found during the EAT progression. In this respect, the treatment of these animals with DDCT (15 mg/kg/day/per two days) or BCDT (10 mg/kg/day/per three days) increased the IL-2 levels, regulated the atypical IFN- γ secretion positively and reduced the levels of IL-10, increased during the temporal evolution of EAT. In relation to the functional activity of NK cells, the treatment with both compounds enhanced the NK cell

function, reduced during the EAT growth. Only the DDCT compound rescued to normal values the activity of NK cells. These up-modulatory effects demonstrated in this study, specially using the DDCT compound, indicated a new aspect of the antitumoral action mechanism of the titanocenes. Thus, it is encouraging, in this context, to consider these compounds for combination chemotherapy, protecting the host from hematotoxicity as well as supplementing tumoricidal efficacy.



*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

- ABDEL- DAYEM, H.M.; ROSEN, G.; EL-ZEFTAWY, H.; NADDAF, S.; KUMAR, M.; ATAY, S.; CAVACIO, A. - Fluorine-18 Fluorodeoxyglucose splenic uptake from extramedullary hematopoiesis after granulocyte colony-stimulating factor stimulation. **Clinical Nuclear Medicine**, **24**: 319, 1999
- AXALRAD, A.A. - Some hemopoietic negative regulators. **Experimental Hematology**, **18**:143, 1990.
- BAKHTIAR, R. & OCHIARI, E. - Pharmacological applications of inorganic complexes. **General Pharmacology**, **32**: 525, 1999.
- BASTAKI, M.; MISSIRLIS, E.; KLOURAS, N.; KARAKIULAKIS, G.; MARAGOUDAKIS, E.M. - Suppression of angiogenesis by the antitumor agent titanocene dichloride. **European Journal of Pharmacology**, **251**:263, 1994.
- BETZ, M. & FOX, B.S. - Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not Th2 lymphokines. **Journal of Immunology**, **146**: 108, 1991.
- BIRMINGHAM, J. M. & WILKINSON, G. - Bis-cyclopentadienyl compounds of Ti, Zr, V, Nb and Ta. **Journal of American Chemical Society**, **76**: 4.281, 1954.
- BOYLES, J. R.; BAIRD, M .C.; CAMPLING, B. G.; JAIN, N. - Enhanced anti-cancer activities of some derivatives of titanocene dichloride. **Journal of Inorganic Biochemical**, **84**: 159, 2001.
- CALVERT, A. H.; NEWELL, D.R.; TILBY M. J. - **Cisplatin and analogues: discovery, mechanism of action and clinical pharmacology**. Oxford Textbook of Oncology. Pecham, M.,Pinedo, H.M.& Veronesi, U. 552. Oxford University Press, 1995.
- CHOUAIB, S.; ASSELIN-PATUREL, C.; MAMI-CHOUAIB, F.; CAIGNARD, A.; BLAY, Y.B. - The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. **ImmunologyToday**, **18**: 493, 1997.
- CHRISTODOULOU, C. V.; ELIOPOULOS, A. G.; YOUNG, L. S.; HODGKINS, L.; FERRY, D. R.; KERR. - Anti-proliferative activity and mechanism of action of titanocene dichloride. **British Journal of Cancer**, **77**: 2088, 1998.

- CIKES, M; FRIBERG, F.; KLEIN, G: - Progressive loss of H-2 antigen(s) determined by Maloney leukemia virus in culture murine lymphoma. **Journal National Cancer Institute**, **50**: 347,1973.
- CLEARE, M. J.; HYDES, P. C.; HEPBURN, D. R.; MALERBI, B.W. - Antitumor platinum complexes: structure-activity relationships. In: PRESTAYKO, AW; CROOKE, ST; CARTER, SK. **Cisplatin current status and new developments**. New York Academic Press, 149, 1980.
- DEDHAR, S.; GABOURY, L.; GALLOWAY, P.; EAVES, C. - Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is a growth factor on a variety of cell types of non-hematopoietic origin. **Proceedings of National Academy of Science**, **90**: 3539, 1988.
- DREW, J. - **Immunopharmacology: principles and perspectives**. New York, Springer-Verlag, 219, 1990.
- ELGERT, K. D.; ALLEVA, D.G.; MULLINS, D.W. - Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **Journal Leukocyte Biology**, **64**: 275, 1998.
- FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. - Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, **14**: 125, 1990.
- FLEMING, W.H.; ALPEM, E.J.; UCHIDA, N.; IKUDA, K.; SPANGRUDE, G.J.; WEISSMAN I.L. - Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. **Journal of cellular Biology**, **122**: 897, 1993.
- GABRILOVICH, D.; ISHIDA, T.; OYAMA, T.; RAN, S.; KRAVTSOV, V.; NADAF, S.; CARBONE, D.P. - Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages *in vitro*. **Blood**, **11**: 4150, 1998.
- GORDON, M.Y.; RILEY, G.P.; WATT, S.M.; GREAVES, M.F - Compartmentalization of a hematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. **Nature**, **326**: 403, 1978.

- GUEST, I. & UETRECHT J.- Bone marrow stem cell protection from chemotherapy by low-molecular-weight compounds. **Experimental Hematology**, **29**: 123, 2001.
- GUO, M.L.; SUN, H.Z.; McARDLE, H.J.; GAMBLING, L.; SADLER, P.J.- Ti-IV uptake and release by human serum transferrin and recognition of Ti-IV transferrin by cancer cells: Understanding the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride. **Biochemistry** **39**: 10.023, 2000.
- GUPTA, P.; OEGEMA, T.R.; BRAZIL, J.J.; DUDEK, A.Z.; SLUNGAARD, A.; VERFAILLIE, C.M. - Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks in vitro when interleukin-3 and a single chemokine are combined with O-sulfated heparan sulfates: requirement for optimal binding interaction of heparan sulfate with early-acting cytokines and matrix proteins. **Blood**, **95**: 147, 2000.
- HARDING, M. & MOKDSI, G. - Antitumor metalloenes structure activity studies and interactions with biomolecules. **Current Medicine Chemical**, **7**: 1.289, 2000.
- HARDING, M. & MOKDSI, G. - Inhibition of human topoisomerase II by the antitumor metallocenes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, **83**: 205, 2001.
- HARDY, C.L. & BALDUCCI, L. - Review: Hemopoietic alterations in cancer. **American Journal of Medical Science**, **290**: 196, 1985.
- HILKENS, C.M.U.; VERMCULEN, H.; JOST-VAN-NEERVEN, R.J.; SNIJDEWINT, F.M.G.; WIRENGA, E.A.; KAPSENBERG, M.L. - Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. **European Journal of Immunology**, **25**: 59, 1995.
- HUDSON, W.S.; LUZZE, H.; HURST, T.J.; QUIGLEY, M.A.; KYOSIIMIRE, J.; NAMUJU, P.B.; JOHNSON, J.L.; KALEEBU, P.; OKWERA, A.; ELLIOTT, AM. - HIV-1-related pleural tuberculosis: elevated production of interferon-gamma, but failure of immunity to Mycobacterium tuberculosis. **AIDS**, **15**: 467, 2001.

- JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. - Myelopoietic response in tumor-bearing mice by an aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **European Journal of Pharmacology**, **388**: 219, 2000.
- JUSTO, G. Z.; SILVA, M. R.; QUEIROZ, M. L. S. - Effects of a green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, **23**: 119, 2001.
- KEEB, G. & LALA, P. K. - Effect of Ehrlich ascites tumor transplantation in mice on the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies *in vitro*. **European Journal of Cancer**, **14**: 331, 1978.
- KOPF-MAIER, P. - Tumor inhibition by titanocene dichloride: first clues to the mechanism of action. **Naturwissenschaften**, **67**:415, 1980.
- KOPF-MAIER, P. - Complexes of metal other than platinum as antitumor agents. **European Journal Clinical Pharmacology**, **47**: 1, 1994.
- KOPF-MAIER, P. - Antitumor activity of titanocene in xenografted human renal-cell carcinoma. **Anticancer Research**, **19**: 493, 1999.
- KOPF-MAIER, P. & HESSE, A. - An immunologic response to the treatment of Ehrlich ascites tumor. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, **108**: 254, 1984.
- KOPF-MAIER, P. & GERLACH, S. - Pattern of toxicity by titanocene dichloride in mice, **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, **247**: 111, 1986.
- KOPF-MAIER, P. & KOPF, H. - Non platinum group metal antitumor agents: history, current status, and perspectives. **Chemical Review**, **87**: 1137, 1987.
- KOPF-MAIER, P.; WAGNER, W.; KOPF, H. - In vitro growth inhibition by metallocene dichlorides. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, **5**: 237, 1981.
- KOPF-MAIER, P.; PREISS, F.; MARX, T.; KLAPOTKE, T.; KOPF, H. - Tumor inhibition by titanocene complexes: activity against Sarcoma 180. **Anticancer Research**, **6**: 33, 1986.

- KOPF-MAIER, P.; NEUSE, E., KLAPOTKE, T.; KOPF, H. - Ionic titanocene complexes: a new type of antitumor agent. **Cancer Chemotherapy Pharmacology** **24**:23, 1989.
- KRUMBHAAR, E. B. & KRUMBHAAR. H. D. - The Blood and bone marrow in yellow cross gas (mustard gas) poisoning: changes produced in the bone marrow of fatal cases. **Journal Medical Edition Research**, **40**: 497, 1919.
- LEH, F.K.Y & WOLF, W. - Platinum complexes: a new class of agents. **Journal of Pharmacology Science**, **65**: 315, 1976.
- LORD, B.I. & TESTA, N.G. - The hematopoietic system: structure and regulation. In: G Testa, RP Gale (eds): **Hematopoiesis. Long-term effects of Chemotherapy and radiation**. New York, Marcel Dekker, 1988.
- MANTOVANI, A.;BOTAZZI, B.; COLOTTA, F.; SOZZANI, S. E.; RUCO, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunology Today**, **13**:239, 1992.
- METCALF, D. - **The hemopoietic colony stimulating factors**. New York, Elsevier, 1984.
- MIHICH, E. & EHRKE, M.J. - Anticancer drug plus cytokines: Immunomodulation based therapies of mouse tumors. **International Journal of Immunopharmacology**, **22**: 1.077, 2000.
- MILLER, D. - Gene therapy on trial. **Science**, **288**: 951, 2000.
- MILLER, J.S. - The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. **Experimental Hematology**, **29**: 1.157, 2001.
- MISAWA, E.; SAKURAI, T.; YAMADA, M.; HAYASAWA, H.; MOTOYOSHI, K. - Effects of macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 administration on NK1.1+ cells in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, **22**: 967, 2000.
- MROSS, K.; ROBBEN-BATHE, P.; ELDER, L.; BAUMGART, J.; BERDEL, W. E.; FIEBIG, H.; UNGER, C. - Phase I clinical trial of aday-1,-3,-5 every weeks schedule with titanocene dichloride (MKT5) in patients with advanced cancer - A study of phase I study group of the American for Medical Oncology (AIO) of German Cancer Society. **Onkologie**, **33**: 576, 2000.

- OKADA, S.; NAKAUCHI, H.; NAGAYOSHI, K.; NISHIKAWA, S.I.; MIURA, Y.; SUDA, T.- In vivo and in vitro stem cell function of c-kit⁺ and Sca-1⁺ murine hematopoietic cells. **Blood**, **80**: 3044, 1992.
- OSAWA, M.; HANADA, K.I.; HANADA, H.; NAKAUCHI, H. - Long-term lymphopoietic reconstitution by a single CD34⁻ low/negative hematopoietic stem cell. **Science**, **273**:242, 1996.
- OWEN-LYNCH, P.J.; CZAPLEWSKI, L.G; HUNTER, M.G. & WHETTON, A.D.- The growth inhibitory role and potential clinical value of macrophage inflammatory protein 1- α in myeloid leukemias. **Leukocyte and Lymphocytes** **30:41**, 1998.
- PARHAR, R.S. & LALA, P.K.- Prostaglandin E₂-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, **44**: 185, 1988.
- PEREIRA, B. C. A.; KLEIN, S. I.; DIAS, M. L. - Catálise estereoespecífica de estireno por titanocenos alquil substituídos do tipo (RCp)₂ TiCl₂. **Ecletica Química São Paulo**, **25**: 97, 2000.
- PESSINA, A. ; BRAMBILLA, P. ; VILLA, S.; MOCARELLI, P. - CFU-S and CFU-C proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich Ascitic Fluid. **Oncology**, **39**: 391, 1982 a.
- PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; VILLA, S.; MAROCCHI, A.; MOCARELLI, P. - Factors produced by macrophages and tumour cells: Influence on the granulocytic precursor cells (CFU-C) in normal and tumour bearing mice. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, **102**: 235, 1982 b.
- POLONI, A.; LEONI, P.; CURZI, L.; CANTORI, I.; MANZINI, S.; MONTANARI, M.; MASIA, M. C.; OLIVIERI, A. - Ex vivo pharmacological purging of leukapheresis collections with nitrogen mustard: Amifostine pretreatment improves both early and late peripheral blood progenitor cell recovery. **Experimental Hematology**, **27**: 1.548, 1999.

- QUEIROZ, M. L.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R. R.; MULLER, A. H. - Adjuvant effect of *Pluchea quitoc* extract on the resistance of tumor bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, **23**: 215, 20001.
- RAHAL, D.M.; REINSH, E.; OSMOND, D.G. - Changes in the populations of null, NK1.1+, and Thy1¹⁰ lymphocytes in the bone marrow of tumor-bearing mice: effect of indomethacin treatment. **Cellular Immunology**, **139**: 218, 1992.
- ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSCO, J.E.; MANSOUR, V.H. - Platinun compounds: a new class of potent antitumor agents. **Nature** **222**: 385, 1969.
- ROSENBERG, B. - Platinun Coordination complexes in cancer chemotherapy. **Naturwissenschaften**, **60**: 399, 1973.
- RUIZ DE MORALES, J.; VÉLEZ, D.; SUBIZA, J. L. - Ehrlich tumor stimulates extramedular hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Experimental Hematology**, **27**: 1.757, 1999.
- SEGURA, J. A.; BARBERO, L.G.; MÁRQUES, J. - Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Letters**, **414**: 1, 1997.
- SEGURA, J. A., BARBERO, L.G.; MÁRQUES, J. - Ehrlich ascites tumour unbalances splenic populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, **74**: 111, 2000.
- SIKORA, K. – Developing a global strategy for cancer. **European Journal of Cancer**, **35**: 1.870, 2000.
- SPANGRUDE, G.J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I.L. - Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cell. **Science**, **241**:58, 1988.
- STITES, D.P.; ABBA, I.T.; TRISTRAM, G.P. - **Imunologia médica**. 9⁰ ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.

- SUBIZA, J.L.; VINUELA, J.E.; RODRIGUEZ, R.; GIL, J.; FIGUEREDO, M.A.; DE LA CONCHA, E.G. - Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. **International Journal of Cancer**, **44**: 307,1989.
- VALADARES, M. C.; KLEIN, S. I. ZYNGIER, S.; QUEIROZ, M. L. S. - Growth and differentiation of bone marrow hematopoietic cells in mice bearing Ehrlich Ascite Tumor and treated with dyclopentadienildichloratitanium IV. **Internatinal Journal of Immunopharmacology**, **20**:573, 1998.
- VAN DEN ENGH, G.J. & BOL, F. - The presence of CSF activity in the serum of endotoxin treated mice. **Cell Tissue Kinetic**, **82**: 579, 1975.
- WHITNEY, R. B; KELLY, B. S; LEVY, J. G. - Immunosuppression in mice bearing primary tumours. **European Journal of Cancer**, **14**: 699, 1978.
- WILLIAMS, D.A.; RIOS, M.; STEPHENS, C.; PATEL, V.P. - Fibronectin and VLA-4 in hematopoietic stem cell-microenvironment interaction. **Nature**, **352**:438, 1991.
- WILLIAMS, R. D. - Bioinorganic drugs-1. **Education Chemical**, 124, 1974.
- YAMAMOTO, N.; ZOU, J.P.; LI, X.F.; TAKENAKA, H.; NODA, S.; FUJI, T.; ONO, S.; KOBAYASHI, Y.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T. - Regulatory mechanisms for production of INF and TNF by T-cells or macrophages in the tumor –bearing state. **Journal of Immunology**, **154**:2.281, 1995.
- ZAGOZDZON, R. & GOLAB, J. - Immunomodulation by anticancer chemotherapy: more is not always better. **International Journal of Oncology**, **18**: 417, 2001.



APÊNDICES

Tabela 2- Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais tratados com 1, 2 ou 3 injeções de diferentes doses do BCDT (10, 15 e 30 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. * $P < 0,001$ comparado ao controle

Animais	Número de CFU-GM/Fêmur ($\times 10^3$)									
	CTRL	Tratados-10mg/kg			Tratados-15mg/kg			Tratados-30mg/kg		
		1 dose	2 doses	*3doses	1 dose	2 doses	*3doses	1 dose	2 doses	3 doses
1	19,06	19,99	19,37	25,11	18,75	21,23	28,36	18,29	20,46	23,40
2	16,74	17,98	23,09	30,53	20,61	20,77	24,49	18,75	19,53	15,34
3	17,05	18,44	23,71	31,62	22,32	20,46	27,28	19,99	18,29	23,09
4	19,37	18,91	22,69	23,09	17,05	19,68	21,54	19,06	17,98	18,60
5	19,99	18,60	19,22	25,11	17,82	24,64	29,29	17,05	19,84	=19,49
6	16,43	21,23	20,46	29,76	20,30	22,94	23,09	19,06	20,77	==
7	19,68	17,51	21,54	27,43	19,22	20,61	24,18	20,77	21,85	=
Média	18,33	18,95	21,44	27,52	19,43	21,47	25,46	18,99	19,81	19,94
D.P.M.	1,52	1,27	1,80	3,21	1,79	1,71	2,88	1,18	1,36	3,89

CTRL = Controle

= morte de animal

Tabela 3- Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais inoculados com o TAE (6×10^6 cel/ml) e tratados com 1, 2 ou 3 injeções, uma por dia, de diferentes doses do BCDT (10, 15 ou 30 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. * $P < 0,001$ comparado ao TAE; # $P < 0,05$ comparado ao controle

Animais	Número de CFU-GM/Fêmur ($\times 10^3$)										
	CTRL	TAE	*TAE+10mg/kg			*TAE+15mg/kg			TAE+30mg/kg		
			1dose	2doses	3doses	1dose	2doses	3doses	*1dose	*2doses	#3doses
1	20,77	8,97	14,08	22,40	20,48	13,60	20,16	16,32	20,80	24,00	14,24
2	15,96	7,70	20,0	17,12	22,88	18,56	22,56	14,72	17,76	16,00	13,12
3	18,29	10,35	12,80	17,60	20,64	25,44	14,88	15,84	19,36	13,28	14,88
4	19,84	6,90	17,28	19,30	18,56	18,44	16,64	21,12	17,60	14,24	17,20
5	21,08	7,70	16,16	14,08	20,16	19,20	19,04	16,48	12,64	18,40	14,99=
6	16,12	9,08	16,80	15,04	21,12	18,88	20,64	24,16	20,32	20,00	=15,87
7	18,75	8,28	16,32	17,76	20,32	18,72	20,32	17,12	15,36	15,84	=
Média	18,68	8,42	16,20	17,62	20,59	18,97	18,89	17,97	17,69	17,38	14,83
D.P.M.	2,06	1,14	2,31	2,74	1,28	3,44	2,26	3,38	2,89	3,71	1,69

CTRL= Controle

= morte de animal

Tabela 4- Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais normais tratados com 1, 2 ou 3 injeções de diferentes doses do BCDT (10, 15 e 30 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. * $P < 0,001$ comparado ao controle

		Número de CFU-GM/Baço ($\times 10^2$)								
		Tratados-10mg/kg			Tratados-15mg/kg			Tratados-30mg/kg		
Animais	CTRL	1 dose	2 doses	3 doses	1 dose	2 doses	3 doses	1 dose	*2doses	*3doses
1	9,00	14,75	8,85	5,90	14,75	12,82	12,2	14,75	38,25	47,20
2	9,00	8,85	14,75	8,85	17,70	14,64	21,2	23,60	41,30	53,10
3	12,00	8,85	8,85	11,80	8,85	18,21	18,02	5,90	35,40	50,15
4	18,00	17,70	20,65	8,85	17,70	16,20	17,02	5,90	26,55	44,25
5	15,00	14,75	11,80	5,90	8,85	17,15	17,65	20,65	38,35	=42,7
6	12,00	17,70	29,50	23,60	8,85	14,24	13,40	8,85	23,60	==
7	12,00	14,75	23,60	20,65	14,75	19,20	20,50	26,55	44,25	=
Média	12,42	13,90	16,85	12,22	13,06	16,06	17,13	15,17	35,38	48,67
D.P.M.	3,02	3,69	7,93	7,11	4,12	3,9	5,1	8,58	7,61	3,80

Tabela 5- Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais inoculados com o TAE (6×10^6 cel/ml) e tratados com 1, 2 ou 3 injeções, uma por dia, de diferentes doses do BCDT (10, 15 e 30 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos-controle receberam somente o diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. * $P < 0,001$ comparado ao controle; # $P < 0,001$ comparado com o TAE

Animais	Número de CFU-GM/Baço ($\times 10^2$)										
	CTRL	*TAE	#TAE+10mg/kg			*#TAE+15mg/kg			*#TAE+30mg/kg		
			1dose	2doses	3doses	1dose	2doses	3doses	1dose	2doses	3doses
1	9,00	109,20	36,60	24,40	15,25	30,50	24,40	24,40	30,50	54,90	67,10
2	9,00	78,00	15,25	30,50	21,35	33,55	36,60	36,60	39,65	39,65	57,95
3	12,00	66,30	18,30	33,55	12,20	48,80	21,35	57,95	48,80	79,30	51,85
4	18,00	113,10	48,80	36,60	33,55	39,65	45,75	48,80	39,65	64,05	54,90
5	15,00	93,60	36,60	18,30	39,65	51,85	51,85	42,70	42,70	57,95	48,80
6	12,00	124,80	30,50	24,40	27,45	24,40	30,50	51,85	36,60	45,75	76,25
7	12,00	97,50	27,45	12,20	12,25	27,45	39,65	30,50	57,95	33,55	42,70
Média	11,14	97,50	30,50	27,13	23,09	36,60	35,72	41,97	46,55	53,59	58,02
D.P.M.	4,48	20,39	11,54	7,1	10,81	10,56	11,09	12,13	13,46	15,53	11,13

Tabela 6- Avaliação de sobrevida de animais inoculados com TAE (6×10^6 cels/ml) e tratados com 1, 2 ou 3 doses de 10 mg/kg/dia de BCDT. Os tratamentos com o BCDT iniciaram-se 24 h após a inoculação das células tumorais (n=20 por grupo). $P < 0,05$; Teste Cox-Mantel

<i>SOBREVIDA</i>				
Dias	*CTRL	1 dose	2 doses	3 doses
12 ^o		1		
13 ^o	2	1	1	
14 ^o	2	1		
15 ^o	2	1	3	
16 ^o	2			
17 ^o	3		1	
18 ^o	2	2	2	
19 ^o	5			2
20 ^o	2			
21 ^o				
22 ^o		2	5	3
23 ^o				
24 ^o		1		1
25 ^o		3		2
26 ^o		1		
27 ^o				
28 ^o		2	2	
29 ^o		2	1	1
30 ^o		3	2	
31 ^o				4
32 ^o				
33 ^o				
34 ^o			1	
35 ^o				3
36 ^o				
37 ^o			2	2
38 ^o				
39 ^o				1
40 ^o				
41 ^o				1

*CTRL: animais portadores do TAE (6×10^6 cel/ml) que não receberam tratamento.

Tabela 7- Avaliação de sobrevida de animais inoculados com TAE (6×10^6 cels/ml) e tratados com 1, 2 ou 3 doses de 15 mg/kg/dia de BCDT. Os tratamentos com o BCDT iniciaram-se 24 h após a inoculação das células tumorais (n=20 por grupo). $P < 0,05$; Teste Cox-Mantel

<i>SOBREVIDA</i>				
Dias	*CTRL	1 dose	2 doses	3 doses
10 ^o				
11 ^o			1	
12 ^o				1
13 ^o	2		1	1
14 ^o	2	1		
15 ^o	2	1		2
16 ^o	2		1	1
17 ^o	3			2
18 ^o	2	3	1	
19 ^o	5			1
20 ^o	2	2	3	3
21 ^o		1	1	
22 ^o		3		1
23 ^o			1	2
24 ^o		2	2	
25 ^o			5	
26 ^o		2		
27 ^o				1
28 ^o		1		
29 ^o		1		2
30 ^o		1		
31 ^o		1	2	
32 ^o				
33 ^o			1	
34 ^o		1	1	
35 ^o				1
36 ^o				
37 ^o				1
38 ^o				1

*CTRL: animais portadores do TAE (6×10^6 cel/ml) que não receberam tratamento.

Tabela 8- Avaliação de sobrevida de animais inoculados com TAE (6×10^6 cels/ml) e tratados com 1, 2 ou 3 doses de 30 mg/kg/dia de BCDT. Os tratamentos com o BCDT iniciaram-se 24 h após a inoculação das células tumorais (n=20 por grupo). $P < 0,05$; Teste Cox-Mantel

<i>SOBREVIDA</i>				
Dias	*CTRL	1 dose	2 doses	3 doses
6 ^o			1	2
7 ^o			5	2
8 ^o				2
9 ^o				3
10 ^o			4	
11 ^o				1
12 ^o			3	
13 ^o	2		1	2
14 ^o	2			1
15 ^o	2		1	
16 ^o	2			3
17 ^o	3			
18 ^o	2	2	1	2
19 ^o	5	2		2
20 ^o	2	1	4	
21 ^o		1		
22 ^o				
23 ^o		3		
24 ^o		1		
25 ^o		2		
26 ^o		1		
27 ^o		2		
28 ^o				
29 ^o		2		
30 ^o				
31 ^o		2		
32 ^o				
33 ^o		1		
34 ^o				
35 ^o				
36 ^o				
37 ^o				

*CTRL: animais portadores do TAE (6×10^6 cel/ml) que não receberam tratamento.

Tabela 9- Efeito do soro de animais tratados com BCDT (3 x 10mg/kg) e do BCDT, em diferentes concentrações, diretamente sobre a cultura de células progenitoras da medula óssea de animais normais. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de quatro animais por grupo. ANOVA, Teste Tukey [#] $P < 0,005$ comparado ao grupo que não recebeu tratamento

<i>Estímulo</i>	Unidades de CSF/ml
Soro/tratado 1:1*#	8,5 \pm 1
Soro/tratado 1:2*#	5,5 \pm ,3
Não Tratado [•]	2,5 \pm 1
BCDT (0,3mg/placa)	1,5 \pm 0,2
BCDT (0,2mg/placa)	1,5 \pm 0,8
BCDT (0,1mg/placa)	2,1 \pm 1
BCDT (0,05mg/placa)	1,5 \pm 0,4
BCDT (0,025mg/placa)	2,0 \pm 1
Controle [†]	1,5 \pm 1

SCM-meio condicionado de células do baço.

*Soro de animal tratado na diluição de 1:1 e 1:2, respectivamente.

[•]Soro de animal que não recebeu tratamento.

[†]Controle recebeu somente o solvente da droga.

Tabela 10- Alterações na contagem da população de células da medula óssea de animais inoculados com o TAE e tratados com 10 mg/Kg/dia de BCDT por 3 dias. ANOVA, Teste Tukey * $P < 0,05$ comparado ao controle

Grupos	Celularidade da medula óssea ($\times 10^6$)				
	Total cel./fêmur	Linfoblastos	Mieloblastos	Promielócitos + Mielócitos	Metamielócitos + Neutrófilos
Controle					
1	15,0	5,4	1,9	1,1	6,4
2	16,5	6,2	1,8	0,8	7,4
3	17,5	6,3	1,4	0,9	8,9
4	13,0	5,0	1,0	1,1	5,9
5	14,5	5,2	1,9	1,6	5,8
6	16,0	5,7	1,7	1,3	7,3
Média	15,4	5,6	1,6	1,1	6,9
D.P.M.	1,5	0,5	0,3	0,2	1,1
BCDT					
1	14,5	4,5	1,1	0,8	7,9
2	16,5	5,1	1,2	0,9	9,0
3	15,5	3,9	1,0	0,5	9,9
4	13,5	4,9	1,2	0,9	6,3
5	17,0	6,4	1,5	0,8	8,1
6	16,0	5,0	1,2	0,9	8,7
Média	15,5	4,9	1,2	0,8	8,3
D.P.M.	1,3	0,8	0,1	0,1	1,2
TAE					
1	10,0	3,1	1,0	0,6	5,2
2	12,5	3,8	1,3	0,7	6,2
3	9,5	2,9	0,9	0,6	4,9
4	11,0	3,4	1,1	0,7	5,7
5	10,5	3,2	1,1	0,6	5,4
6	9,0	2,7	0,9	0,5	4,6
Média	10,4*	3,1*	1,0*	0,6*	5,3
D.P.M.	1,2	3,1	0,1	0,07	0,5
TAE+BCDT					
1	12,5	4,2	0,6	0,9	6,2
2	13,0	3,2	1,0	0,9	7,8
3	15,5	3,7	0,9	1,0	9,9
4	14,5	4,9	1,4	0,9	7,2
5	13,5	3,9	1,0	1,2	7,1
6	16,0	5,4	0,8	1,2	8,0
Média	14,1	4,2	0,9	1,0	7,7
D.P.M.	1,4	0,8	0,2	0,1	1,2

Tabela 11- Atividade das células “natural killer” em diferentes razões de célula efetora/célula-alvo (YAC-1), em animais portadores do TAE, somente tratados com 2 doses de DDCT 15 mg/kg e portadores/tratados. Os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. ANOVA, Teste Tukey **P* < 0,001 comparado ao controle. #*P* < 0,05 comparado ao TAE

Célula-alvo/ Efetora		Especificidade de Lise de NK (%)								
		Dia 1			Dia 5			Dia 10		
		*TAE	DDCT	#DDCT	*TAE	DDCT	#DDCT	*TAE	DDCT	#DDCT
		CTRL	+		+		+			
	TAE	TAE	TAE	TAE	TAE	TAE	TAE	TAE	TAE	
1:50	22,3	16,0	28,3	36,2	12,0	18,4	16,2	4,2	21,0	14,0
1:25	13,7	6,0	24,3	13,3	9,0	9,5	11,2	3,2	16,9	8,2
1:12,5	7,5	2,3	16,2	9,2	3,9	7,2	9,0	2,3	7,4	3,2
1:6,25	1,4	1,5	12,6	2,7	1,9	4,5	4,5	1,1	4,9	1,3
1:50	19,3	16,1	31,4	27,8	11,0	20,7	24,5	6,1	27,0	24,5
1:25	13,7	9,4	19,3	21,7	8,2	15,8	13,4	4,0	12,3	16,0
1:12,5	6,2	4,1	15,3	12,8	4,5	10,4	7,2	2,3	6,6	7,4
1:6,25	1,2	2,3	8,1	7,1	2,1	4,1	3,2	0,7	3,9	4,5
1:50	30,0	12,4	22,4	21,9	10,0	20,0	17,0	3,5	18,7	25,0
1:25	16,6	9,4	15,6	17,1	6,1	11,0	11,2	2,0	16,6	11,0
1:12,5	9,2	2,4	0,9	13,3	4,1	7,2	7,0	1,7	12,5	8,0
1:6,25	2,4	2,1	0,2	7,1	0,9	3,0	2,1	0,6	4,4	2,2
1:50	23,5	15,4	23,3	32,3	14,0	25,0	19,0	4,3	20,3	22,4
1:25	14,8	9,3	15,5	25,0	9,0	12,5	10,1	3,5	18,1	11,4
1:12,5	7,9	3,8	11,5	17,7	3,2	8,7	6,1	2,1	10,2	9,2
1:6,25	2,3	1,1	1,9	12,3	0,8	5,0	4,2	1,3	4,1	6,2
1:50	19,9	14,7	25,2	19,0	10,0	18,0	16,0	6,0	24,0	18,1
1:25	11,4	8,7	13,1	12,1	4,8	12,2	9,7	3,0	15,1	12,2
1:12,5	4,5	4,5	7,6	10,6	2,0	5,2	5,2	1,8	8,2	7,7
1:6,25	1,7	2,9	3,5	6,4	1,5	3,1	1,8	0,5	4,5	4,2
1:50	20,3	15,4	17,0	20,7	12,0	29,0	16,8	3,0	21,8	17,0
1:25	18,2	8,3	11,8	6,4	6,9	13,7	9,2	1,9	14,5	8,0
1:12,5	9,4	5,2	9,7	0,9	4,8	9,0	3,9	0,9	8,1	4,1
1:6,25	2,5	1,3	1,1	0,2	0,2	4,1	1,2	0,6	3,1	2,0
1:50	19,9	16,0	36,0	39,0	11,8	25,0	22,1	5,1	23,0	15,9
1:25	10,5	9,7	22,2	19,0	5,2	12,8	14,5	3,2	18,0	7,9
1:12,5	8,5	4,5	17,1	18,0	3,7	6,0	8,2	1,8	6,9	4,7
1:6,25	4,2	1,2	6,3	11,5	1,4	3,5	3,2	0,9	2,8	0,9
1:50	27,4	15,0	26,3	29,0	10,2	26,8	18,7	4,9	27,9	21,4
1:25	15,2	12,2	16,4	16,4	5,4	10,3	8,9	2,8	10,5	9,0
1:12,5	7,9	6,2	9,0	9,0	3,1	6,8	4,9	1,9	6,1	5,2
1:6,25	3,2	2,5	4,0	4,0	0,9	2,1	2,4	0,7	2,2	3,1
X 1:50	238±40	151±12	262±58	282±7,3	113±13	228±41	187±30	46±1,1	229±32	197±40
X 1:25	142±25	91±17	172±43	167±5,1	68±1,7	122±20	122±20	32±0,9	152±27	104±2,7
X 1:12,5	74±2,6	41±1,3	111±4,8	119±4,4	36±0,8	75±1,7	64±1,7	18±0,4	82±2,1	61±2,1
X 1:6,25	18±1,0	18±0,6	47±4,1	65±3,9	12±0,6	36±0,9	28±1,5	08±0,2	37±0,9	30±1,8

Tabela 12- Atividade de células “natural killer”, em diferentes razões de célula efetora/célula-alvo (YAC-1), em animais portadores do TAE somente tratados com 2 doses de BCDT 10 mg/kg e portadores/tratados. Os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. ANOVA, Teste Tukey **P* < 0,001 comparado ao controle; #*P* < 0,05 comparado ao TAE

Célula-alvo/ Efetora		Especificidade de Lise de NK (%)									
		CTRL	Dia 1			Dia 5			Dia 10		
			*TAE	BCDT	BCDT + TAE	*TAE	BCDT	*#BCDT + TAE	*TAE	BCDT	*#BCDT + TAE
1:50	29,3	15,0	29,6	19,5	11,8	25,4	19,0	3,2	29,6	12,8	
1:25	13,2	7,0	8,6	5,2	9,3	18,3	15,9	2,2	21,8	5,4	
1:12,5	6,0	2,3	5,2	4,1	2,7	10,1	5,1	1,3	13,5	2,1	
1:6,25	1,7	1,7	3,1	2,1	0,9	4,9	2,2	0,4	7,8	0,8	
1:50	20,0	13,1	24,8	25,0	10,0	23,0	20,0	5,1	18,3	10,4	
1:25	14,3	7,4	11,1	18,1	7,2	15,5	15,0	4,0	11,9	6,8	
1:12,5	5,1	4,4	4,7	9,2	3,9	8,2	11,0	2,2	7,7	3,2	
1:6,25	1,9	2,1	2,1	4,2	0,9	2,1	5,0	0,6	1,9	0,5	
1:50	31,0	12,5	23,5	18,9	9,9	19,8	13,5	4,5	23,0	8,8	
1:25	18,6	5,3	15,0	6,8	7,1	12,0	11,0	1,7	12,7	4,6	
1:12,5	9,0	3,4	12,7	2,3	4,9	7,1	2,8	1,0	6,2	3,1	
1:6,25	3,2	1,0	8,1	0,6	1,2	4,2	0,7	0,6	4,2	0,9	
1:50	23,0	11,4	30,9	22,0	13,0	21,0	19,0	2,3	31,3	16,9	
1:25	14,7	7,6	13,2	9,3	8,0	18,0	10,0	1,5	23,8	9,2	
1:12,5	6,0	4,6	5,9	3,2	2,2	11,9	6,9	1,1	14,6	5,1	
1:6,25	1,6	0,9	3,1	0,9	1,8	3,5	2,1	0,3	8,2	1,4	
1:50	29,8	14,7	23,5	18,2	10,9	24,2	18,5	4,0	21,8	12,4	
1:25	16,9	9,1	13,7	8,9	4,1	17,8	9,5	2,9	13,3	7,1	
1:12,5	9,0	4,3	5,4	3,4	2,7	11,0	6,3	1,8	4,9	4,2	
1:6,25	3,8	2,4	1,8	1,8	1,9	4,2	2,8	0,5	2,1	0,9	
1:50	17,6	14,9	30,2	18,0	11,0	21,9	14,8	3,4	19,2	9,8	
1:25	11,1	8,2	13,6	7,8	6,2	18,2	12,2	1,9	8,5	6,2	
1:12,5	3,0	5,3	5,7	2,3	3,8	7,3	9,5	0,8	4,2	3,9	
1:6,25	1,2	1,4	2,5	1,3	2,2	3,3	4,1	0,5	3,1	1,2	
1:50	20,4	13,0	28,6	19,2	11,0	29,8	10,1	4,1	27,8	14,5	
1:25	15,2	7,2	19,7	6,6	5,2	18,2	6,2	2,2	16,5	7,9	
1:12,5	6,2	4,1	12,4	4,1	3,7	10,2	4,3	1,7	9,2	4,3	
1:6,25	3,4	1,3	6,5	1,8	1,4	4,2	0,9	0,8	3,1	1,4	
1:50	26,9	15,8	19,9	19,6	10,2	20,7	15,4	4,3	26,1	13,1	
1:25	14,5	11,2	11,5	11,0	5,4	13,1	7,1	2,9	17,4	9,8	
1:12,5	13,0	6,5	6,3	3,7	3,1	8,3	3,9	1,3	9,8	5,2	
1:6,25	2,3	2,2	1,6	1,3	0,9	4,1	1,2	0,8	3,2	3,0	
1:50	X̄	247±38	138±15	263±39	200±23	109±10	226±20	162±34	38±08	246±48	123±26
1:25	X̄	148±19	78±17	133±32	95±38	65±16	163±25	108±34	24±08	157±51	71±17
1:12,5	X̄	71±14	43±12	79±35	40±22	33±08	98±21	59±30	14±04	87±38	38±10
1:6,25	X̄	23±09	16±05	36±23	17±11	14±05	38±08	23±15	06±02	42±24	12±07

Tabela 13- Concentração de IL-2 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados com 15mg/kg de DDCT por 2 dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o fim do tratamento. Os resultados representam a média ± D.P.M. de 8 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon **P* < 0,05 comparado ao controle; #*P* < 0,05 comparado ao TAE

	IL-2 (pg/ml)							
	Controle		Dia 1		Dia 5		Dia 10	
	NT	DDCT*	TAE	TAE+	TAE*	TAE+	TAE*	TAE+
			DDCT*#		DDCT#		DDCT#	
1	90,5	243,5	89,2	339,2	108,0	176,3	42,3	149,1
2	150,1	428,2	120,2	212,5	105,3	184,2	56,9	184,2
3	110,3	196,4	177,0	268,2	31,8	173,4	99,3	115,6
4	198,0	327,0	96,3	342,1	45,4	159,6	35,3	106,4
5	89,6	213,4	195,2	219,2	59,2	273,8	67,6	79,6
6	201,2	325,2	128,6	268,4	63,2	109,5	59,2	82,6
7	131,3	320,1	104,0	178,4	76,3	240,6	48,8	88,7
8	121,3	178,3	132,0	290,2	85,4	122,2	30,2	170,5
X	136,5	282,3	130,3	264,7	71,8	179,9	54,9	122,0
D.P.M.	43,7	87,8	37,8	59,1	27,1	55,1	21,8	40,,8

NT= não-tratados

Tabela 14- Concentração de IFN- γ (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados com 15 mg/kg de DDCT por 2 dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 8 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $P < 0,05$ comparado aos demais grupos; # $P < 0,05$ comparado ao TAE

	IFN- γ (pg/ml)							
	Controle		Dia 1		Dia 5		Dia 10	
	NT	DDCT	TAE*	TAE+	TAE	TAE+	TAE*	TAE+
			DDCT #		DDCT		DDCT#	
1	1142,5	41112,5	8911,5	1765,2	1995,2	3122,0	324,4	3067,5
2	1340,3	1834,2	9539,5	2066,0	782,3	1465,2	327,8	1963,2
3	2919,5	4492,2	7435,8	1981,0	1052,2	1759,8	592,8	2158,2
4	1114,2	2973,2	9988,1	1857,2	758,2	1195,2	405,3	1182,2
5	1256,2	2195,3	6468,2	1775,7	769,5	2213,5	546,3	1583,2
6	1981,7	2821,2	7895,6	1195,2	1546,2	1657,2	837,2	859,2
7	1245,3	3572,1	9782,3	1614,7	986,2	1832,2	402,3	1394,1
8	1987,2	1956,3	8652,3	2213,9	869,5	2213,9	628,2	2783,4
X	1623,3	2119,6	8584,1	1803,6	1094,9	1932,3	496,0	1873,8
D.P.M.	631,2	631,3	1236,4	311,5	446,5	591,6	177,0	771,2

NT= não-tratados

Tabela 15- Concentração de IL-10 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados com 15 mg/kg de DDCT por 2 dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média ± D.P.M. de 8 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon **P* < 0,05 comparado ao controle; #*P* < 0,05 comparado ao TAE

	IL-10 (pg/ml)							
	Controle		Dia 1		Dia 5		Dia 10	
	NT	DDCT	TAE	TAE+	TAE*	TAE+	TAE*	TAE+
			DDCT		DDCT [#]		DDCT [#]	
1	276	312	321	376	370	349	417	373
2	294	295	316	342	432	373	554	383
3	258	223	295	328	397	393	449	364
4	223	269	278	274	361	304	463	373
5	305	295	261	249	338	372	459	321
6	329	321	293	233	472	285	398	294
7	291	318	283	264	426	270	427	306
8	273	254	319	302	396	251	317	374
X	281,1	285,8	295,7	296,0	399,0	324,6	435,0	349,7
D.P.M.	31,0	34,5	21,6	49,6	43,3	23,2	66,0	48,5

NT= não-tratados

Tabela 16- Concentração de IL-4 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados com 15 mg/kg de DDCT por 2 dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média ± D.P.M. de 8 animais

	IL-4 (pg/ml)							
	Controle		Dia 1		Dia 5		Dia 10	
	NT*	DDCT	TAE	TAE+	TAE	TAE+	TAE	TAE+
				DDCT		DDCT		DDCT
1	89	95	72	84	94	73	91	88
2	72	61	79	63	74	61	57	86
3	52	83	82	72	46	70	80	54
4	61	85	89	69	69	59	73	49
5	49	72	68	59	73	53	52	73
6	75	61	96	48	69	85	76	68
7	67	41	64	66	86	74	86	45
8	82	86	52	90	82	96	55	89
X	68,3	73,0	75,2	68,8	74,1	71,3	71,0	69,0
D.P.M.	13,0	17,7	14,1	13,4	14,3	14,1	14,8	18,0

NT*= não-tratados

Tabela 17- Concentração de IL-2 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados com 10mg/kg de BCDT por 3 dias. Os tratamentos iniciaram 24h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o fim do tratamento. Os resultados representam a média ± D.P.M. de 8 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon **P* < 0,05 comparado ao controle; #*P* < 0,05 comparado ao TAE

	IL-2(pg/ml)							
	Controle		Dia 1		Dia 5		Dia 10	
	NT	BCDT	TAE	TAE+	TAE*	TAE+	TAE*	TAE+
			BCDT		BCDT		BCDT*	
1	90,5	124,2	125,4	126,0	102,4	93,1	34,2	68,2
2	150,1	159,3	131,6	95,8	45,6	70,4	49,2	104,6
3	110,3	204,9	102,9	104,2	89,2	108,2	87,2	56,8
4	198,0	261,2	82,2	163,0	54,3	153,1	48,5	73,2
5	89,6	139,0	187,2	197,1	60,2	65,3	54,2	81,4
6	201,2	186,4	131,4	108,2	49,1	99,2	45,2	63,2
7	131,3	193,4	99,2	149,1	39,4	112,0	43,2	50,3
8	121,3	248,5	130,2	171,5	86,6	81,0	31,2	
X	136,0	189,5	123,7	139,3	65,87	97,7	49,11	73,6
D.P.M.	43,7	48,0	31,5	36,0	23,5	27,0	17,19	18,1

NT= não-tratados

Tabela 18- Concentração de IFN- γ (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados com 10 mg/kg de BCDT por 3 dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após a inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média \pm D.P.M. de 8 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon * $P < 0,05$ comparado ao controle; # $P < 0,05$ comparado ao TAE

	IFN- γ (pg/ml)							
	Controle		Dia 1		Dia 5		Dia 10	
	NT	BCDT	TAE*	TAE+ BCDT [#]	TAE	TAE+ BCDT	TAE*	TAE+ BCDT*
1	1142,5	1150,2	8152,4	1021,0	1091,4	1245,3	508,7	887,9
2	1340,3	1451,1	8927,2	1596,2	1042,4	1546,8	432,1	654,3
3	2919,5	1201,1	5549,2	1892,6	1054,2	1483,9	424,3	956,9
4	1114,2	1090,4	9289,2	3261,0	857,5	1398,2	387,0	870,2
5	1256,2	1603,6	8254,8	3983,8	853,2	2645,0	395,0	769,4
6	1981,7	2324,7	9152,5	4567,0	1435,2	986,3	459,0	895,6
7	1245,3	1862,1	7589,0	1698,0	752,8	976,0	854,2	689,3
8	1987,2	2080,8	8545,2	1809,9	734,1	1342,0	425,0	865,9
X	1623,3	1595,4	8182,2	2478,7	977,2	1452,9	485,5	823,6
D.P.M.	631,2	457,8	1203,7	128,0	230,6	525,9	153,5	177,3

NT= não-tratados

Tabela 19- Concentração de IL-10 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados com 10 mg/kg de BCDT por 3 dias. Os tratamentos iniciaram 24h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média ± D.P.M. de 8 animais. Kruskal-Wallis, Teste de Wilcoxon **P* < 0,05 comparado ao controle; #*P* < 0,05 comparado ao TAE

	IL-10 (pg/ml)							
	Controle		Dia 1		Dia 5		Dia 10	
	NT	BCDT	TAE	TAE+	TAE*	TAE+	TAE*	TAE+
			BCDT		BCDT [#]		BCDT [#]	
1	276	257,4	243,1	237,4	370,5	399,0	420,7	354,0
2	294	207,0	210,2	297,0	395,2	303,1	413,8	398,9
3	258	189,6	195,2	161,0	299,2	290,8	459,8	273,0
4	223	323,2	247,2	343,2	392,4	357,8	387,2	378,9
5	305	199,2	189,2	299,2	357,2	251,0	469,4	358,9
6	329	214,8	212,4	154,0	402,5	308,3	403,4	407,9
7	291	226,0	219,8	246,9	389,2	347,9	479,2	368,9
8	273	283,9	295,3	353,0	399,3	342,0	570,2	289,1
X	281,1	237,4	226,2	261,4	375,3	324,9	450,0	353,3
D.P.M.	31,9	46,6	34,4	75,6	34,4	45,0	58,71	48,5

NT= não-tratados

Tabela 20- Concentração de IL-4 (pg/ml) determinada no sobrenadante de células esplênicas provenientes de animais inoculados com o TAE e tratados com 10 mg/kg de BCDT por 3 dias. Os tratamentos iniciaram 24 h após inoculação e os animais foram sacrificados no 1^o, 5^o e 10^o dias após o término do tratamento. Os resultados representam a média ± D.P.M. de 8 animais

	IL-4(pg/ml)							
	Controle		Dia 1		Dia 5		Dia 10	
	NT	BCDT	TAE	TAE+	TAE	TAE+	TAE	TAE+
			BCDT		BCDT		BCDT	
1	89,0	78,2	74,8	76,3	65,2	70,9	73,2	72,0
2	72,1	93,4	69,8	87,0	74,1	76,0	84,5	79,9
3	52,1	62,9	52,1	65,0	59,2	88,9	51,9	99,2
4	61,3	67,8	61,2	62,9	81,4	59,4	49,3	85,9
5	49,2	59,5	71,3	58,9	73,9	68,9	67,9	67,8
6	75,7	69,3	73,1	87,3	70,8	83,6	81,3	58,2
7	67,0	73,1	52,4	82,0	80,4	68,3	61,4	63,9
8	82,4	80,4	78,2	77,9	60,2	60,9	63,4	77,0
X	68,3	73,0	66,2	74,6	70,2	69,6	66,1	75,4
D.P.M.	13,8	10,8	10,0	11,0	8,3	13,3	12,0	13,1

NT= não-tratados