

Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
**Mestrado**

**CARACTERIZAÇÃO DE MODELO DE  
IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES OU NÃO DE TUMOR DE  
EHRlich**

PAULA SIBELLY VERAS ALBUQUERQUE

São Luís

2019

PAULA SIBELLY VERAS ALBUQUERQUE

**CARACTERIZAÇÃO DE MODELO DE  
IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES OU NÃO DE TUMOR DE  
EHRlich**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis

São Luís

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Albuquerque, Paula Sibelly Veras.

Caracterização de modelo de imunossupressão com ciclofosfamida em camundongos portadores de tumor de Ehrlich / Paula Sibelly Veras Albuquerque. - 2019.

74 f.

Coorientador(a): Aramys Silva dos Reis.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Câncer. 2. Quimioterápico. 3. Sistema Imune. 4. Tumor Sólido. I. Nascimento, Flávia Raquel Fernandes do. II. Reis, Aramys Silva dos. III. Título.

PAULA SIBELLY VERAS ALBUQUERQUE

**CARACTERIZAÇÃO DE MODELO DE  
IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES OU NÃO DE TUMOR DE  
EHRlich**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ por:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento  
Universidade Federal do Maranhão  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis  
Universidade Federal do Maranhão  
(Coorientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Falcai  
Universidade Ceuma  
(Examinadora)

---

Prof. Dr. Plínio da Cunha Leal  
Universidade Federal do Maranhão  
(Examinador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos  
Universidade Federal do Maranhão  
(Examinador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucilene Amorim Silva  
Universidade Federal do Maranhão  
(Suplente)

“Não são os grandes homens que transformam o mundo, mas sim os fracos e pequenos nas mãos de um grande Deus.”

Hudson Taylor

Dedico este trabalho à minha querida orientadora  
Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças em todos os momentos. A Ti tudo que sou.

À minha querida orientadora Flávia Raquel, a quem dedico esta dissertação. “Profs”, não consigo descrever o que é ter sua orientação, o que é desfrutar da sua sabedoria, da honra de tê-la na bancada no meu experimento, de contemplar o dom que desempenha com tanto zelo: o de ensinar. Além disso, de ter sua amizade. Obrigada pela força dispensada “extramestrado”, não teria conseguido sem você!

Ao meu coorientador Aramys, pela atenção, pela disponibilidade. Pelo conhecimento compartilhado de forma tão doce e tão profunda.

Ao meu irmão gêmeo João Gustavo. Juntos fizemos experimentos, demos risadas, compartilhamos lágrimas, e sei que uma amizade verdadeira ficou, para sempre.

Ao meu irmão mais velho Johnny, pela disponibilidade, pelo tempo, pela dedicação. Como foi maravilhoso estar contigo na construção deste trabalho, companhia mais que especial, necessária.

À Prof<sup>a</sup> Rosane pelos ensinamentos e pelas considerações sempre oportunas.

À Prof<sup>a</sup> Thiare pela atenção, por se disponibilizar no planejamento e execução dos experimentos.

À Prof<sup>a</sup> Lucilene pela ajuda nas análises e pelo carinho sempre dispensado.

À Prof<sup>a</sup> Ana Paula por sempre estar disposta a ajudar e pelo auxílio e sugestões na qualificação.

Ao Prof. Paulo Vitor pela disponibilidade e pelas sugestões na qualificação.

Aos queridos “lifianos”: Carol, André, Jefferson, Eder, Douglas, Lilian, Emanuel, Jaianna, Sulayne, Jaqueline, Liana, Luana, Mirtes, Alex, Andressa, Luzimar, Patricia, pela ajuda tão necessária, e de forma tão solícita. Vocês são a melhor equipe!

À Dona Joana e Soninha, obrigada meus amores pelo carinho.

Aos queridos Tassio e Irla, obrigada por tudo, vocês são “minhas pessoas”.

À Fátima e Ana, por serem sempre tão solícitas. Obrigada minhas florezinhas.

À minha família, Mário e Sueli (pais), e meu marido João, esse trabalho também só foi possível pelo seu apoio. Amo vocês.

À FAPEMA pelo financiamento.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na elaboração deste trabalho.

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ALDH	aldeído desidrogenase
APC	célula apresentadora de antígeno
Bregs	linfócitos B reguladores
CICLO	ciclofosfamida
DHR	Dihidrorodamina
FASL	Ligante FAS
GTS	glutaciona S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
MESNA	sulfaniletanossulfonato de sódio 2
MHC	complexo de histocompatibilidade maior
NK	células <i>natural killers</i>
NM	não marcado
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
PD1	Proteína de morte programada 1
PDL1	Ligante PD1
PMA	phorbol-12- miristato-13- acetato
RNS	espécies reativas de nitrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio
TCR	receptor de célula T
TEA	tumor de Ehrlich ascítico
TES	tumor de Ehrlich sólido
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Estrutura molecular da ciclofosfamida .....	17
Figura 2. Metabolismo da ciclofosfamida: bioativação e processos de inativação .....	20
Figura 3. Mecanismo celular da mostarda fosforamida: alquilação no DNA .....	21
Figura 4. As três fases da imunoedição: eliminação, equilíbrio e escape .....	25
Figura 5. Esquema da distribuição dos grupos de animais .....	32
Figura 6. Delineamento experimental.....	33
Figura 7. Estratégia de análise para identificação de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos do baço dos animais.....	37
Figura 8. Estratégia de análise para identificação de células NK e NKT do baço dos animais .....	38
Figura 9. Estratégia de análise para identificação de Linfócitos B macrófagos do baço dos animais.....	40
Figura 10. Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre a espessura, o peso da orelha, o diâmetro e a área da lesão .....	42
Figura 11. Efeito do tratamento com ciclofosfamida na orelha com tumor.....	43
Figura 12. Fotomicrografia da orelha de camundongos com ou sem tumor de Ehrlich e tratados ou não com ciclofosfamida.....	45
Figura 13. Fotomicrografia da orelha de camundongos com tumor de Ehrlich e tratados ou não com ciclofosfamida .....	46
Figura 14. Fotomicrografia da orelha de camundongos com tumor de Ehrlich e tratados ou não com ciclofosfamida .....	46
Figura 15. Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o consumo de ração e o peso corporal. ....	47
Figura 16. Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o peso e a celularidade do baço .....	49
Figura 17. Caracterização fenotípica dos esplenócitos de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não com ciclofosfamida.....	50

Figura 18. Caracterização fenotípica dos linfócitos B do baço de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não com ciclofosfamida.....	51
Figura 19. Caracterização fenotípica dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos do baço de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não com ciclofosfamida .....	52
Figura 20. Caracterização fenotípica das células NKT do baço de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não com ciclofosfamida .....	53
Figura 21. Caracterização fenotípica dos macrófagos do baço de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não com ciclofosfamida .....	54
Figura 22. Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o número de células do peritônio, o número dessas que produzem espontaneamente peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e a intensidade de fluorescência média (MFI) espontânea e estimulada .....	55

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Escore clínico da orelha de camundongos com tumor de Ehrlich (ou não) e tratados (ou não) com ciclofosfamida .....	44
Tabela 2. Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos com tumor de Ehrlich (ou não) e tratados (ou não) com ciclofosfamida .....	48
Tabela 3. Celularidade da medula de camundongos com tumor de Ehrlich (ou não) e tratados (ou não) com ciclofosfamida.....	48

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
2.1 Imunossupressão.....	17
2.2 Ciclofosfamida .....	17
2.2.1 Metabolismo e ação .....	18
2.2.2 Modelos de imunossupressão.....	24
2.3 Imunidade e câncer.....	25
2.4 Tumor de Ehrlich.....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 Geral .....	31
3.2 Específicos.....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 Animais .....	32
4.2 Tumor de Ehrlich.....	32
4.2.1 Manutenção .....	32
4.2.2 Inóculo .....	33
4.3 Procedimento experimental.....	33
4.4 Obtenção do sangue.....	34
4.5 Avaliação histopatológica da orelha .....	35
4.6 Obtenção e contagem das células dos órgãos linfóides e peritônio .....	35
4.7 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	35
4.8 Fenotipagem das células do baço.....	36
4.8.1 Estratégia de análise.....	37
4.9 Análise estatística .....	42
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>

5.1 O tratamento com ciclofosfamida diminui lesão da orelha de camundongos com tumor de Ehrlich sólido (TES). .....	43
5.2 O tratamento com ciclofosfamida diminui células tumorais, infiltrado inflamatório e necrose da orelha de camundongos com TES.....	45
5.3 O tratamento com ciclofosfamida diminui o consumo de ração e o peso de camundongos com TES.....	48
5.4 O tratamento com ciclofosfamida causa leucopenia em camundongos com TES. ....	48
5.5 O tratamento com ciclofosfamida causa aplasia medular em camundongos com TES.....	49
5.6 O tratamento com ciclofosfamida diminui peso e celularidade do baço de camundongos com TES.....	50
5.7 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de linfócitos B, T e macrófagos do baço de camundongos com TES.....	50
5.8 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de linfócitos B que expressam I-A <sup>b</sup> do baço de camundongos com TES.....	51
5.9 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de linfócitos T do baço de camundongos com TES.....	52
5.10 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de NKT do baço de camundongos com TES.....	53
5.11 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de macrófagos do baço de camundongos com TES.....	54
5.12 O tratamento com ciclofosfamida diminui a celularidade da cavidade peritoneal e aumenta a produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) por essas células, após estímulo em camundongos com TES.....	55
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>75</b>

## RESUMO

A ciclofosfamida é um fármaco muito utilizado no tratamento de cânceres. Devido a sua ação antiproliferativa inespecífica, também atua como imunossupressor, efeito esse que está presente em pacientes tratados por essa droga. Nesse contexto, se faz oportuno o desenvolvimento de modelos pré-clínicos de imunossupressão concomitante aos experimentais de câncer, para diversos fins. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar um modelo de imunossupressão com ciclofosfamida em camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich. Para isso, camundongos machos da linhagem *Swiss*, com idade entre 3 e 4 meses, receberam na orelha direita,  $5 \times 10^5$  células do tumor de Ehrlich ou PBS (20 $\mu$ L). A partir do segundo dia após o inóculo, os animais receberam, ou não, ciclofosfamida (25mg/Kg), diariamente, via intraperitoneal, durante 10 dias. Os animais e a ração foram pesados no início e no término do tratamento. No décimo segundo dia após o inóculo, os animais foram eutanasiados e as orelhas foram retiradas para análise macroscópica e histológica. Além disso, foram quantificadas as células do sangue, peritônio, medula óssea e baço. Foi realizada, ainda, a imunofenotipagem esplênica e a avaliação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Inicialmente foi confirmado o efeito antitumoral da ciclofosfamida no modelo utilizado e a diminuição do infiltrado inflamatório e da necrose nas orelhas com tumor. Como efeito imunossupressor, esse fármaco causou redução do consumo de ração, peso dos animais, leucopenia, aplasia medular e reduziu o número de esplenócitos. A ciclofosfamida, isoladamente, induziu a diminuição do número de linfócitos B no baço. Porém, nos animais com tumor, a ciclofosfamida induziu a diminuição de todas as populações analisadas. Além disso, houve a diminuição de linfócitos B, T citotóxicos ativados, células NKT e macrófagos quando comparados os animais com tumor aos sem tumor, ambos tratados por esse fármaco. Apesar da ciclofosfamida também ter reduzido as células no peritônio, verificou-se que a capacidade funcional dessas células não foi afetada, já que houve uma alta produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após estímulo com PMA. Esses resultados permitem concluir que, o protocolo caracterizado neste estudo pode ser utilizado como um modelo pré-clínico eficiente de imunossupressão em animais com ou sem tumor, considerando seus efeitos na celularidade dos órgãos linfóides e tecidos periféricos.

**Palavras-chave:** Câncer; Quimioterápico; Sistema Imune; Tumor Sólido.

## ABSTRACT

Cyclophosphamide is a drug widely used in the treatment of cancers. Due to its non-specific antiproliferative action, it also acts as an immunosuppressant, an effect that is present in patients treated by this drug. In this context, it is opportune to develop preclinical models of immunosuppression concomitant with the experimental ones of cancer, for several purposes. Thus, the objective of this study was to characterize a model of immunosuppression with cyclophosphamide in mice with or without Ehrlich tumor. For this, male mice of the *Swiss* strain, aged 3 to 4 months, received in the right ear  $5 \times 10^5$  Ehrlich tumor cells or PBS (20 $\mu$ L). From the second day after the inoculum, the animals received cyclophosphamide (25mg/kg) daily, intraperitoneally, for 10 days. Animals and feed were weighed at the beginning and at the end of treatment. On the twelfth day after the inoculum, the animals were euthanized and the ears were removed for macroscopic and histological analysis. In addition, the cells of the blood, peritoneum, bone marrow and spleen were quantified. Splenic immunophenotyping and evaluation of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were also performed. Initially the antitumor effect of cyclophosphamide was confirmed in the model used and the reduction of inflammatory infiltrate and necrosis in the ears with tumor was confirmed. As an immunosuppressive effect, this drug caused reduction of feed intake, animal weight, leucopenia, medullary aplasia and reduced the number of splenocytes. Cyclophosphamide, alone, induced a decrease in the number of B lymphocytes in the spleen. However, in animals with tumor, cyclophosphamide induced a decrease in all analyzed populations. In addition, there was a decrease in B lymphocytes, activated cytotoxic T, NKT cells and macrophages when compared to tumor-bearing and tumor-free animals, both treated by this drug. Although cyclophosphamide also reduced the cells in the peritoneum, it was verified that the functional capacity of these cells was not affected, since there was a high production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after stimulation with PMA. These results allow us to conclude that the protocol characterized in this study can be used as an efficient pre-clinical model of immunosuppression in animals with or without tumor, considering its effects on the cellularity of lymphoid organs and peripheral tissues.

**Key words:** Cancer; Chemotherapeutic; Immune System; Solid Tumor.

## 1 INTRODUÇÃO

A imunossupressão é a diminuição da funcionalidade do sistema imune, quer seja pela redução do reconhecimento de antígenos, de mecanismos de ativação ou do número de seus elementos (AHLMANN; HEMPEL, 2016; SINGH et al., 2018; VANDEWALLE et al., 2018). Por comprometer esse sistema, essa condição imunológica pode permitir a proliferação e instalação de microrganismos, podendo culminar em infecções sistêmicas (DELALOYE; CALANDRA, 2014). Entretanto, a imunossupressão pode ser requerida em algumas situações, como na terapia de doenças autoimunes e na tolerabilidade de transplantes (JEON et al., 2012; LIU et al., 2014; MORATH et al., 2018).

Por isso, vários modelos de imunossupressão têm sido desenvolvidos, e têm permitido diversos estudos (DIEHL, 2017). Dentre os fármacos mais utilizados estão os glicocorticoides, como a dexametasona, que atua inibindo mecanismos de ativação (JOEKEL; DEPLAZES, 2017; VANDEWALLE et al., 2018). Outro grupo de drogas bastante utilizado é o dos cicloestáticos, que age impedindo a divisão celular (WANG; PROROK; VAUGHAN, 1993). Dessa forma, o seu efeito é mais perceptível em células que tem alta taxa de proliferação, como as células do sistema imune (DENEVE et al., 1989). Esses fármacos têm grande destaque por serem utilizados em doenças graves como o câncer. Um exemplo desses medicamentos é a ciclofosfamida, droga amplamente utilizada como antineoplásico (GE et al., 2012; HANDOLIAS et al., 2013; NAWATA et al., 2017).

Diversos modelos de imunossupressão foram descritos utilizando ciclofosfamida como indutor, para variados fins. Existem muitos protocolos na literatura, muitos desses experimentos utilizam dose em administração única para induzir vários tipos de infecções (ALVES, 2018; SZIGET et al., 2018). Alguns protocolos, utilizam dose repetida, para mimetizar um tratamento convencional, atingindo seu objetivo principal e assim permitir a busca de terapias complementares para minimizar seus efeitos em células não malignas (WANG et al., 2018). Além disso, a repetição de dose causa imunossupressão mais prolongada em comparação à dose única (POTEL; BROCK, 1965), sendo adotada, inclusive, para manutenção de infecção (MANENTE et al., 2018).

É inquestionável a importância de se padronizar ou caracterizar modelos como esses. A otimização de tais protocolos é pertinente à tradução de resultados

experimentais para pacientes humanos e, portanto, merece mais investigação (DIEHL et al., 2017), principalmente no contexto do câncer, doença em que a ciclofosfamida é muito utilizada. Para isso, se faz necessário a utilização de modelos de câncer experimental em animais de laboratórios.

Um exemplo desses modelos, bastante utilizado no nosso grupo de pesquisa, é o tumor de Ehrlich (NASCIMENTO et al., 2006; FORTES, 2009; ASSUNÇÃO, 2011; REIS, 2012; SERRA, 2016; NASCIMENTO, 2018), que possibilita formas de desenvolvimento distintas dependendo do local de inóculo. Recentemente, nossa equipe utilizou a ciclofosfamida como controle positivo, o qual demonstrou controle desse tipo de câncer murino quanto na sua forma mais letal, a ascítica (inoculado no peritônio), ou na forma sólida (inóculo subcutâneo) na orelha de camundongos *Swiss* (NASCIMENTO, 2018).

Esse local nada comum de desenvolvimento tumoral, a orelha, foi o local proposto por Maia; Guerra; Rossi (1982), usando outra linhagem tumoral (mastocitoma P815) e padronizado por Reis (2012) com as células peritoneais do tumor de Ehrlich ascítico (TEA). Esse modelo apresenta facilidade de se realizar a análise histológica, bem como possibilita o teste de tratamentos complementares tópicos. Além disso, apresenta efeito proliferativo, induzindo o aumento do número de células do sistema imune (REIS, 2012).

Diante disso, foi proposto neste trabalho, caracterizar um modelo de imunossupressão com ciclofosfamida em camundongos *Swiss* saudáveis, e além de realizar isso em animais com tumor de Ehrlich sólido (TES) na orelha. Considerando que este tipo de tumor induz o aumento da celularidade do sistema imune, e que a ação da ciclofosfamida é mais acentuada em células que possuem elevada taxa de proliferação, formulou-se a hipótese de que o efeito imunossupressor desse fármaco é mais intenso na presença de TES.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Imunossupressão

Imunossupressão é a redução ou inibição da atividade, ou eficiência do sistema imune. Isso pode ocorrer quando há interferências no metabolismo celular, como inibição da duplicação do DNA, tendo como consequência a diminuição de elementos desse sistema (AHLMANN; HEMPEL, 2016). Outro critério de imunossupressão é a inibição da ação e produção de citocinas que culminam na inativação de células e de mecanismos de ativação (VANDEWALLE et al., 2018). Além disso, a interferência no reconhecimento a antígenos, utilizando anticorpos, também se caracteriza como efeito imunossupressor (SINGH et al., 2018).

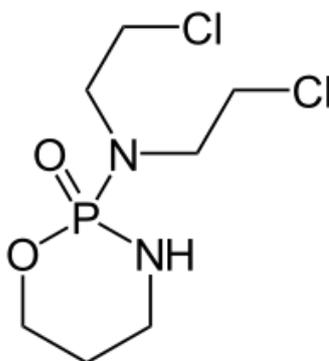
Essa condição imunológica pode facilitar a instalação de microrganismos oportunistas, que em imunocompetentes é mais difícil (NETEA et al, 2015). Entretanto, pode diminuir a rejeição de transplantes (AL-HOMSI et al., 2015), bem como efeitos graves de doenças autoimunes (SAKAI et al., 2017). Por isso, drogas têm sido utilizadas para estabelecer essa inativação do sistema imune de maneira proposital em modelos pré-clínicos em diversas áreas (ARMSTRONG; OELLERICH, 2001; WEI et al., 2013; DIEHL et al., 2017; ALVES, 2018).

Dentre as classes de fármacos utilizadas nesses modelos estão os glicocorticoides, como a dexametasona (TORRES; ENTWISTLE; COOTE, 2016; JOEKEL; DEPLAZES, 2017). Essa classe atua inibindo linfócitos T e células apresentadoras de antígenos (APCs) e induz uma regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias (VANDEWALLE et al., 2018). Outro grupo de drogas, bastante utilizado são os cicloestáticos. Esses prejudicam o ciclo celular, impedindo a divisão das células (WANG; PROROK; VAUGHAN, 1993). Dessa forma, atuam mais perceptivelmente em células que tem alta taxa de proliferação como as células do sistema imune (HALES, 1982; SHULMAN, 1993; DE JONGE et al., 2005). Um exemplo dessa classe é a ciclofosfamida, antineoplásico muito utilizado na clínica (GE et al., 2012; HANDOLIAS et al., 2013; NAWATA et al., 2017).

### 2.2 Ciclofosfamida

A ciclofosfamida, N, N- bis (2-cloroetil) -1, 3, 2 – oxazafosfinan - amina 2- oxido (Figura 1), é um agente alquilante da classe das mostardas nitrogenadas, no qual o

grupo de azoto de mostarda (bis-cloretilamina) está ligado a um anel oxazafosforina. Ele foi desenvolvido por Norbert Brock e empresa ASTA em 1958 (ARNOLD; BOURSEAUX; BROCK, 1958). Sendo usado pela primeira vez em ensaios clínicos para o tratamento de câncer nesse mesmo ano. Em 1959, tornou-se o oitavo agente anticancerígeno citotóxico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) (GROSS, 1959).



**Figura 1. Estrutura molecular da ciclofosfamida.** Fonte: COLVIN (1999).

Esse fármaco foi sintetizado como uma pró-droga, para exercer o efeito desejado apenas após metabolização. Tiveram a hipótese de que, as células tumorais seriam seu alvo de forma específica, pois a ciclofosfamida é portadora inativa de um grupo alquilante potencial, suscetível de ativação no tumor por uma fosforamidase, liberando mostarda de fosforamida, produto citotóxico. Esperava-se que esse produto atuasse especificamente sobre as células neoplásicas por causa da suposta abundância da fosforamidase nas células tumorais. No entanto, não existe esta diferença entre as células neoplásicas e as células saudáveis, em relação à quantidade dessa enzima. Logo, a ciclofosfamida age em todo o organismo atuando de forma mais ativa nas células que normalmente se dividem mais vezes, em um mesmo espaço de tempo, como as células do tecido hematopoiético, gônadas e células do epitélio gastrointestinal (HALES, 1982; SHULMAN, 1993; BROCK, 1996; DE JONGE et al., 2005).

### 2.2.1 Metabolismo e ação

A ciclofosfamida pode ser usada por via oral, intramuscular, subcutânea, intravenosa e intraperitoneal (em animais). A taxa de absorção é muito alta, na

administração oral. Sua meia vida é em torno de 8h (YULE et al., 1995). Esse fármaco, assim como outros agentes alquilantes, necessita de ativação metabólica prévia para exercer seus efeitos. A metabolização e ativação da droga ocorrem no fígado. Aproximadamente, 70-80% da dose administrada é ativada pelas enzimas do citocromo P450 hepáticas, que participam da sua biotransformação, gerando metabólitos farmacologicamente ativos e citotóxicos como mostarda fosforamida e acroleína (XIE et al., 2005; AFSHARIAN et al., 2007).

Em humanos, a ativação ocorre, sobretudo, por CYP 2B6, com participação de CYP 2A6, 2C8, 2C9, 2C19, 3A4 e 3A5. Em ratos, a ciclofosfamida é metabolizada principalmente por isoenzimas CYP 2B1, com participação significativa de CYP 2C6 e 2C11 (CHANG et al., 1993). Tanto no homem como em animais, a ativação dessa droga pelo citocromo P450 é sua principal via de metabolização, apesar de existir evidências de sua ativação por outras enzimas em outros órgãos (SMITH; KEHRER, 1991).

Para a ativação dessa droga (Figura 2), o citocromo P450 oxida a ciclofosfamida em 4-hidroxi-ciclofosfamida e essa forma um equilíbrio com seu isômero aldofosfamida (YULE et al., 1995). Ambas as formas difundem-se facilmente pelas células e não são tóxicas (BOYD et al., 1986). Porém, a aldofosfamida é extremamente instável e se decompõe espontaneamente em mostarda fosforamida pela beta-eliminação da acroleína (CONNORS et al., 1974; FRIEDMAN; WODINSKY; MYLES, 1976). Isso pode ser em parte, catalisada pela albumina ou outras proteínas (KWON et al., 1987).

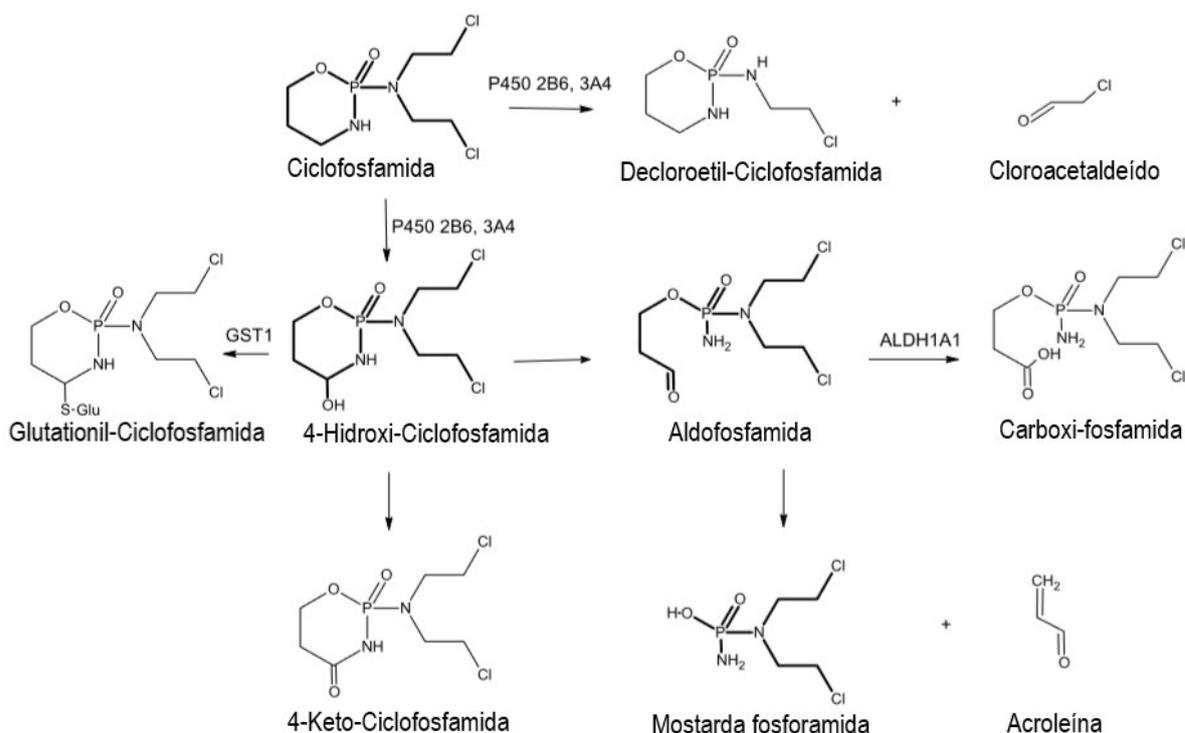
A mostarda fosforamida é o agente capaz de interferir com o DNA formando ligações cruzadas, sendo o metabólito responsável pelos maiores danos causados nas células. Mas, por ser facilmente ionizada em pH fisiológico necessita, então, de um carreador de transporte para o interior da célula para poder exercer seus efeitos citotóxicos. Com isso 4 – hidroxi-ciclofosfamida funciona o como um transportador deste metabólito para o interior da célula (CONNORS et al., 1974). Já a acroleína se concentra na bexiga e pode resultar em toxicidade grave. MESNA (sulfaniletanosulfonato de sódio 2) deve ser administrado antes da administração de ciclofosfamida para neutralizar a acroleína na bexiga. O grupo sulfidrílo reage com o grupo vinilo da acroleína (BOHNENSTENGEL et al., 1996).

Além dessa via de ativação, existem vias de inativação. A oxidação de cadeia lateral de ciclofosfamida para decloroetil-ciclofosfamida é também mediada pelo

citocromo P450, principalmente pela isoenzima CYP 3A4 e 2B6 sendo também envolvido (BOHNENSTENGEL et al., 1996). Assim, tanto a ativação quanto a inativação do fármaco são catalisadas predominantemente pela mesma enzima. O subproduto cloroacetaldeído mostrou efeitos citotóxicos *in vitro* e pode contribuir para a neurotoxicidade da ciclofosfamida (SOOD; O'BRIEN, 1996; BRÜGGEMANN et al., 1997).

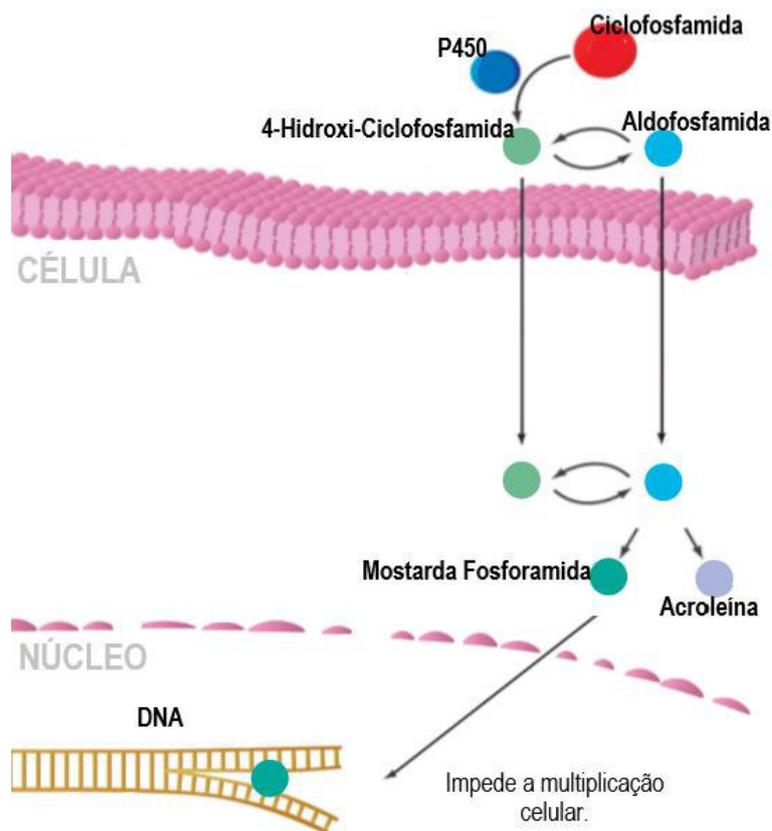
Outra via de inativação é a clivagem com glutationa, catalisada por GSTM1, GSTP1 e GSTT1. Investigações *in vitro* e *in vivo* indicam que a ativação da 4-hidroxi-ciclofosfamida é saturável, enquanto a oxidação da cadeia lateral como uma etapa de inativação não é (BOHNENSTENGEL et al., 1996). A ciclofosfamida, assim como outras oxazafosforinas, induz o seu próprio metabolismo (autoindução) (YULE et al., 2001). Consequentemente, a depuração da ciclofosfamida é aumentada com administrações repetidas e infusões contínuas (SVENSSON et al., 1999). A oxidação da aldofosfamida ativada pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) à carboxifosfamida é o principal passo da desintoxicação intracelular (HIPKENS; STRUCK; GURTOO, 1981). O ALDH celular, especialmente ALDH1A1, é o principal mecanismo de desintoxicação (JONES et al., 1995).

Além disso, a 4-hidroxi-ciclofosfamida ainda pode ser convertida em outro metabólito inativo: a 4-keto-ciclofosfamida, pela álcool desidrogenase (AHLMANN; HEMPEL, 2016; MADONDO; QUINN; PLEBANSKI, 2016). Todas essas vias mencionadas estão ilustradas na Figura 2.



**Figura 2. Metabolismo da ciclofosfamida: bioativação e processos de inativação.** Fonte: adaptado de AHLMANN; HEMPEL (2016).

Após a metabolização da ciclofosfamida, os efeitos citotóxicos são primariamente devido a capacidade da mostarda fosforamida de se ligar a cadeias de DNA (Figura 3). Esse metabólito é o agente alquilante dessa droga, podendo reagir com o N (7) da guanina e com a citidina do DNA (WANG; PROROK; VAUGHAN, 1993). Devido às duas porções reativas na molécula, ligações cruzadas podem ser formadas (FLEER; BRENDDEL, 1981).



**Figura 3. Mecanismo celular da mostarda fosforamida: alquilação no DNA.** Fonte: adaptado de DIEHL et al (2017).

A atividade alquilante no DNA pode resultar em morte imediata da célula-alvo, ou lesão letal expressa durante a divisão mitótica seguinte. Nesta última circunstância, a célula lesada pode funcionar normalmente na fase intermitótica (G0). Por outro lado, se for possível reparar o DNA, a célula pode sobreviver funcionando normalmente. Ou seja, pode alterar ou evitar a duplicação do DNA, inativando importantes proteínas necessárias para replicação do DNA, transcrição do RNA e provocando também alterações na integridade da célula e do metabolismo (ADATIA, 1975; GURTOO, HIPKENS; SHARMA, 1981; BERRIGAN; STRUCK; GURTOO, 1987). Os efeitos da ciclofosfamida são, portanto, independentes do ciclo celular (ciclo-específico). Entretanto, como com todos os agentes alquilantes, as células de proliferação rápida são mais sensíveis à ciclofosfamida (COLVIN, 1999; VAN PUTTEN; LELIEVELD; KRAM-IDSENGA, 1972).

Além da mostarda fosforamida, trabalhos comprovaram que a ciclofosfamida provoca a formação de radicais livres que são capazes de causar lesão celular, tendo grande potencial para causar lesão por estresse oxidativo e, ainda, apoptose e

necrose (GURTOO; HIPKENS; SHARMA, 1981; BERRIGAN; STRUCK; GURTOO, 1987; AFSHARIAN et al., 2007; TRIPATHI; JENA, 2010; LIU et al., 2012). Outro metabólito da ciclofosfamida também intensifica esse potencial oxidativo: a acroleína. Essa induz a produção de espécies reativas de oxigênio e diminui a ação de enzimas antioxidantes. Esse metabólito é excretado na urina e pode causar cistite hemorrágica (HALES et al., 1982; LIU et al., 2012; SILVA JUNIOR et al., 2013).

Diante desse efeito, pode-se entender porque, essa droga tem sido amplamente utilizada, no tratamento de uma variedade de doenças, como neoplasias hematológicas, incluindo linfoma e leucemia, bem como de vários tumores epiteliais, incluindo carcinomas de mama, ovário e pequenas células do pulmão (ETTINGER et al., 1978; EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; GE et al., 2012; HANDOLIAS et al., 2013; NAWATA et al., 2017). Além da quimioterapia antineoplásica, outras indicações aprovadas são eventos com risco de vida em doenças auto-imunes e imunomediadas, como nefrite lúpica, granulomatose de Wegener e esclerose múltipla, além de ser adotada como um regime de condicionamento antes do transplante de medula óssea para malignidades hematológicas, bem como para anemia aplástica (DE JONGE et al., 2005; SELVAKUMAR et al., 2006; CHINNASWAMY et al., 2011; FUKUSHIMA et al., 2011; BRUMMAIER et al., 2013; CHUNG et al., 2013).

Porém, esses efeitos da ciclofosfamida não se limitam apenas às células que se desejam impedir a proliferação, atingindo células saudáveis, principalmente as com alto índice mitótico como as hematopoiéticas, podendo causar aplasia medular, leuco e trombocitopenia, anemia, diminuição na celularidade e peso de órgãos linfóides, dependendo da dose utilizada e período de tratamento (BIN HAFEEZ et al., 2001; AHLMANN; HEMPEL, 2016). Para minimizar esses efeitos é que uma nova abordagem à quimioterapia consiste na administração contínua de citostáticos em doses baixas. O alvo deixa de ser as células tumorais para ser as células endoteliais. Estas são imprescindíveis para o crescimento do tumor, e se dividem a uma taxa elevada. Este protocolo denomina-se de quimioterapia metronômica e combina um citostático, como a ciclofosfamida, em doses baixas com um anti-inflamatório também com propriedades de inibição da angiogênese (formação de novos vasos) (GE et al., 2012).

No geral, não há dúvidas de que esse ciclo-específico também pode ser caracterizado como um importante imunossupressor, agindo nas células imunes e

demonstrando propriedades inibitórias sobre o sistema imune (BACH; STROM, 1986).

### 2.2.2 Modelos de imunossupressão

Estudos têm utilizado a ciclofosfamida para causar imunossupressão, e assim, viabilizar a indução de infecções diversas em murinos. Como em modelos para induzir infecções por fungos. Manente et al (2018) utilizou essa droga na dose de 150mg/Kg durante 9 dias para induzir esporotricose. Já Szigeti et al (2018) administrou 250mg/Kg em dose única desse fármaco para infectar os camundongos com *Aspergillus*. Além de fungos, essa droga também é utilizada para modelos de infecções bacterianas, como *Acinetobacter baumannii*, antes da infecção uma dose única de 300mg/Kg de ciclofosfamida foi administrada nos animais (MANEPALI et al., 2013). Essa droga também demonstrou colaborar para o sucesso de xenotransplantes, utilizando 3 doses diárias de 60mg/Kg (JIVRAJANI et al., 2014).

Esses modelos têm sido utilizados para avaliar o efeito imunossupressor, como efeito indesejado, causado pela ciclofosfamida, pois dependendo da dose e duração de tratamento esse fármaco pode provocar imunossupressão em diversas intensidades, causando efeitos particulares para cada tratamento (O'CONNELL; WIERNIK PH; SUTHERLAND, 1976; ETTINGER et al., 1978; THATCHER et al., 1982). A alta dose de ciclofosfamida é definida como superior a 120mg/Kg e doses baixas variam de 1-3mg/Kg (COLLEONI et al., 2002; GE et al., 2012; HANDOLIAS et al., 2013). Ao contrário da dose alta, a baixa é bem tolerada com risco significativamente reduzido de efeitos colaterais, apresentando como benefício, efeitos imunoestimuladores (COLLEONI et al., 2002).

Modelos para testar possíveis protetores contra esses efeitos têm sido desenvolvidos. Um exemplo é o trabalho de Wang et al (2018), o qual induziu imunossupressão nos camundongos com 3 doses a cada 24h de 75mg/Kg para testar o efeito protetor dos polissacarídeos do cogumelo *Gloeostereum incaratum*. Outro estudo também testou o efeito protetor de polissacarídeos, neste caso, de lentinan, tremelan, paquima, ou uma mistura dos três, e utilizara a dose de 80mg/Kg também na mesma quantidade e duração de tratamento que o anterior (ZHANG et al., 2017).

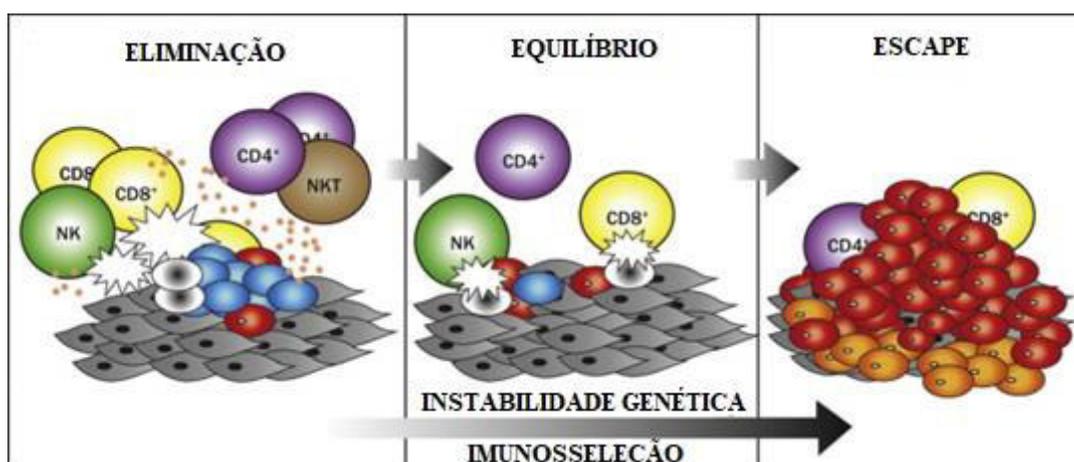
E como esse ciclo-específico é comumente escolhido na clínica para tratar o câncer, modelos com câncer têm permitido o estudo desses efeitos em portadores

de tumores malignos, bem como a busca de terapias complementares para potencializar o efeito de antineoplásicos, como mostra o estudo que testou o efeito quimioterápico do lambamisol e / ou taurina com a administração de dose única de 100mg/Kg de ciclofosfamida (IBRAHIM et al., 2018).

Existe uma variedade desses modelos utilizando a ciclofosfamida, alguns em dose única (IBRAHIM et al., 2018; MANEPALI et al., 2013) e outros em dose repetida (MANENTE et al., 2018; WANG et al., 2018; ZHANG et al., 2017; JIVRAJANI et al., 2014). O protocolo de dose única permite a infecção de diversos microrganismos (ALVES, 2018; SZIGETI et al., 2018) além de diminuir gastos com tempo e recursos. Porém a dose repetida causa uma imunossupressão mais intensa e duradoura (POTEL; BROCK, 1965), sendo mais adequado para modelos com o objetivo de analisar a imunossupressão, tanto em animais sadios, quanto em diversas doenças. Como exemplo tem-se o câncer, doença para qual esse fármaco foi desenvolvido, e onde esse efeito no sistema imune pode interferir no prognóstico (KRISL; DOAN, 2017), dada a importância desse sistema frente à essa neoplasia.

### **2.3 Imunidade e câncer**

Com os avanços dos estudos em imunologia, foi verificado que a relação entre o câncer e o sistema imune é complexa. Observou-se que, esse sistema pode interagir com a célula tumoral não só na sua formação, mas também no seu desenvolvimento. Esta teoria, conhecida como imunoedição, envolve a seleção de mecanismos de evasão pelas células tumorais, em que as células do sistema imune exercem uma pressão seletiva sobre os tumores e induzem a eliminação ou seleção de clones menos imunogênicos (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011; PENNELL; 2015). Inicialmente, o sistema imune reconhece as células transformadas e recruta moléculas pró-inflamatórias, caracterizando o processo de eliminação. Em um segundo momento, as células tumorais selecionadas que não foram destruídas geram variantes que carregam mutações possibilitando a resistência. Segue-se uma fase de equilíbrio com o sistema imune, na qual coexistem as células de baixa imunogenicidade que compõem o tumor e as células e moléculas responsáveis pelo controle do crescimento das mesmas. Por fim, após esta seleção natural as células tumorais se desenvolvem em um ambiente virtualmente anérgico (fase de evasão) (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011) (Figura 4).



**Figura 4 – As três fases da imunoeedição: eliminação, equilíbrio e escape.** Fonte: Adaptado de Pennell (2015).

Dessa forma, as células do sistema imune podem participar do desenvolvimento tumoral, podendo agir contra ou a favor do crescimento do tumor (SOMAROUTHU et al., 2018). Dentre essas células estão os macrófagos, que são capazes tanto de inibir como de promover o crescimento e a promoção de cânceres, dependendo do seu estado de ativação. Macrófagos M1 são considerados potentes células efetoras na eliminação de microrganismos e células tumorais (LAOUI et al., 2011; LEITE et al., 2015), e secretam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, podem expressar níveis elevados de complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS/NOS2), podendo produzir espécies reativas (TAN et al., 2016). Macrófagos M2 podem apresentar grande capacidade de síntese de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), regulam negativamente MHC de classe II e catabolizam L-arginina através da arginase 1, produzindo ornitina e poliaminas e desempenham funções na remodelação tecidual, proliferação celular e têm sido implicadas na progressão de diversos tumores (SICA et al., 2008; FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009; HEUSINKVELD; VAN DER BUR, 2011; MANTOVANI et al., 2011; FU et al., 2017).

Macrófagos não são as únicas células do sistema imune inato envolvidas no contexto da resposta tumoral, células NK também são descritas por apresentarem atividade citotóxica frente às células cancerígenas (MORVAN; LANIER, 2016). Essa citotoxicidade é considerada rápida, muito potente e possui múltiplas facetas. O mecanismo principal da ação das NK é a citólise mediada por liberação de granzima

e perforina ligadas a serglicina. As perforinas são proteínas que criam poros na membrana para entrada das granzimas que são enzimas proteolíticas que ativam caspases causando apoptose na célula (DEL ZOTTO et al., 2017). Existe ainda uma subpopulação das células NK que expressam moléculas superfície encontradas nas células T classificando-as como células NKT.

As células NKT são um subconjunto heterogêneo de células T especializadas. Essas células exibem uma característica de célula inata de resposta rápida à exposição antigênica em combinação com precisão de reconhecimento antigênico de células adaptativas e diversas respostas efetoras (SALIO; SILK; CERUNDOLO, 2014; BAE et al., 2019). Como as células T convencionais, as células NKT sofrem desenvolvimento e seleção do timo e possuem o receptor de células T (TCR) para reconhecer antígenos (BERZINS et al., 2004; GODFREY et al., 2015). Além dos TCRs, as células NKT também possuem receptores para citocinas, semelhantes às células inatas, como NK. Esses receptores de citocinas podem ser ativados pela expressão, em estado estacionário, dessas citocinas inflamatórias, mesmo na ausência de sinais de TCR. Assim, as células NKT podem receber sinais tanto de estimulações mediadas por TCR como de citocinas inflamatórias para manifestar a imediata liberação de uma série de citocinas (BRENNAN; BRIGL; BRENNER, 2013; KOHLGRUBER et al., 2016; NAIR; DHODAPKAR, 2017).

Contra o crescimento e o desenvolvimento tumoral, há também a grande participação da imunidade adaptativa composta pelos linfócitos B e T (DUNN, OLD, SCHREIBER, 2004; STANTON; DISIS, 2016). Os linfócitos B são células que podem participar contra ou a favor do câncer (SHEN et al., 2016). Quando esses linfócitos geram anticorpos (DISIS; STANTON, 2015), apresentam antígenos (ROSSETTI et al., 2018) ou liberam citocinas pró-inflamatórias (AHMED; KOMA, 2015), podem ativar macrófagos e células NK e influenciar ainda mais suas funções, estimulando a imunidade antitumoral. Além das funções contra o câncer, evidências convincentes sugerem que essas células exercem certas funções na supressão da resposta imune, os linfócitos B reguladores (Bregs). Esses secretam citocinas reguladoras que podem suprimir a imunidade tumoral, como a interleucina 10 (IL-10), e por isso também são chamados de células B10 (WEI et al., 2016).

Além dos linfócitos B, têm os linfócitos T. Os linfócitos T CD4+ têm efeito antitumoral reconhecendo antígenos, atuando diretamente nas respostas imunes, ativando macrófagos a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como

óxido nítrico e superóxidos. Os linfócitos T CD4+ e os macrófagos ativados completam a resposta antitumoral levando a ativação de linfócitos T CD8+, os quais poderão atuar diretamente sob as células tumorais, na tentativa de eliminá-las. Os linfócitos T CD4+ ativados tornam-se linfócitos de memória ou podem migrar para o sítio do tumor atuando em conjunto com linfócitos T CD8+ na eliminação das células tumorais, podendo amplificar a resposta imune, pela ativação de outras APCs, que por sua vez, ativam outros linfócitos T CD8+ (PARDOLL; TOPALIAN, 1998; ANTOHE et al., 2019).

Os linfócitos T CD8+ são capazes de induzir morte das células tumorais por meio de lise da célula tumoral através da atuação de perforina e granzima B. Essa morte acontece quando linfócitos T CD8+ reconhecem os peptídeos derivados de antígenos associados ao tumor (TAA), os quais podem ser apresentados via MHC de classe II (por APCs) ou I (por apresentação cruzada nas células dendríticas). As APCs, após capturar os antígenos tumorais, migram para o linfonodo drenante e apresentam estes aos linfócitos T CD8+, os quais são ativados passando a linfócitos T citotóxicos. Esses migram para o local onde está alojado o tumor para desempenhar a função citolítica (ZIAI et al, 2018). Uma vez ativado, o linfócito T CD8+ pode produzir citocinas que ativam APCs, favorecendo o aumento e a eficácia na apresentação de antígenos a linfócitos T, induzindo uma resposta imune efetora. Os peptídeos derivados de antígenos tumorais podem ser apresentados aos linfócitos T CD8+ em órgãos linfoides secundários por apresentação direta das células dendríticas que migraram, ou indiretamente após a captação e processamento de outras células contendo antígenos tumorais (como macrófagos ou neutrófilos) (PARDOLL; TOPALIAN, 1998; OCHSENBEIN, 2005; POGGI; ZOCCHI, 2006; LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019). Além disso, os linfócitos T CD8+ também matam células tumorais através de moléculas de morte, como por exemplo, FAS-FASL (BLOK et al., 2017) e PD1-PDL1 (REN et al., 2018).

Assim, as respostas imunes inata e adaptativa podem formar um sistema integrado de respostas do hospedeiro, no qual diversas células e moléculas funcionam cooperativamente para conter o desenvolvimento tumoral. E por isso, entende-se que a imunossupressão pode ser muito danosa ao portador de câncer. Diante disso, desenvolver, padronizar ou caracterizar a imunossupressão em modelos experimentais de câncer, que permitem a busca de adjuvantes que

protejam do efeito imunossupressor ou potencializem o efeito antitumoral, são sempre oportunos.

## 2.4 Tumor de Ehrlich

Um exemplo de modelos de câncer experimental é o tumor de Ehrlich, um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906. Esse tumor transplantável pode se desenvolver tanto na forma sólida (TES), quando as células são inoculadas no tecido subcutâneo ou intramuscular, ou na forma ascítica (TEA), quando inoculado na cavidade peritoneal (EHRlich, 1906; GUERRA, 1983; DAGLI, GUERRA, SALDIVA, 1992).

O tumor de Ehrlich é capaz de se desenvolver em diferentes linhagens de camundongos, sugerindo que seu reconhecimento e resposta imune é independente de MHC, o que levaria a supor que o controle desse tumor está mais relacionado com a resposta imune inata que com a imunidade adaptativa mediada por células T (CHEN; WATKINS, 1970). Uma vez que pouco expressa moléculas de MHC de classe I e devido à sua baixa imunogenicidade, esta neoplasia apresenta crescimento bastante agressivo, proliferação celular acelerada, invasão em tecidos adjacentes, baixa resposta de linfócitos T a mitógenos e progressiva perda da atividade de células NK (BERGAMI-SANTOS, MARIANO, BARBUTO, 2004). Devido a essas características agressivas, desde 1906 até hoje, esse modelo vem sendo utilizado para avaliar o efeito de drogas no seu desenvolvimento ascítico, como o trabalho recente de Leal et al (2019), o qual demonstrou que a gabapentina poderia melhorar o estado geral do hospedeiro tumoral.

A forma sólida desse tumor possui um crescimento um pouco mais lento, podendo, de acordo com o número de células e a linhagem, não ser letal para seu portador (PAVELIC et al., 1979; NASCIMENTO et al., 2006), apesar de causar alterações mais intensas na celularidade dos órgãos que a forma ascítica (FORTES, 2009; REIS, 2012). Por volta do décimo dia de evolução, apresenta-se como uma massa palpável e de consistência firme. No exame histopatológico, caracteriza-se por apresentar um parênquima indiferenciado e estroma delicado. As células tumorais são arredondadas e apresentam o citoplasma escasso, núcleo central redondo ou ovoide, com nucléolos conspícuos e pleomorfismo celular evidente; além

disso, figuras de mitose aberrantes são frequentemente observadas (FERNANDES et al., 2015).

Reis (2012) verificara que o tumor de Ehrlich se desenvolve quando implantado na orelha de camundongos *Swiss*, apresentando características tais como: presença de células tumorais displásicas, com grande quantidade de mitoses atípicas e relação núcleo-citoplasma maior que a de células normais; infiltrado inflamatório com predominância de células polimorfonucleares e presença de angiogênese e fibrose. A derme da orelha externa de camundongos já foi utilizada para o desenvolvimento de uma outra linhagem tumoral (mastocitoma P815) (MAIA; GUERRA; ROSSI, 1982), bem como para o estudo experimental de infecções cutâneas (DE MOURA et al., 2005) e de processos inflamatórios (MALORNY et al., 1990; GABOR, 2003). Local com possibilidade de utilização de produtos de uso tópicos com potencial antitumoral e por ser um local de fácil visualização e mensuração da lesão, bem como para realização de análise histopatológica. Além disso, a resposta imunológica na orelha é bastante intensa (ROBINSON; NAYSMITH, 1976; MALORNY et al., 1990; DE MOURA et al., 2005).

A ciclofosfamida já fora utilizada em tumor de Ehrlich sólido, inoculado na região do peito entre os membros anteriores. Esse estudo utilizou a dose 10mg/Kg em dias alternados por 50 dias, demonstrando diminuir o desenvolvimento tumoral (AL-HARBI et al., 1994). Com relação ao tumor ascítico, Bhattacharjee et al (2017), utilizaram a dose 25mg/Kg diariamente por 10 dias, demonstrando diminuição da celularidade tumoral e aumentando sobrevida dos animais. Recentemente, Nascimento (2018) ao estudar o efeito da aminoguanidina em tumor de Ehrlich ascítico ou sólido na orelha de camundongos, utilizara a ciclofosfamida como controle positivo nesse mesmo protocolo de 10 dias, o qual demonstrou que esse esquema terapêutico foi eficaz no controle do tumor ascítico ou sólido.

Dessa forma, a ciclofosfamida apresenta controle do tumor de Ehrlich, porém não há relatos do seu efeito imunossupressor em animais portadores desse tipo de câncer experimental.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Caracterizar modelo de imunossupressão com ciclofosfamida em camundongos *Swiss* portadores ou não de tumor de Ehrlich.

#### **3.2 Específicos**

- Investigar se a ciclofosfamida possui efeito antitumoral no modelo de tumor sólido;
- Avaliar se o tratamento com a ciclofosfamida interfere na alimentação e peso dos animais;
- Investigar se o efeito imunossupressor da ciclofosfamida está associado com inibição de recrutamento, proliferação ou ativação celular.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 30 camundongos machos da linhagem *Swiss*, com peso em torno de 45-50g e idade entre 3 e 4 meses, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram mantidos sob condições ambientais padronizadas, alimentados com uma dieta balanceada e água *ad libitum*. O certificado de aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFMA, sob o nº 23115.003822/2016-26, consta em anexo.

### 4.2 Tumor de Ehrlich

#### 4.2.1 Manutenção

A manutenção do tumor de Ehrlich é realizada no Laboratório de Imunofisiologia do Departamento de Patologia da UFMA. É mantido na forma ascítica por sucessivas passagens em animais da linhagem *Swiss* através da inoculação intraperitoneal de  $2 \times 10^6$  células/animal (200  $\mu$ L de uma suspensão de  $1 \times 10^7$  células/mL).

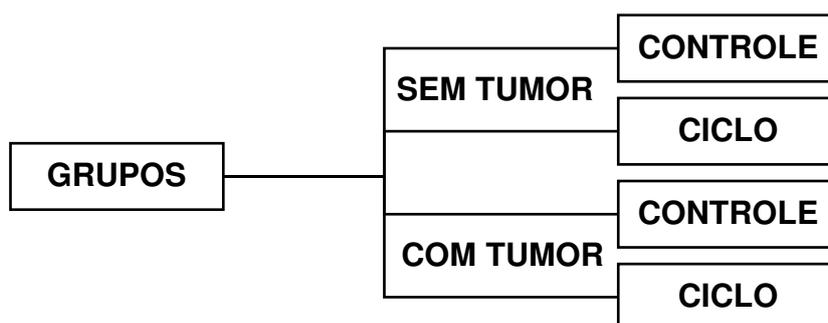
Para obtenção das células neoplásicas a serem utilizadas neste trabalho, um camundongo com aproximadamente sete dias de evolução do tumor ascítico de Ehrlich foi eutanasiado com superdosagem anestésica (Cloridrato de Xilasina 270mg/Kg e Cloridrato de Ketamina 48mg/Kg, intramuscular) (REIS, 2012). Após a assepsia com álcool 70% e excisão da parede abdominal, o fluido ascítico foi aspirado da cavidade peritoneal com de agulha e seringa, e ressuspenso em solução tamponada de fosfato (PBS, pH 7,2). Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada (290 G /4°C/10 minutos). Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 5 mL de PBS. Para a determinação da concentração de células tumorais presentes nessa suspensão uma alíquota foi diluída, sendo realizada a contagem de células na câmara de Neubauer, e a viabilidade celular (92%) determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Trypan.

#### 4.2.2 Inóculo

Para o desenvolvimento do tumor de Ehrlich sólido foram inoculadas  $5 \times 10^5$  células do tumor ascítico em  $20 \mu\text{L}$  de PBS na orelha direita de catorze camundongos previamente anestesiados com a mesma associação mencionada anteriormente, porém com dose  $90 \text{mg/Kg}$  de Cloridrato de Xilasina e  $16 \text{mg/Kg}$  de Cloridrato de Ketamina, também via intramuscular (MAIA; GUERRA; ROSSI, 1982; NASCIMENTO et al., 2006; REIS, 2012).

#### 4.3 Procedimento experimental

Posteriormente, os animais foram distribuídos em quatro grupos (Figura 5) conforme tratamento. Dois grupos sem tumor ( $n=7/\text{grupo}$ ): um controle sem tumor, não tratado (CONTROLE), e um grupo tratado com Ciclofosfamida (CICLO)  $20 \text{mg/mL}$  Genuxal® (Lote - 5J081) na dose de  $25 \text{mg/kg}$  via intraperitoneal (ip.), a partir de 48h após a implantação das células tumorais, uma vez por dia, durante dez dias (NASCIMENTO, 2018). Dois grupos com tumor ( $n=7/\text{grupo}$ ), que respeitaram ao mesmo esquema de tratamento dos grupos sem tumor: CONTROLE e CICLO.



**Figura 5. Esquema da distribuição dos grupos de animais.**

No dia zero (0) e doze (12), o peso dos animais e o consumo de ração foram verificados em balança analítica. Nos dias 0 e 12, as orelhas com tumor foram fotografadas para cálculo da área da lesão através do programa Image J (versão 1.52A, Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, USA) e expressa em  $\text{mm}^2$ . No décimo segundo dia, os animais foram eutanasiados.

Após a anestesia o sangue foi coletado (para esfregaço sanguíneo e contagem global de leucócitos), e após eutanásia foram coletados: a orelha direita (para análise

macroscópica e histopatológica); os órgãos linfóides – baço (pesagem, contagem e imunofenotipagem) e medula (para contagem) e o lavado peritoneal (para contagem e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O delineamento experimental está demonstrado na Figura 6.



Figura 6. Delineamento experimental.

#### 4.4 Obtenção do sangue

Após a anestesia dos animais (descrito no tópico 4.2), o sangue foi coletado a partir do plexo orbital, em tubo cônico de 2mL. Então foram retirados 20µL diluídos em 400µL do Líquido de Turck (40 mL de ácido acético glacial, 40 gotas de violeta genciana a 1% e água destilada qsp 1L) para contagem dos leucócitos totais. E foram retirados 10µL para a confecção de esfregaço sanguíneo, para contagem diferencial de leucócitos.

##### 4.4.1 Análise leucométrica

A contagem global de leucócitos foi feita nos quadrantes laterais (L1, L2, L3, L4) da câmara Neubauer, utilizando microscópio óptico comum (Olympus CX40). Ao total de células contadas (N), foi aplicada a fórmula:  $\text{Leucócitos/mm}^3 = N \times 50$  (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000).

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através de esfregaço sanguíneo corado com o kit panótico rápido (Laborclin) (conforme instruções do fabricante), utilizando microscópio óptico comum, sob aumento de 100X. Estabeleceu-se a quantidade de cada tipo de célula, encontrada ao final da contagem de 100 leucócitos.

#### **4.5 Avaliação histopatológica da orelha**

Após a eutanásia, as orelhas dos animais foram coletadas, pesadas e armazenadas em formol a 10% por 48 horas e colocadas em parafinas para posterior confecção das lâminas. As amostras foram seccionadas em 5µm de diâmetro e coradas com hematoxilina-eosina (LUNA, 1968). A análise das lâminas, sem identificação dos grupos, foi realizada pelo patologista em microscópio óptico de luz comum, com objetiva de 40. Os cortes foram fotografados em microscópio óptico invertido (NIKON®, modelo eclipse Ti-U) e do programa NIS-*Elements advanced research* (NIKON Corporation®, Japão) com aumento de 200 e 400X.

Os parâmetros analisados foram: infiltrado celular, necrose, quantidade de células tumorais, angiogênese e edema. O sistema de escore utilizado para caracterizar os parâmetros analisados foi determinado da seguinte forma: (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

#### **4.6 Obtenção e contagem das células dos órgãos linfóides e peritônio**

O lavado peritoneal foi realizado com a aplicação de 5mL de PBS estéril na cavidade peritoneal, seguida de aspiração. O baço foi retirado, e triturado em câmara, em 3 mL de PBS estéril e a suspensão celulares mantida em banho de gelo e diluídas 50x em PBS para contagem. Para obtenção das células da medula óssea, o fêmur da pata esquerda foi perfundido com 1 mL de PBS. Foram retirados 90 µL das suspensões celulares obtidas dos respectivos órgãos. As células foram fixadas e coradas em 10 µL de cristal violeta. As contagens celulares foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico de luz comum (CRUZ et al., 2007).

#### **4.7 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

As células do peritônio foram suspendidas com PBS e ajustadas para 1x10<sup>6</sup>/mL, e 100 µL foram transferidos para cada poço em placa de 96 poços. Cada amostra foi feita a análise do NM (não marcado), DHR (espontâneo) e DHR+ PMA (estimulado). Estas células foram incubadas em estufa a 37°C, em presença de DHR (Dihydrorhodamine 100 ng/mL; SIGMA-ALDRICH), por 10 minutos. E então tratadas ou não com éster de forbol, Phorbol-12- miristato-13- acetato (PMA - 50nM; SIGMA-

ALDRICH) e foram mantidos por 1 hora em estufa a 37°C, seguido de lavagem com PBS, e para leitura foram ressuspensas também em PBS. As aquisições foram feitas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), no canal FL1. Para análise, 5000 eventos foram adquiridos, levando-se em consideração os parâmetros de tamanho (Forward Scatter, FSC) e complexidade celular (Side Scatter, SSC) para estabelecimento do gate de aquisição. Posteriormente, os dados foram analisados no software Flow Jo® (TreeStar) e expressos em média de intensidade de fluorescência (MFI) (BABA et al., 2014).

#### **4.8 Fenotipagem das células do baço**

Para avaliação fenotípica, um número de  $1 \times 10^6$ /mL das células do baço foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de PBS e transferidas para uma placa de 96 poços de fundo redondo e centrifugadas (340 G /4°C/ 3 minutos). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 $\mu$ L de PBSA 1% (PBS 1x mais BSA 1%) ao pellet formado para ser lavado por duas vezes. Após a lavagem foi adicionado aos poços 50 $\mu$ L anticorpo Fc Block (BD Pharmingen) na proporção de 1 $\mu$ L do Anticorpo:100 $\mu$ L de PBSA 1% em todos os poços para incubar por 15 min a 4°C. Adicionou-se 150 $\mu$ L de PBSA 1% e foi feita centrifugação das células a 340 G; 4°C durante 3 min. O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet desprendido para ser incubado com o 100 $\mu$ L do mix de anticorpos e incubados durante 20 min ao abrigo da luz a 4°C. Passado o período de incubação foi adicionado mais 200 $\mu$ L de PBSA 1% para o pellet ser centrifugado por mais duas vezes (340 G/ 4°C / 3 min). Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído à 4% e incubadas por 15min à 4°C ao abrigo da luz para em seguida serem novamente lavadas por mais duas vezes com PBSA 1%. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspenso em 150 $\mu$ L de PBSA 1%. As suspensões de células foram transferidas para microtubos de leitura para aquisição de 20000 eventos no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados no programa Flow Jo®(TreeStar).

Foram montados 4 painéis de marcação com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 e anti-lale conjugados com FITC; anti-CD28, anti-CD19, anti-CD49b e anti-CD69 conjugados com PE, anti-CD4 e anti-CD8 conjugados com PerCP e anti-NK1.1 e anti-F4/80 conjugados com

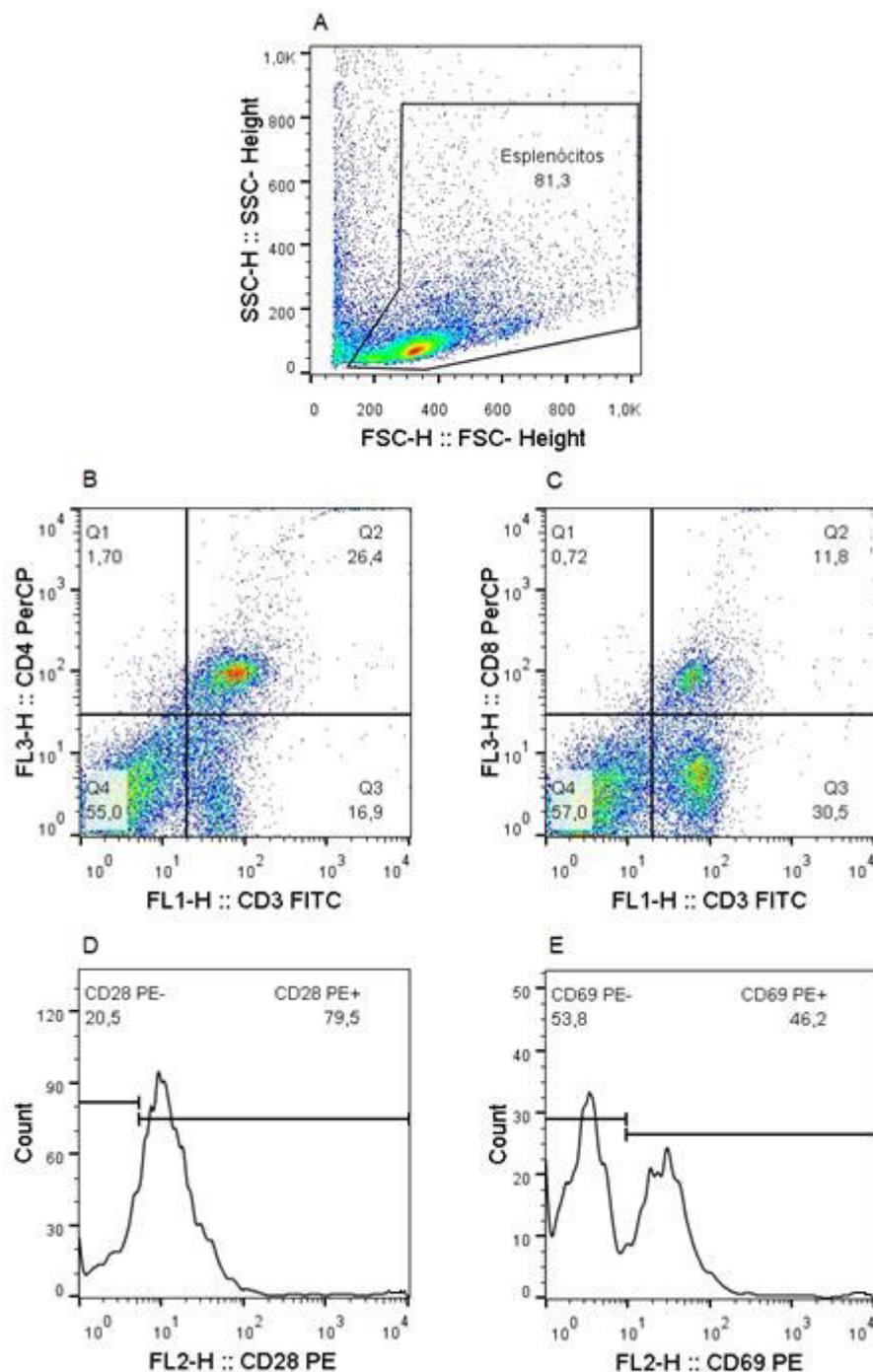
PerCP-Cy5.5; (BD Biosciences Pharmingen) (Quadro 1). Para cada painel foi realizada a marcação com os respectivos isotipos no *pool* de células. Para calibração do citômetro, foi realizado um *pool* de células, que foram utilizadas no controle branco (sem anticorpo conjugado) e três controles positivos 1, 2 e 3 (marcados com um anticorpo conjugado com fluorocromo da molécula mais expressa para seu canal correspondente).

**Quadro 1. Painéis para marcação das células do baço**

<b>FLUOROCROMO</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP</b>	<b>PerCP-Cy5.5</b>
<b>Linfócito T auxiliar</b>	<b>CD3</b>	<b>CD28</b>	<b>CD4</b>	<b>-</b>
<b>Linfócito T citotóxico</b>	<b>CD3</b>	<b>CD69</b>	<b>CD8</b>	<b>-</b>
<b>NKT e NK</b>	<b>CD3</b>	<b>CD49b</b>	<b>-</b>	<b>NK1.1</b>
<b>Linfócito B e macrófago</b>	<b>Iale</b>	<b>CD19</b>	<b>-</b>	<b>F4/80</b>

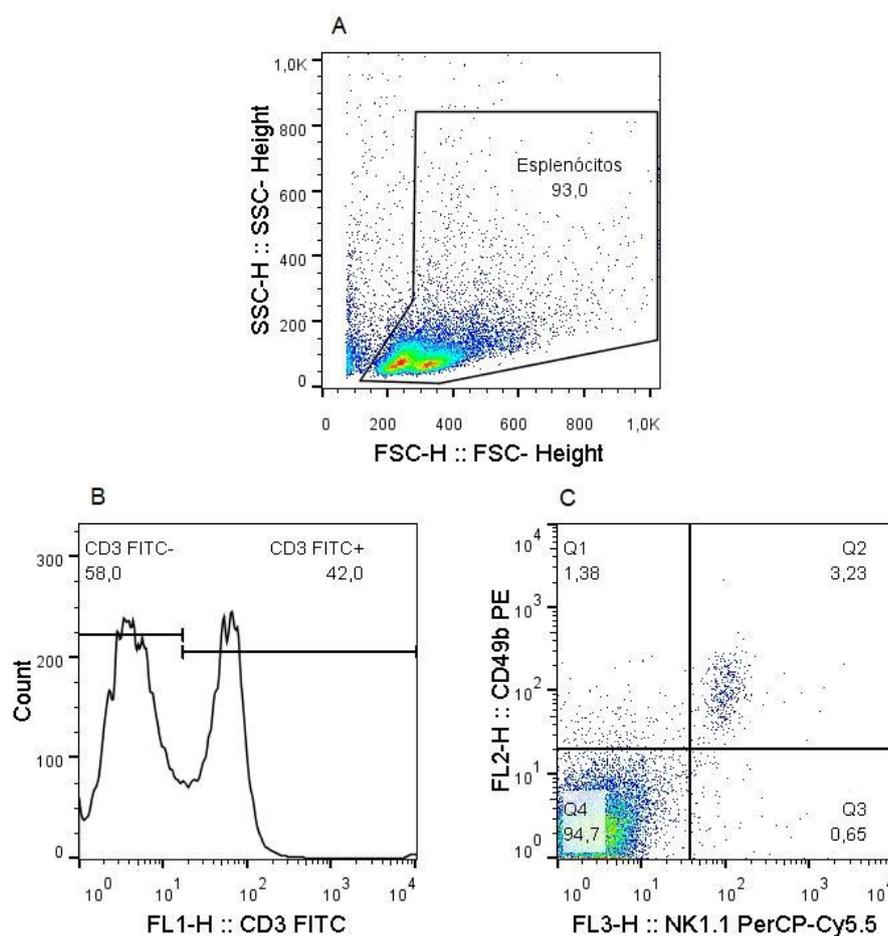
#### 4.8.1 Estratégia de análise

A estratégia de análise da imunofenotipagem das células do baço para cada painel se deu da seguinte maneira. Inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos esplenócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) (Figura 7A). Em seguida, para análise das subpopulações majoritárias de linfócitos T foram selecionados os parâmetros e as regiões duplo-positivas em CD3 (canal 1) versus CD4 (canal 3) para linfócitos T auxiliares (CD3+/CD4+) (Figura 7B) e CD3 (canal 1) versus CD8 (canal 3) para linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) (Figura 7C). Para avaliação da expressão das moléculas co-estimuladoras dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos foram selecionadas as regiões positivas para o CD28 no histograma baseado em CD28 (canal 2) e para o CD69 no histograma baseado em CD69 (canal 2) respectivamente (Figura 7D e E). Em cada população de linfócitos o valor relativo, absoluto e a média da intensidade de fluorescência (referente ao número total de células do baço) dos marcadores específicos foram definidos.



**Figura 7 – Estratégia de análise para identificação de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos do baço dos animais.** As células do baço foram obtidas dos animais inoculados (ou não) com tumor de Ehrlich e tratados (ou não) com ciclofosfamida (25mg/Kg, ip.). Para análise das células inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos esplenócitos no gráfico baseado em granulidade (SSC) versus tamanho (FSC) (7A). Para análise das subpopulações majoritárias de linfócitos T selecionou-se os parâmetros e as regiões duplo-positivas em CD3 (canal 1) versus CD4 (canal 3) para linfócitos T auxiliares (CD3+/CD4+) (Figura 7B) e CD3 (canal 1) versus CD8 (canal 3) para linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) (Figura 7C). Para avaliação da expressão das moléculas co-estimuladoras dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos foram selecionadas as regiões positivas para o CD28 no histograma baseado em CD28 (canal 2) e para o CD69 no histograma baseado em CD69 (canal 2) respectivamente (Figura 7D e E). Em cada população de linfócitos o valor relativo, absoluto e a média da intensidade de fluorescência (MFI) (referente ao número total de células do baço) dos marcadores específicos foram definidos.

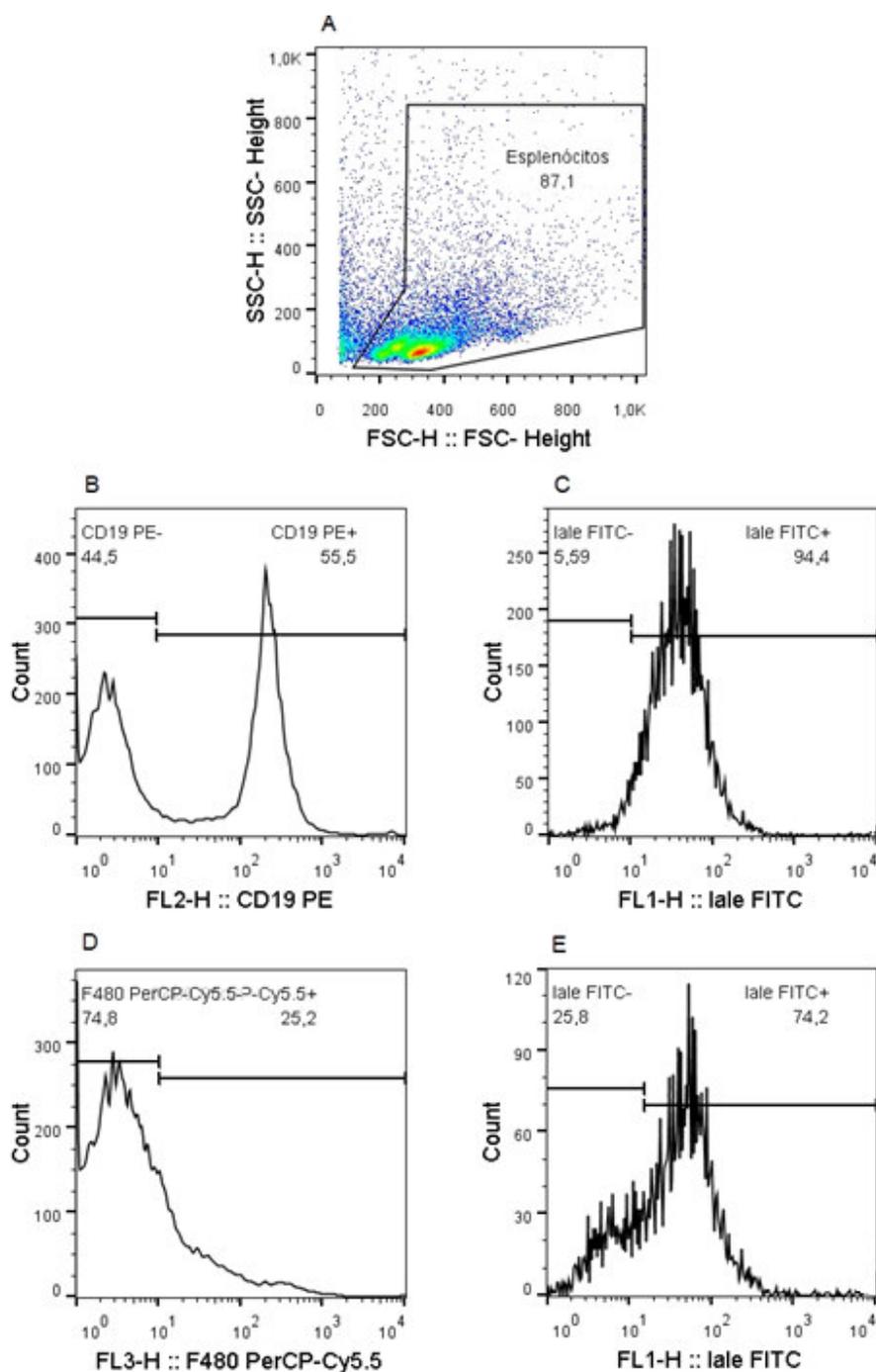
Para análise das células NK e NKT, inicialmente foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos esplenócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) (Figura 8A). Em seguida, foi feita a seleção da região negativa e positiva para CD3+, respectivamente no histograma baseado em CD3 (canal 1) (Figura 8B). Seguindo a análise para as células duplo positivas para CD49b e NK1.1 (Figuras 8C). Onde NK são CD3-CD49b+NK1.1+ e NKT são CD3+CD49b+NK1.1+. Nas populações de NK e NKT, o valor relativo, absoluto e a média da intensidade de fluorescência (referente ao número total de células do baço) dos marcadores específicos foram definidos.



**Figura 8 – Estratégia de análise para identificação de células NK e NKT do baço dos animais.**

As células do baço foram obtidas dos animais inoculados (ou não) com tumor de Ehrlich e tratados (ou não) com ciclofosfamida (25mg/Kg, intraperitoneal). As células foram marcadas com anticorpos específicos para células NK. Para análise de NK e NKT, inicialmente foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos esplenócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) (A). Em seguida, foi feita a seleção da região negativa e positiva para CD3+, respectivamente no histograma baseado em CD3 (canal 1) (B). Seguindo a análise para as células duplo positivas para CD49b e NK1.1 (C). Nas populações de NK e NKT, o valor relativo, absoluto e a média da intensidade de fluorescência (MFI) (referente ao número total de esplenócitos) dos marcadores específicos foram definidos.

Para análise dos linfócitos B e dos macrófagos, inicialmente foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos esplenócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) (Figura 9A). Para análise dos linfócitos B, foi feita a seleção da região positiva para CD19<sup>+</sup> no histograma baseado em CD19 (canal 2) (Figura 9B). Em seguida, foi avaliada a expressão do lale na região positiva para lale<sup>+</sup> no histograma baseado em lale (canal 1) (Figura 9C). Para análise dos macrófagos, foi feita a seleção da região positiva para F4/80<sup>+</sup> no histograma baseado em F4/80 (canal 3) (Figura 9D). Em seguida foi avaliada a expressão do lale na região positiva para lale<sup>+</sup> no histograma baseado em lale (canal 1) (Figura 9E). Em cada população obteve-se o valor relativo, absoluto e a média da intensidade de fluorescência (referente ao número total de células do baço) dos marcadores específicos.



**Figura 9 – Estratégia de análise para identificação de Linfócitos B e macrófagos do baço dos animais.** As células do baço foram obtidas dos animais inoculados (ou não) com tumor de Ehrlich e tratados (ou não) com ciclofosfamida (25mg/Kg, intraperitoneal). As células foram marcadas com anticorpos específicos para linfócitos B e macrófagos. Para análise das células inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos esplenócitos no gráfico baseado em granulidade (SSC) versus tamanho (FSC) (9A). Para análise dos linfócitos B foi feita a seleção da região positiva para CD19+ no histograma baseado em CD19 (canal 2) (Figura 9B). Em seguida, foi avaliada a expressão do lala na região positiva para lala+ no histograma baseado em lala (canal 1) (Figura 9C). Para análise dos macrófagos foi feita a seleção da região positiva para F4/80+ no histograma baseado em F4/80 (canal 3) (Figura 9D). Em seguida, foi avaliada a expressão do lala na região positiva para lala+ no histograma baseado em lala (canal 1) (Figura 9E). Em cada população obteve-se o valor relativo, absoluto e a média da intensidade de fluorescência (MFI) (referente ao número total de células do baço) dos marcadores específicos.

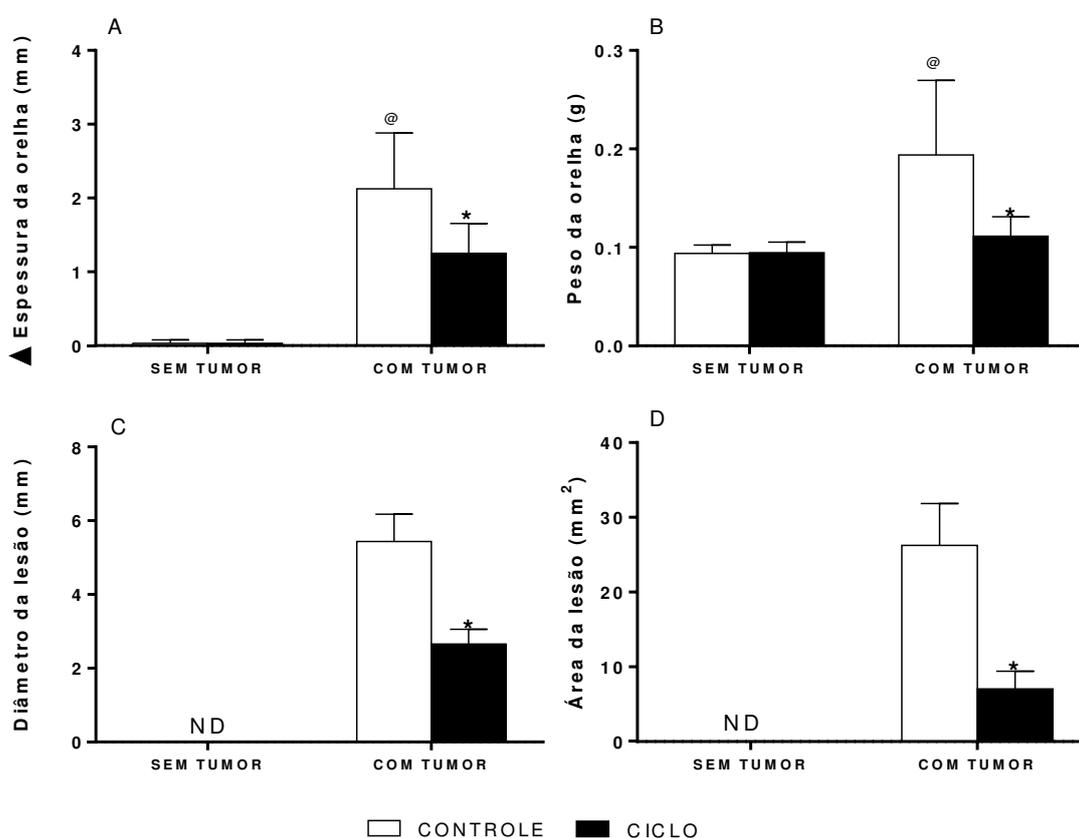
#### **4.9 Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando Software Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (S.D). A normalidade foi avaliada pelo teste Kolmogorov - Smirnov. O teste *t* de Student foi utilizado e o nível de significância foi de 5% (um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo).

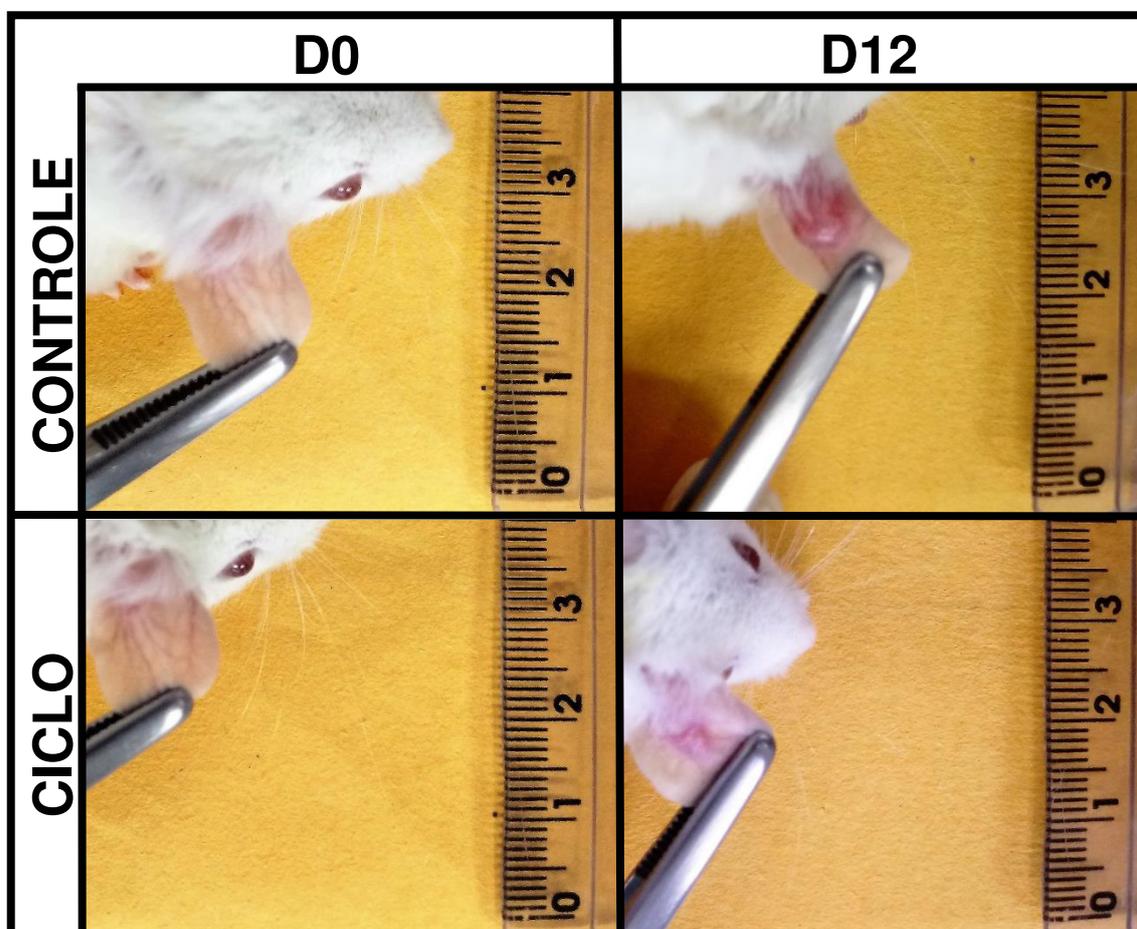
## 5 RESULTADOS

### 5.1 O tratamento com ciclofosfamida diminui lesão da orelha de camundongos com tumor de Ehrlich sólido (TES).

O tratamento com ciclofosfamida não causou alterações na orelha do grupo sem tumor. Entretanto, no grupo com TES, essa droga induziu a diminuição da espessura (Figura 10A) e peso da orelha (Figura 10B). Além disso, induziu a diminuição do diâmetro (Figura 10C) e área da lesão (Figura 10D). A Figura 11 mostra imagens da orelha no dia 0 e progressão da lesão no dia 12, de cada grupo com tumor.



**Figura 10. Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre a espessura (A), o peso da orelha (B), o diâmetro (C) e a área da lesão (D).** No dia 0, os animais receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO), com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e a orelha foi retirada. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=7/grupo). ND do inglês *NOT DONE*- Não feito. \*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE. @p<0,05 quando comparado ao grupo CONTROLE sem tumor.



**Figura 11 – Efeito do tratamento com ciclofosfamida na orelha com tumor.** No dia 0, os animais receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO), com uma dose diária de 25mg/kg, ip. do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. As orelhas foram fotografadas com câmera de 8 Megapixels, nos dias zero (D0) e doze (D12).

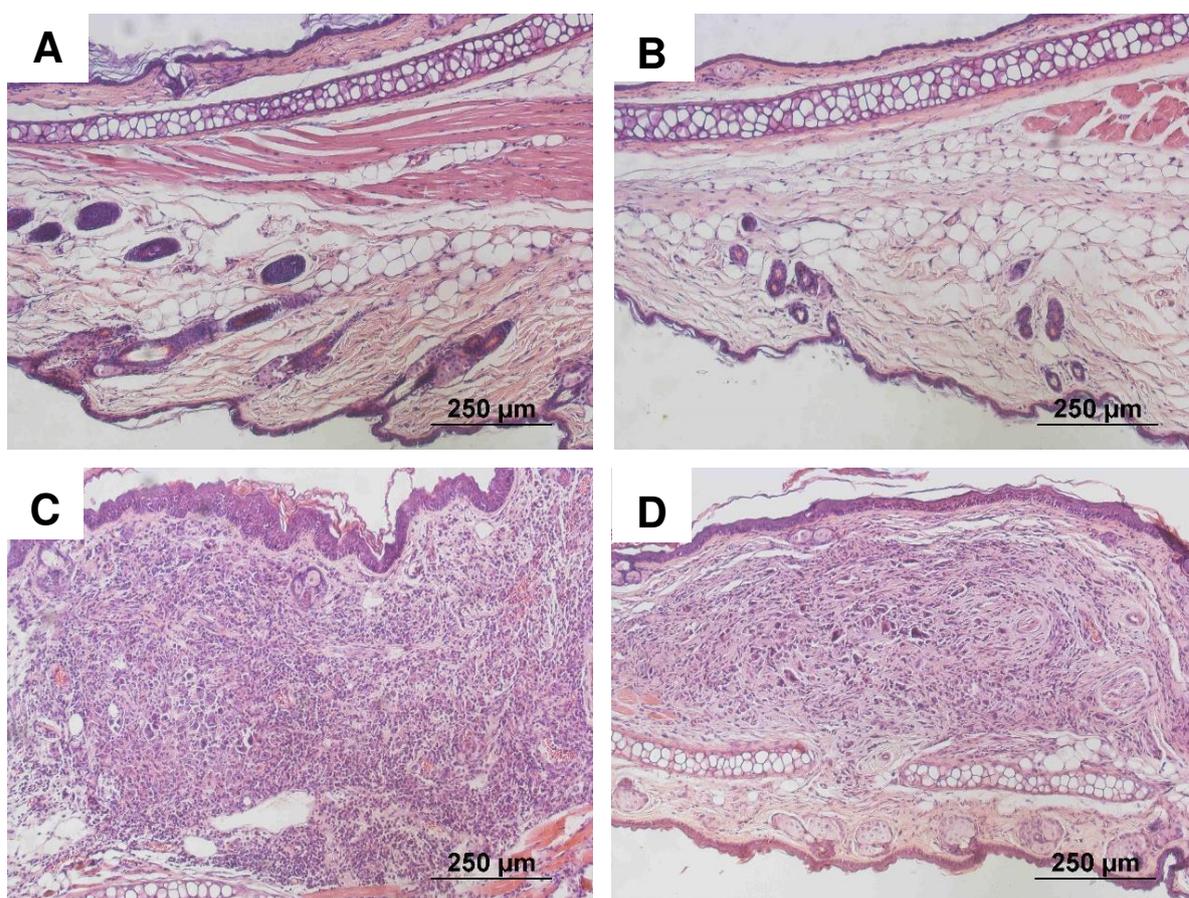
## 5.2 O tratamento com ciclofosfamida diminui células tumorais, infiltrado inflamatório e necrose da orelha de camundongos com TES.

Os dados referentes ao laudo histopatológico da orelha dos animais tratados (ou não) com ciclofosfamida estão descritos na Tabela 1. O tratamento com ciclofosfamida não causou alterações histológicas na orelha do grupo sem tumor (Figura 12A e B), nas orelhas com tumor, pôde-se observar a diminuição da lesão (Figura 12C e D). No grupo com TES, o tratamento com ciclofosfamida induziu a diminuição do número das células tumorais e do infiltrado inflamatório (Figura 13A e B) e da necrose (Figura 14A e B).

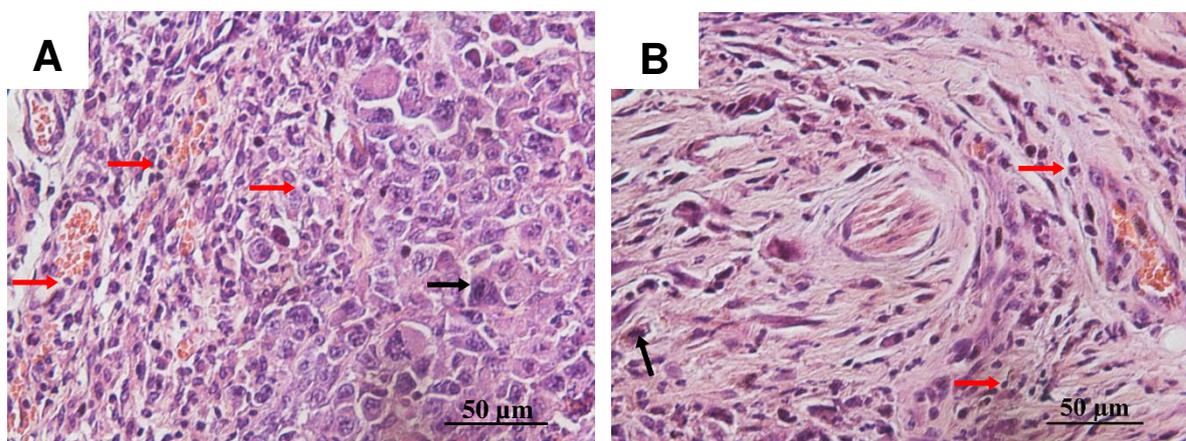
**Tabela 1 – Escore clínico da orelha de camundongos com tumor de Ehrlich (ou não) e tratados (ou não) com ciclofosfamida.**

Grupo	GRUPOS			
	SEM TUMOR		COM TUMOR	
	CONTROLE	CICLO	CONTROLE	CICLO
<b>Células tumorais</b>	0	0	2,6±0,5	1,7±0,8*
<b>Edema</b>	0	0	2,5±0,8	1,6±1,0
<b>Infiltrado</b>	0	0	2,5±0,5	1,6±0,5*
<b>Angiogênese</b>	0	0	1,1±0,1	1,1±0,4
<b>Necrose</b>	0	0	1,2±0,4	0,5±0,5*

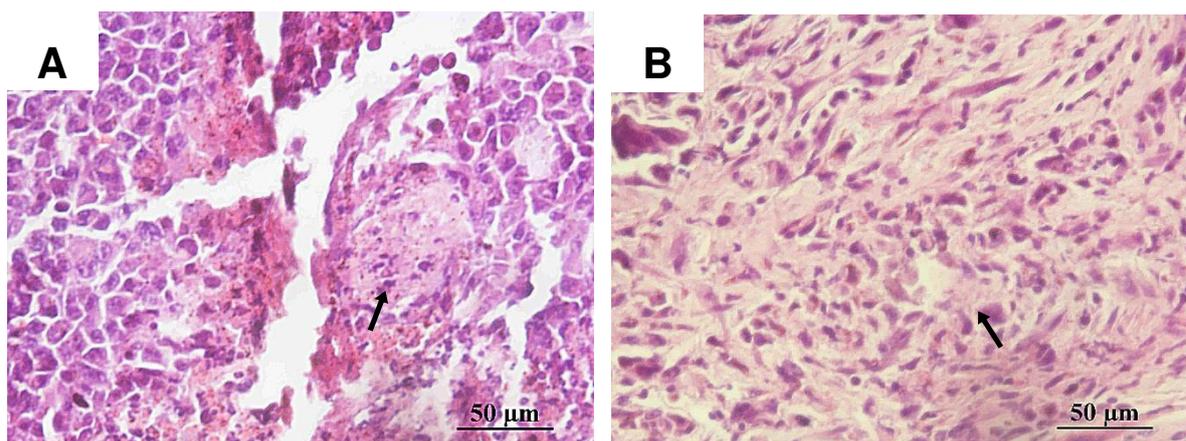
No dia 0, os animais receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO), com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e a orelha foi retirada. Os valores representam média ± desvio padrão (n=7/grupo). \*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE.



**Figura 12. Fotomicrografia da orelha de camundongos com ou sem tumor de Ehrlich e tratados ou não com ciclofosfamida.** As imagens, representam cortes histológicos da orelha 12 dias após a inoculação de tumor ou PBS, corados hematoxilina-eosina e analisados em aumento de 100x. A: CONTROLE sem tumor; B: CICLO sem tumor; C: CONTROLE com tumor; D: CICLO com tumor.



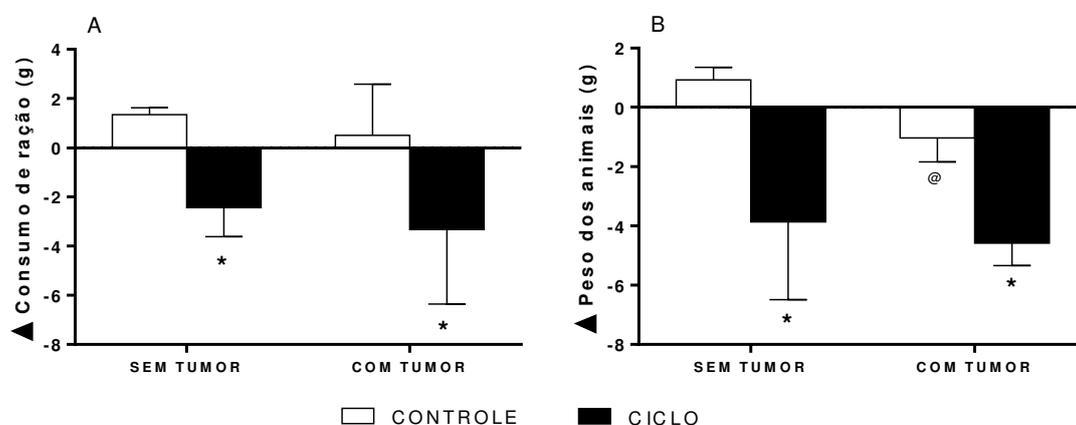
**Figura 13. Fotomicrografia da orelha de camundongos com tumor de Ehrlich tratados ou não com ciclofosfamida.** As imagens, com ênfase nas células tumorais (indicadas por seta preta) e infiltrado inflamatório (indicado por seta vermelha) representam cortes histológicos da orelha direita 12 dias após a inoculação do tumor de Ehrlich de animais tratados com corados por hematoxilina-eosina e analisados em aumento de 400x. A: CONTROLE; B: CICLO.



**Figura 14. Fotomicrografia da orelha de camundongos com tumor de Ehrlich tratados ou não com ciclofosfamida.** As imagens, com ênfase na necrose (indicada por seta preta), representam cortes histológicos da orelha direita 12 dias após a inoculação do tumor de Ehrlich, corados por hematoxilina-eosina e analisados em aumento de 400x. A: CONTROLE; B: CICLO.

### 5.3 O tratamento com ciclofosfamida diminui o consumo de ração e o peso de camundongos com TES.

O TES diminuiu apenas o peso dos animais (Figura 15B). O tratamento com ciclofosfamida induziu a diminuição do consumo de ração (Figura 15A) e do peso corporal (Figura 15B), nos animais com e sem tumor.



**Figura 15. Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o consumo de ração (A) e o peso corporal.** No dia 0, os animais receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO), com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. O peso dos animais e o consumo de ração foram mensurados com auxílio de balança analítica no dia 0 e 12. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=7/grupo). \*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE. @p<0,05 quando comparado ao grupo CONTROLE sem tumor.

### 5.4 O tratamento com ciclofosfamida causa leucopenia em camundongos com TES.

O TES causou leucocitose, com aumento do número de neutrófilos, linfócitos e monócitos do sangue. O tratamento com ciclofosfamida promoveu uma leucopenia com redução do número de todas as populações analisadas, tanto no grupo sem tumor, quanto no grupo com tumor (Tabela 2).

**Tabela 2 - Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos com tumor de Ehrlich (ou não) e tratados (ou não) com ciclofosfamida.**

Células (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	GRUPOS			
	SEM TUMOR		COM TUMOR	
	CONTROLE	CICLO	CONTROLE	CICLO
<b>Leucócitos</b>	3.2±1.3	0.7±0.4*	7.5±1.4@	1.0±0.3*
<b>Neutrófilos</b>	1.8±1.0	0.2±0.1*	2.6±1.3@	0.2±0.1*
<b>Linfócitos</b>	1.3±0.7	0.4±0.3*	4.7±2.0@	0.7±0.3*
<b>Monócitos</b>	0.04±0.02	0.02±0.01*	0.11±0.08@	0.01±0.01*

No dia 0, os animais receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO), com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e o sangue coletado do plexo orbital. Os valores representam média ± desvio padrão (n=7/grupo). \*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE. @p<0,05 quando comparado ao grupo CONTROLE sem tumor.

### 5.5 O tratamento com ciclofosfamida causa aplasia medular em camundongos com TES.

O TES não alterou a celularidade da medula dos camundongos. Entretanto, o tratamento com ciclofosfamida induziu aplasia medular nos animais com e sem tumor (Tabela 3).

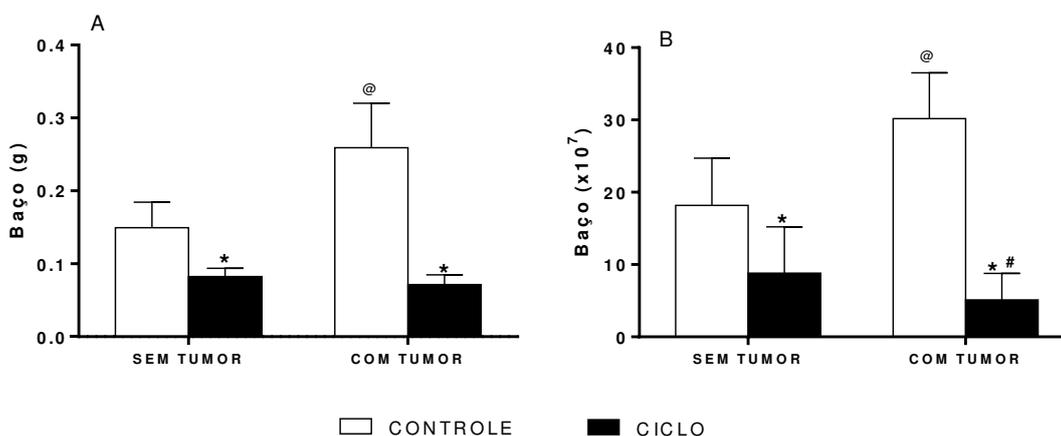
**Tabela 3 – Celularidade da medula de camundongos com tumor de Ehrlich (ou não) e tratados (ou não) com ciclofosfamida.**

	GRUPOS			
	SEM TUMOR		COM TUMOR	
	CONTROLE	CICLO	CONTROLE	CICLO
<b>Medula</b> (x10 <sup>5</sup> mL)	5.5±0.7	2.0±1.4*	5.7±2.5	1.7±0.9*

No dia 0, os animais receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO), com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e a medula obtida do fêmur direito. Os valores representam média ± desvio padrão (n=7/grupo). \*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE.

## 5.6 O tratamento com ciclofosfamida diminui peso e celularidade do baço de camundongos com TES.

O TES aumentou o peso e celularidade do baço (Figura 16A e B). O tratamento com ciclofosfamida induziu diminuição do peso (Figura 16A) e da celularidade esplênica (Figura 16A e B). Entretanto, no grupo com tumor tratado com ciclofosfamida houve uma redução da celularidade do baço mais acentuada que nos animais sadios e tratados por esse fármaco (Figura 16B).



**Figura 16. Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o peso (A) e a celularidade (B) do baço.** No dia 0, os animais receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO), com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e o baço foi retirado. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=7/grupo). \*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE. @p<0,05 quando comparado ao grupo CONTROLE sem tumor. #p<0,05 quando comparado ao grupo CICLO sem tumor.

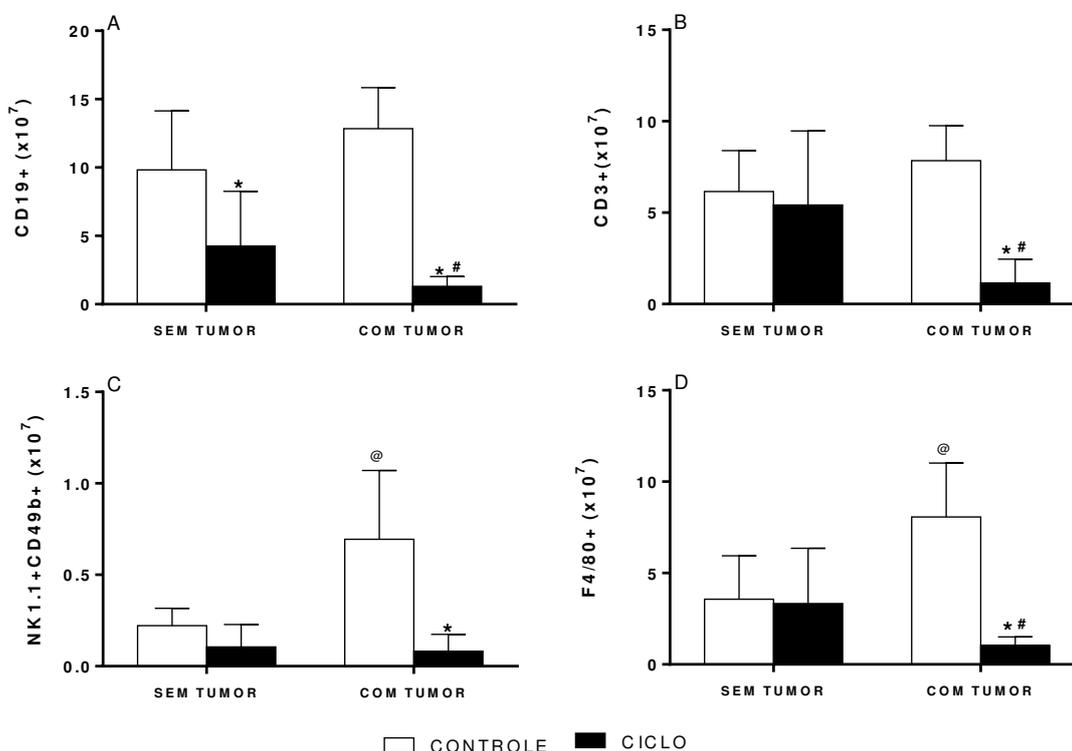
## 5.7 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de linfócitos B, T e macrófagos do baço de camundongos com TES.

O TES não alterou o número de linfócitos B (Figura 17A) e linfócitos T (Figura 17B), mas induziu aumento do número de células NK (Figura 17C) e macrófagos no baço (Figura 17D).

A ciclofosfamida, por sua vez, diminuiu o número de linfócitos B (Figura 17A), mas não alterou o número de linfócitos T (Figura 17B), células NK (Figura 17C) e macrófagos (Figura 17D), nos animais sem tumor.

Nos animais com tumor, a ciclofosfamida reduziu o número de todas as populações analisadas quando comparado ao grupo controle com tumor (Figura

17A, B, C e D). Além disso, esse fármaco induziu uma redução do número de linfócitos B (Figura 17A), T (Figura 17B) e macrófagos (Figura 17D), quando comparados os animais com tumor aos sem tumor.



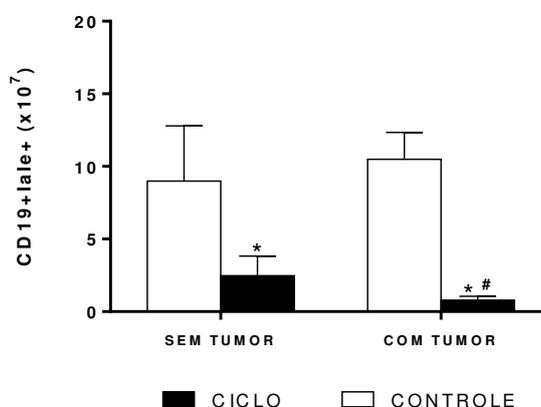
**Figura 17 – Caracterização fenotípica dos esplenócitos de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO).** As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0, receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não com ciclofosfamida, com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e o baço foi retirado. Os esplenócitos foram marcados com anticorpos específicos e foram analisadas as frequências absolutas (A, B, C e D). Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=7$ /grupo). \* $p<0,05$  quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE. @ $p<0,05$  quando comparado ao grupo CONTROLE sem tumor. # $p<0,05$  quando comparado ao grupo CICLO sem tumor.

### 5.8 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de linfócitos B que expressam lale do baço de camundongos com TES.

O TES não causou alteração no número de linfócitos B que expressam lale (molécula de apresentação de antígeno) (Figura 18).

A ciclofosfamida, por sua vez, induziu a diminuição do número dessas células nos animais sem tumor (Figura 18).

Nos animais com tumor, a ciclofosfamida causou a diminuição do número dos linfócitos B que expressam I $\alpha$ e (Figura 18). Além disso, esse fármaco causou a diminuição dessas células quando comparados os animais com tumor aos sem tumor (Figura 18).

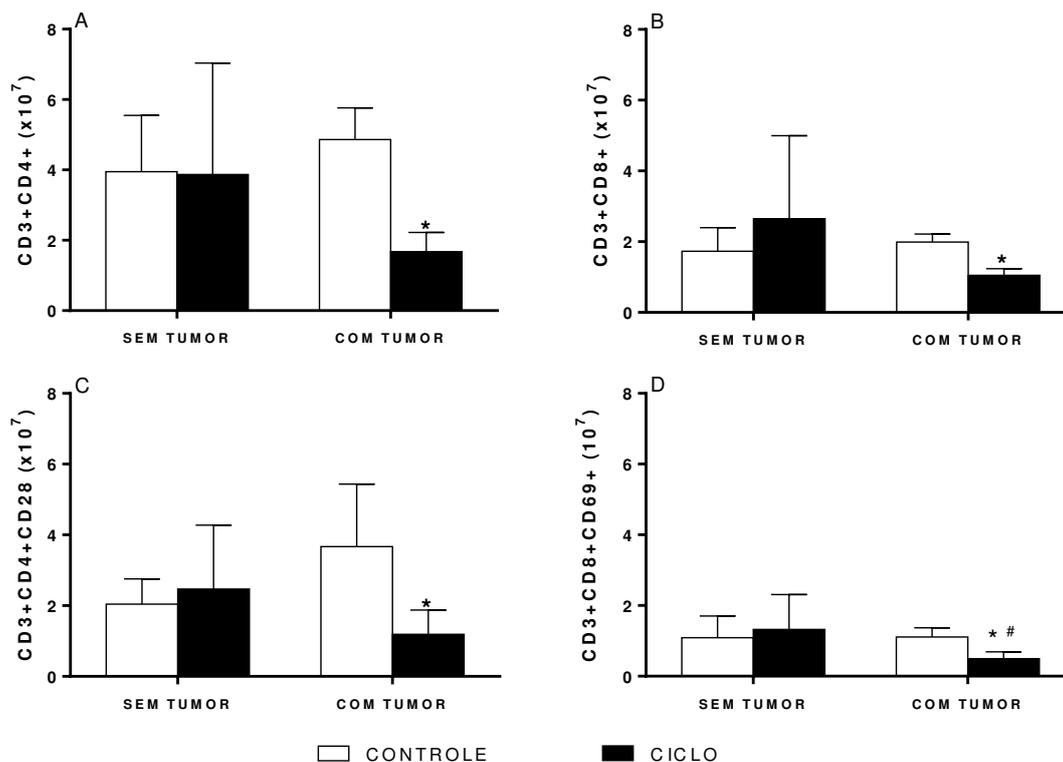


**Figura 18 – Caracterização fenotípica dos linfócitos B do baço de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO).** As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0, receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não com ciclofosfamida, com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e o baço foi retirado. Os esplenócitos foram marcados com anticorpos específicos e foi analisada a frequência absoluta dos linfócitos B que expressam I $\alpha$ e. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=7/grupo). \*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE. #p<0,05 quando comparado ao grupo CICLO sem tumor.

### 5.9 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de linfócitos T do baço de camundongos com TES.

O tratamento com ciclofosfamida não alterou o número de linfócitos T CD4 (Figura 19A) e linfócitos T CD8 (Figura 19B). Da mesma forma, não houve alteração no número dessas células ativadas (Figura 19AC e D). O tumor, por si só, não interferiu nas populações de T analisadas (Figura 19A, B, C e D).

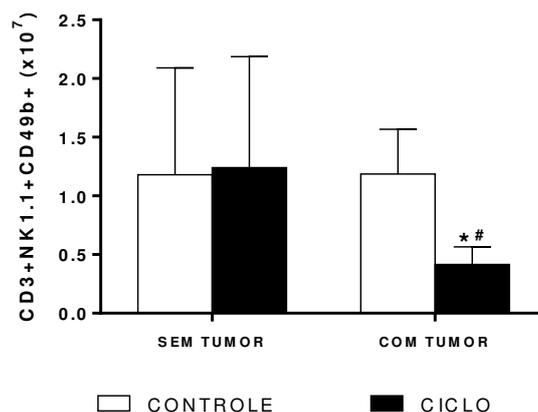
Entretanto, a ciclofosfamida, nos animais portadores de tumor, induziu redução de linfócitos CD4 (Figura 19A) e CD8 (Figura 19B), bem como o número dessas células ativadas (Figura 19C e D). Além disso, esse fármaco, nos animais portadores de tumor, induziu a diminuição do número de linfócitos CD8 ativados quando comparados aos animais sem tumor (Figura 19D).



**Figura 19 – Caracterização fenotípica dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos do baço de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não (CONTROLE) ciclofosfamida (CICLO).** As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0, receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não com ciclofosfamida, com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e o baço foi retirado. Os esplenócitos foram marcados com anticorpos específicos e foram analisadas as frequências absolutas de linfócitos T CD4 (A) e de linfócitos T CD8 (B) bem como dos que expressam CD28 (C) ou CD69 (D). Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=7$ /grupo). \* $p < 0,05$  quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE.

### 5.10 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de NKT do baço de camundongos com TES.

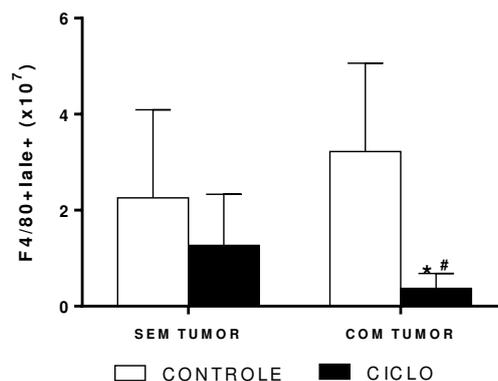
O TES não causou qualquer alteração na população de células NKT do baço (Figura 20). O tratamento com ciclofosfamida não alterou o número dessas células no grupo sem tumor, mas o diminuiu no grupo com tumor (Figura 20). Além disso, houve uma diminuição significativa dessas células quando comparados os animais com e sem tumor, ambos tratados com ciclofosfamida (Figura 20).



**Figura 20 – Caracterização fenotípica das células NKT do baço de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO).** As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0, receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não com ciclofosfamida, com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e o baço foi retirado. Os esplenócitos foram marcados com anticorpos específicos e foram analisadas a frequência absoluta. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=7/grupo). \*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE. #p<0,05 quando comparado ao grupo CICLO sem tumor.

### 5.11 O tratamento com ciclofosfamida diminui o número de macrófagos do baço de camundongos com TES.

O TES não causou qualquer alteração na população de macrófagos que expressam I-A do baço (Figura 21). O tratamento com ciclofosfamida não alterou o número dessas células nos animais sem tumor, mas o diminuiu no grupo com tumor (Figura 21). Além disso, houve uma diminuição significativa dessas células quando comparados os animais com e sem tumor, ambos tratados com ciclofosfamida (Figura 21).

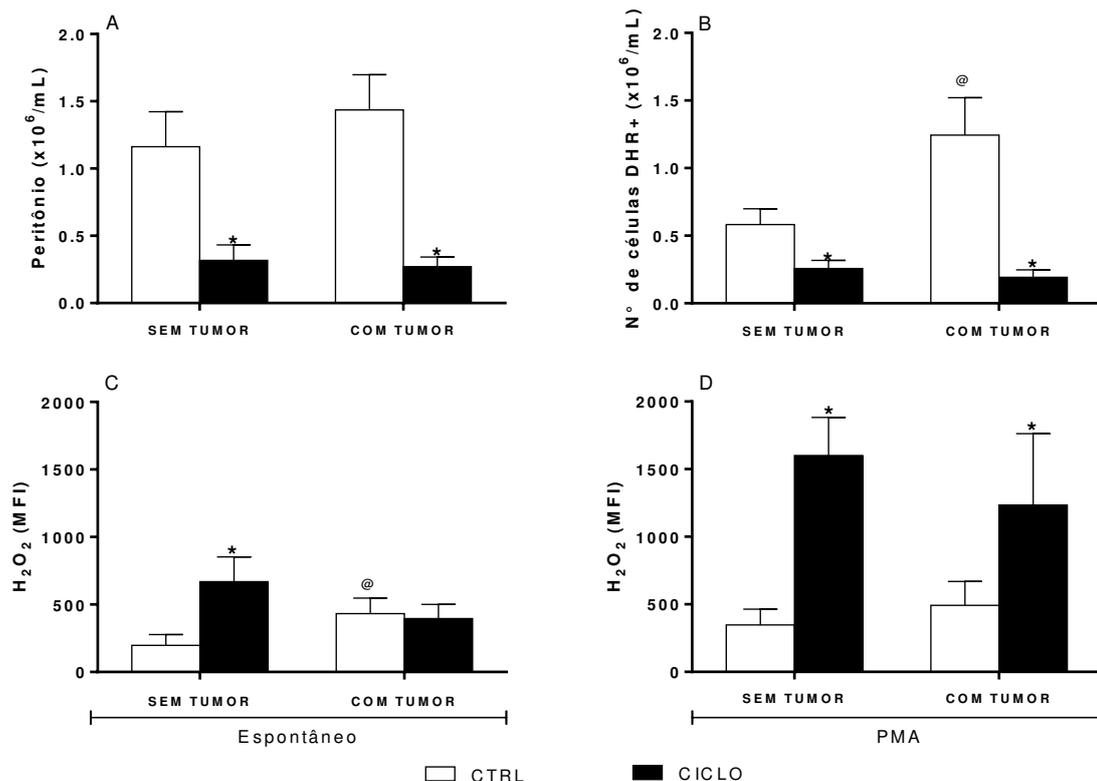


**Figura 21 – Caracterização fenotípica dos macrófagos do baço de camundongos portadores ou não de tumor de Ehrlich e tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO).** As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0, receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não com ciclofosfamida, com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e o baço foi retirado. Os esplenócitos foram marcados com anticorpos específicos e foi analisada a frequência absoluta dos macrófagos que expressam IaIe. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=7/grupo). \*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE. #p<0,05 quando comparado ao grupo CICLO sem tumor.

### **5.12 O tratamento com ciclofosfamida diminui a celularidade da cavidade peritoneal e aumenta a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por essas células, após estímulo em camundongos com TES.**

O TES não alterou a celularidade (Figura 22A), mas aumentou o número das células produtoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 22B), bem como a produção média espontânea dessa molécula (Figura 22C). Entretanto não alterou a produção após estímulo.

O tratamento com ciclofosfamida causou diminuição do número de células da cavidade peritoneal (Figura 22A), bem como as que produzem espontaneamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 22B). Porém, aumentou a produção média espontânea e estimulada no grupo sem tumor. Entretanto, no grupo com tumor, essa droga induziu o aumento apenas após estímulo (Figura 22C).



**Figura 22- Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o número de células do peritônio (A), o número dessas que produzem espontaneamente peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (B) e a intensidade de fluorescência média (MFI) espontânea (C) e estimulada (D).** A produção foi feita a partir do método DHR e avaliada em citômetro de fluxo nas células do peritônio ( $1 \times 10^6$ /mL), as quais foram obtidas dos animais que, no dia 0 receberam (ou não) o inóculo do tumor de Ehrlich na orelha direita. Os grupos sem tumor receberam PBS. A partir do segundo dia foram tratados ou não (CONTROLE) com ciclofosfamida (CICLO), com uma dose diária de 25mg/kg, ip., do dia 2 ao dia 11 após o inóculo. Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia e o baço foi retirado. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=7$ /grupo). \* $p < 0,05$  quando comparado ao respectivo grupo CONTROLE. @ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo CONTROLE sem tumor.

## 6 DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste trabalho mostram que o tratamento com a ciclofosfamida apresentou efeito antineoplásico em animais portadores de tumor de Ehrlich sólido (TES) na orelha, além de diminuir infiltrado inflamatório e necrose. Além disso, causou efeito imunossupressor em animais com ou sem tumor, induzindo a diminuição da produção e proliferação das células do sistema imune, e no número das células circulantes, sendo a imunossupressão mais intensa em animais com TES, pela redução de linfócitos B, linfócitos T citotóxicos ativados, células NKT e macrófagos. A ciclofosfamida também diminuiu o recrutamento no peritônio, porém não alterou a capacidade de ativação das células desta cavidade.

O TES é caracterizado por ser um tumor inflamatório e por possuir um infiltrado intenso de células mono e polimorfonucleares (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992; REIS, 2012). Porém, o tratamento com a ciclofosfamida reduziu o número de células do sistema imune no local da lesão. Isso pode ter ocorrido pelo fato de ter menos células desse sistema sendo produzidas e circulando no sangue.

Também foram observadas extensas áreas de necrose nos cortes histológicos do grupo com TES. De fato, sabendo que a taxa de crescimento desse tumor é alta, isso aumenta também a competição por nutrientes, e a falta deles pode induzir a morte das células tumorais por necrose (CHAABANE et al., 2013). Porém, como a ciclofosfamida diminuiu a progressão tumoral, sugere-se que isso pode ter reduzido esse tipo de morte celular nos animais com tumor e tratados por esse fármaco. Essa diminuição, associada à redução das células tumorais e do sistema imune, explica o porquê da diminuição do peso e espessura da orelha com tumor, bem como o diâmetro e área da lesão.

Após confirmar o efeito antitumoral desse fármaco para o modelo de câncer experimental utilizado, seguiu-se para a análise do efeito imunossupressor na presença do tumor, bem como em animais saudáveis. Um parâmetro considerável para um quadro de imunossupressão é a nutrição e condição física. Há evidências claras de que a ativação de células imunes é um processo bioenergeticamente desafiador e que nutrientes e oxigênio disponíveis podem se tornar limitantes da taxa de ativação (PEARCE et al., 2013). Além disso, em um contexto de câncer a competição entre tumor, células imunossupressoras e células efetoras imunes, por recursos limitados, podem contribuir para a imunossupressão (REPASKY; ENG;

HYLANDER, 2015). E a diminuição de ingestão de nutrientes, bem como o câncer podem promover um intenso consumo generalizado dos tecidos corporais, muscular e adiposo, com uma perda progressiva e involuntária de peso, anemia, disfunção imune e alterações metabólicas, geralmente associadas à anorexia: caquexia (SILVA, 2006; SOLHEIM et al., 2014).

Como descrito na literatura, a ciclofosfamida pode contribuir para essa condição nutricional, pois pode causar alteração do paladar, refletindo numa diminuição do consumo de ração e conseqüentemente uma diminuição do peso corporal (DE JORGE et al., 2005; DIEHL et al., 2017). No modelo caracterizado neste estudo, foram constatados esses efeitos adversos, pois em ambos os grupos, essa droga causou a diminuição desses parâmetros. Ressalta-se que já houve relato mostrando que o TES causa redução do percentual de gordura e pró-catabolismo devido ao estado pró-inflamatório mais elevado (FRAJACOMO et al., 2016). Isso pode explicar porque neste estudo o TES causou perda de peso sem diminuir o consumo de ração.

Além da influência da condição nutricional, um parâmetro que caracteriza imunossupressão é a diminuição da celularidade do sistema imune. O TES não alterou a produção dessas células na medula, porém houve um aumento na proliferação no baço e o conseqüente aumento na circulação sanguínea. A inflamação é uma característica desse tipo de tumor; o mesmo promove o aumento da celularidade do sistema imune em órgãos linfóides secundários e, conseqüentemente, aumento no sangue e infiltrado inflamatório intenso (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992; REIS, 2012). Este aumento da celularidade pode estar relacionado a uma ativação do sistema imune (ARAÚJO et al., 2010; ASSUNÇÃO, 2011). Por outro lado, o tumor de Ehrlich tem a capacidade de induzir hematopoese extramedular com esplenomegalia (RUIZ DE MORALES, VÉLEZ, SUBIZA, 1999), e que essa grande quantidade de células do baço pode não estar relacionada a uma efetivação da resposta imunológica. Esse aumento pode ser decorrente da proliferação e/ou migração de células imaturas ou supressoras (LIU et al., 2007). Reis (2012) mostrou que o tumor de Ehrlich sólido na orelha induziu a expansão de células mielóides supressoras.

Porém, o tratamento com a ciclofosfamida induziu a diminuição da produção medular e da celularidade do baço, que culminou na diminuição dessas células na circulação sanguínea, bem como na migração para o local do tumor. Essa diminuição

no sangue e nos órgãos linfóides também foi encontrada em estudo realizado com esse fármaco na mesma dosagem e duração de tratamento em camundongos *Swiss* sadios (GNANASEKARAN; SAKTHIVEL; CHANDRASEKARAN, 2015). A ciclofosfamida pode causar essa supressão em animais sadios ou com TES, devido a sua ação no DNA celular, bloqueando a divisão e, conseqüentemente, impedindo proliferação ou a reposição do número das células. Dessa forma, esse fármaco atua em células com alto poder de proliferação, como as do sistema imune, quer seja fisiologicamente, quer seja na alta proliferação, como na presença de TES (AHLMANN; HEMPEL, 2016).

Entretanto, embora a supressão esplênica, causada pela ciclofosfamida, esteja presente em animais com e sem TES, nos animais com tumor, a contagem de células no baço foi significativamente menor que nos animais sadios. Porém, não se deve associar esse fato a uma diminuição mais acentuada na proliferação no grupo com tumor, já que o TES causa hiperplasia e esplenomegalia (RUIZ DE MORALES, VÉLEZ, SUBIZA, 1999), como confirmado neste trabalho. Sugere-se que essa celularidade menor foi devido à migração das células do baço para a corrente sanguínea, e dessa, células migraram para o local do tumor, contribuindo para a composição do infiltrado inflamatório.

Diante dessa atuação do TES e da ciclofosfamida no baço, foram analisadas populações específicas. Analisando o que o tumor poderia ter alterado dentro das populações estudadas, verificou-se que o mesmo induziu o aumento de macrófagos e células NK, corroborando com o mostrado na literatura sobre a resposta imunológica frente a esse tipo de câncer, que sugere que o controle do tumor de Ehrlich está mais relacionado com a resposta imune inata que com a imunidade adaptativa mediada por células T (CHEN, WATKINS, 1970).

A ciclofosfamida, isoladamente, causou a diminuição de linfócitos B. Embora não se tenha uma explicação para isso, estudos mostram que a ciclofosfamida pode apresentar, como efeito inicial, o comprometimento, depleção de linfócitos B (HALL; OHNO; PRIBNOW, 1977; MADONDO; QUINN; PLEBANSKI, 2016) e que as células T, que são as células CD3+, são menos sensíveis aos efeitos dessa droga (STEVENSON; FAUCI, 1980).

No entanto, os animais com tumor, tratados com ciclofosfamida, apresentaram números reduzidos de todos os tipos celulares analisados no baço após tratamento com esse fármaco, enquanto que nos animais sem tumor houve a diminuição apenas

do número de linfócitos B, em relação ao controle sem tumor. Isso pode ser entendido, pelo fato que, nos animais sem tumor e não tratados, as células estão proliferando fisiologicamente, porém nos animais com TES a proliferação é maior. Por isso, quando comparados aos animais tratados pela ciclofosfamida há muitas populações sendo afetadas, pois a ação da ciclofosfamida é mais perceptível em células que normalmente se dividem mais vezes, em um mesmo espaço de tempo (HALES, 1982; SHULMAN, 1993; DE JONGE et al., 2005), o que acontece no baço dos animais com TES.

Sabendo que nos animais com TES e tratados com ciclofosfamida, a diminuição do número de esplenócitos foi mais acentuada que nos sadios tratados por esse fármaco, analisou-se quais populações foram afetadas. Dentre elas estão os linfócitos T citotóxicos ativados e células NKT, células que podem desempenhar funções importantes contra o desenvolvimento tumoral (KRIJGSMAN et al., 2018; ZIAI et al., 2018), podendo ter migrado para o local do tumor. Além dessas células, os macrófagos e os linfócitos B também diminuíram no baço. Esses podem apresentar funções opostas frente ao câncer (SICA et al., 2008; LAOUI et al., 2011; SHEN et al., 2016), contudo, independentemente do tipo de ativação, eles também podem compor o infiltrado de tumores (MANTOVANI et al., 2011; HAO et al., 2012; MILIGY et al., 2017) e podem ter migrado para o ambiente tumoral.

Diante da diminuição do número de macrófagos no baço dos animais com tumor após tratamento com ciclofosfamida, surgiu o interesse de investigar as células do peritônio, cavidade essa que contém macrófagos, e também por ter sido o local do tratamento, permitindo verificar o efeito direto da ciclofosfamida na celularidade, bem como na ativação das células peritoneias, pois a diminuição ou inibição de mecanismos imunes também caracterizam imunossupressão (PEARCE et al., 2013). Um dos parâmetros para avaliação do estado funcional de fagócitos é a determinação da produção de espécies reativas liberadas por estas células, representando importante mecanismo molecular com alto potencial citotóxico e inflamatório (TAN et al., 2016).

O TES não alterou a celularidade do peritônio, mas aumentou o número de células produtoras de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ou seja, o tumor aumentou o número de células com capacidade oxidativa. Isso demonstra que o efeito inflamatório do TES não se limita apenas ao local de desenvolvimento, mas em local distante do foco tumoral. A ciclofosfamida, por sua vez, diminuiu a celularidade

peritoneal e o número de células produtoras de  $H_2O_2$ , tanto nos animais com ou sem tumor. Acredita-se que um dos motivos para isso seja porque essa droga causou redução de células em órgãos linfóides, sangue e nessa cavidade também não seria diferente. Por isso, a diferença no grupo com tumor foi mais intensa em relação ao seu controle, que nos animais saudáveis.

Diante da diminuição do número das células que produzem peróxido de hidrogênio espontaneamente, analisou-se a produção média dessa espécie reativa de oxigênio. A ciclofosfamida aumentou a produção espontânea média do peróxido de hidrogênio, bem como a estimulada nos animais sem tumor. Esse potencial oxidativo é possível pela exposição de células a acroleína (um dos derivados ativos da ciclofosfamida), que pode provocar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e da ativação das vias de sinalização pró-inflamatórias (LIU et al., 2012).

No grupo com tumor, essa droga não alterou espontaneamente essa produção, mas ao serem estimuladas, as células se mostraram responsivas e aumentaram significativamente a produção dessa espécie reativa. O tumor pode ter induzido uma resposta dos fagócitos e os mesmos podem ter saturado e se apresentado anérgicos, pois o TES alterou a produção média espontânea de  $H_2O_2$ , mas não a aumentou após estímulo. Sugerindo que mesmo em um ambiente tumoral a ciclofosfamida é capaz de pré-ativar as células, sendo ativadas somente após estímulo. Embora esse fármaco pré-ative essas células, o número delas é tão pequeno, que o efeito não possui significância, prevalecendo o efeito imunossupressor causado pela escassez da celularidade imune em todos os locais do organismo.

Dessa maneira, nossos resultados apoiam a ideia preliminar de que, além da ação antineoplásica, a ciclofosfamida apresenta efeito imunossupressor, e que na presença do tumor de Ehrlich sólido esse efeito é mais intenso no baço. Portanto, o protocolo, caracterizado neste trabalho, pode ser utilizado como modelo de imunossupressão para diversos fins de pesquisa, como para viabilizar infecções diversas e estudar terapias protetoras dos efeitos supressores, na presença ou não de tumor. Em adição, nos animais com tumor na orelha, pode servir para análise de terapias que atuem como potencializadores do efeito antineoplásico da ciclofosfamida, bem como a possibilidade de testar tratamentos complementares tópicos.

## 7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados expostos podemos concluir que o tratamento com ciclofosfamida em camundongos portadores ou não de TES:

- Apresenta efeito antineoplásico no TES, reduzindo o número de células tumorais, infiltrado inflamatório e necrose, culminando na redução do peso, espessura da orelha com tumor, bem como a área e diâmetro da lesão;
- Induz parâmetros que contribuem para a imunossupressão, diminuindo o consumo de ração e o peso corporal;
- Induz a imunossupressão reduzindo a celularidade do sistema imune, causando aplasia medular, leucopenia, reduzindo o recrutamento no peritônio e diminuindo a proliferação esplênica;
- Atua na diminuição de linfócitos B no baço; nos camundongos com TES induziu a diminuição de macrófagos, células NK, células NKT, linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos esplênicos;
- Induz uma redução mais intensa da celularidade esplênica nos animais com TES que em animais saudáveis, com número reduzido de linfócitos B, T citotóxicos ativados, macrófagos e células NKT;
- Induz pré-ativação celular no local do tratamento, aumentando a produção média de peróxido de hidrogênio pelas células peritoneais após estímulo.

## REFERÊNCIAS

ADATIA AK. Cytotoxicity of cyclophosphamide in the rat incisor. *British Journal of Cancer*, 32 (2): 208-18;1975.

AFSHARIAN P, TERELIUS Y, HASSAN Z, NILSSON C, LUNGGREN S, HASSAN M. The effect of repeated administration of cyclophosphamide on cytochrome P450 2B in rats. *Clinical Cancer Research*, 13 (14): 4218-24; 2007.

AHLMANN M, HEMPEL G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 78:661–671; 2016.

AHMED A, KOMA MK. Interleukin-33 triggers B1 cell expansion and its release of monocyte/macrophage chemoattractants and growth factors. *Scandinavian journal of immunology*, 82(2):118–124; 2015.

AL-HARBI MM, QURESHI S, RAZA M, AHMED MM, GIANGRECO AB, SHAH AH. Anticarcinogenic effect of *Commiphora molmol* on solid tumors induced by Ehrlich carcinoma cells in mice. *Chemotherapy*, 40: 337-347; 1994.

AL-HOMSI AS, ROY TS, COLE K, FENG Y, DUFFNER U. Post-transplant high-dose cyclophosphamide for the prevention of graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(4):604-11; 2015.

ALVES PCS. Ação anti-fúngica e imunomoduladora de *Punica granatum* L. assegura a sobrevivência na sepse por *Candida albicans*. 2018. 80f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA; 2018.

ANTOHE M, NEDELICU RI, NICHITA L, POPP CG, CIOPLEA M, BRINZEA A, HODOROGEA A, CALINESCU A, BALABAN M, ION DA, DIACONU C, BLEOTU C, PIRICI D, ZURAC AS, TURCU G. Tumor infiltrating lymphocytes: the regulator of melanoma Evolution. *Oncology Letters*, 17(5): 4155-4161; 2019.

ARAÚJO-JORGE TC, CASTRO SL. orgs. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. Antropologia e Saúde collection,368; 2000. ISBN 85- 85676-75-2.

ARAÚJO MJAM, DUTRA RP, COSTA GC, REIS AS, ASSUNÇÃO AKM, LIBÉRIO SA, MACIEL MCG, SILVA LA, GUERRA RNM, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20: 580-587; 2010.

ARMSTRONG VW, OELLERICH M. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clinical Biochemistry*, 34:9; 2001.

ARNOLD H, BOURSEAUX F, BROCK N. Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours of the rat. *Nature*, 181 (4613): 931 ;1958.

ASSUNÇÃO AKM. Efeito antitumoral do tratamento com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em modelo experimental de tumor de

Ehrlich. 2011. 107f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA; 2011.

BABA LA, AILAL F, EL HAFIDI N, HUBEAU M, JABOT-HANIN F, BENAJIBA N, AADAM Z, CONTI F, DESWARTE C, JEDDANE L, AGLAGUEL A, EL MAATAOUI O, TISSENT A, MAHRAOUI C, NAJIB J, MARTINEZ-BARRICARTE R, ABEL L, HABTI N, SAILE R, CASANOVA JL, BUSTAMANTE J, SALIH ALJ H, BOUSFIHA AA. Chronic granulomatous disease in Morocco: genetic, immunological, and clinical features of 12 patients from 10 kindreds. *Journal of Clinical Immunology*, 34(4):452-8; 2014.

BACH JF, STROM T. The mode of action of immunosuppressive agentes. Amsterdam: Elsevier; 1986.

BAE EA, SEO H, KIM IK, JEON I, KANG CY. Roles of NKT cells in câncer immunotherapy. *Archives of Pharmacal Research*, 11 (03):1-6; 2019.

BERRIGAN MJ, STRUCK RF, GURTOO HL. Lipid peroxidation induced by cyclophosphamide. *Cancer Biochemistry Biophysics*, 9 (3): 265-70; 1987.

BERGAMI-SANTOS PC, MARIANO M, BARBUTO, JA. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Science*, 75: 245-255; 2004.

BERZINS SP, ULDRICH AP, PELLICCI DG, MCNAB F, HAYAKAWA Y, SMYTH MJ, GODFREY DI. Parallels and distinctions between T and NKT cell development in the thymus. *Immunology and Cell Biology*, Jun, 82 (3): 269-275; 2004.

BHATTACHARJEE A, BASU A, BISWAS J, SEM T, BHATTACHARYA S. Chemoprotective and chemosensitizing properties of selenium nanoparticle (Nano-Se) during adjuvant therapy with cyclophosphamide in tumor-bearing mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, october; 2016.

BIN-HAFEEZ B, AHMAD I, HAQUE R, RAISUDDIN S. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 75: 13-18; 2001.

BLOK EJ, VAN DEN BULK J, DEKKER-ENSINK NG, DERR R, KANTERS C, BASTIAANNET E, KROEP JR, VAN DE VELDE CJ, KUPPEN PJ. Combined evaluation of the FAS cell surface death receptor and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic biomarker in breast cancer. *Oncotarget*, 8 (9): 15610-15620; 2017.

BOHNENSTENGEL F, HOFMANN U, EICHELBAUM M, KROEMER HK. Characterization of the cytochrome P450 involved in side-chain oxidation of cyclophosphamide in humans. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 51:297–30; 1996.

BOYD VL, ROBBINS JD, EGAN W, LUDEMAN SM. <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopic observation of the intracellular transformations of oncostatic cyclophosphamide metabolites. *Journal of Medicinal Chemistry*, 29 (7): 1206-10; 1986.

BRENNAN PJ, BRIGL M, BRENNER MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature Review Immunology*, 13 (2): 101-117; 2013.

BROCK N. The history of the oxazaphosphorine cytostatics. *Cancer* 78(3):542–547; 1996.

BRÜGGEMANN SK, KISRO J, WAGNER T. Ifosfamide cytotoxicity on human tumor and renal cells: role of chloroacetaldehyde in comparison to 4-hydroxyifosfamide. *Cancer Research*, 57:2676–2680; 1997.

BRUMMAIER T, POHANKA E, STUDNICKA-BENKE A, PIERINGER H. Using cyclophosphamide in inflammatory rheumatic diseases. *European Journal of Internal Medicine*, 24 (7): 590-6; 2013.

CHAABANE W, USER SD, EL-GAZZAH M, JAKSIK R, SAJJADI E, RZESZOWSKA-WOLNY J, LOS MJ. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1): 43-58; 2013.

CHANG TKH, WEBER GF, CRSPI CL, WAXMAN DJ. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3<sup>a</sup> in human liver microsomes. *Cancer Research*, 53: 5629-5637; 1993.

CHEN L, WATKINS JF. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. *Nature*, 225: 734-735; 1970.

CHINNASWAMY G, ERRINGTON J, FOOT A, BODDY AV, VEAL GJ, COLE M. Pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites in paediatric patients receiving high-dose myeloablative therapy. *European Journal Cancer*, 47 (10): 1556-63; 2011.

CHUNG NG, LEE JW, JANG PS, JEONG DC, CHO B, KIM HK. Reduced dose cyclophosphamide, fludarabine and antithymocyte globulin for sibling and unrelated transplant of children with severe and very severe aplastic anemia. *Pediatric Transplant*, 17 (4): 387-93; 2013.

COLLEONI M, ROCCA A, SANDRI MT, ZORZINO L, MASCI G, NOLE F. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. *Annals of Oncology*, 13(1): 73-80; 2002.

COLVIN OM. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Current Pharmaceutical Design*, 5 (8): 555–560; 1999.

CONNORS TA, COX PJ, FARMER PB, FOSTER AB, JARMAN M, MACLEOD JK. Observations on the mechanism of hydroxylation of cyclophosphamide by rat liver microsomes: the metabolism of cyclophosphamide-4d<sub>2</sub>. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1 (2): 130-6; 1974.

CRUZ GVB, PEREIRA PVS, PATRICIO FJ, COSTA GC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, ARAGÃO-FILHO WC, MACIEL MCG, SILVA LA, AMARAL FMM, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract

from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 148–154; 2007.

DAGLI MLZ, GUERRA JL, SALDIVA PHN. An Experimental Study On The Lymphatic Dissemination Of The Solid Ehrlich Tumor In Mice. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 29: 97-103; 1992.

DE JONGE ME, HUITEMA AD, VAN DAM SM, RODENHUIS S, BEIJNEN JH. Population pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites 4-hydroxycyclophosphamide, 2-dechloroethylcyclophosphamide, and phosphoramidate mustard in a high-dose combination with Thiotepa and Carboplatin. *Ther Drug Monitoring*, 27 (6): 756-65; 2005.

DE JORGE ME, HUITEMA AD, RODENHUIS S, BEIJEN JH. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics*, 44: 122-135; 2005.

DELALOYE J, CALANDRA T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*, 5:161–169; 2014.

DEL ZOTTO G, MARCENARO E, VACCA P, SIVORI S, PENDE D, DELLA CHIESA M, MORETTA F, INGEGNERE T, MINGARI MC, MORETTA A, MORETTA L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clinical Cytometry*, 92(2), 100–114; 2017.

DE MOURA TR, NOVAIS FO, OLIVEIRA F, CLARENCIO J, NORONHA A, BARRAL A, BRODSKY C, DE OLIVEIRA CI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*, 73: 5827-5834; 2005.

DENEVE W, VALERIOTE F, EDELSTEIN M, EVERETT C, BISCHOFF M. In vivo DNA cross-linking by cyclophosphamide: comparison of human chronic lymphatic leukemia cells with mouse L1210 leukemia and normal bone marrow cells. *Cancer Research*, 49: 3452 –3456; 1989.

DIEHL R, FERRARA F, MÜLLER C, DREYER AY, MCLEOD DD, FRICKE S, BOLTZE J. Immunosuppression for *in vivo* research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. *Cellular & Molecular Immunology*, 14: 146–179; 2017.

DISIS ML, STANTON SE. Triple-negative breast cancer: immune modulation as the new treatment paradigm. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting*. 2015:e25–30; 2015.

DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21: 137-149; 2004.

EMADI A, JONES RJ, BRODSKY RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6:638–647; 2009.

EHRlich P. Experimentelle carcinom studien na Mausem. *Experimental Therapy Frankfurt*, 1: 78–80; 1906.

ETTINGER DS, KARP JE, ABELOFF MD, BURKE PJ, BRAINE HG. Intermittent high-dose cyclophosphamide chemotherapy for small cell carcinoma of the lung. *Cancer Treatments Reports*, 62(3): 413-24; 1978.

FAIRWEATHER D, CIHAKOVA D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 33 (3–4):222-230; 2009.

FERNANDES PD, GUERRA FS, SALES NM, SARDELLA TB, JANCAR S, NEVES JS. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 71: 83-89; 2015.

FLEER R, BRENDEL M. Toxicity, interstrand cross-links and DNA fragmentation induced by 'activated' cyclophosphamide in yeast. *Chemical-Biological Interactions*, 37:123–140; 1981.

FORTES TS, FIALHO EMS, REIS AS, ASSUNÇÃO AKM, PINHEIRO MT, AZEVEDO APS, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Desenvolvimento do Tumor de Ehrlich em camundongos após incubação in vitro com mesocampo de babaçu. *Revista Ciências da Saúde*, 11(1): 11-18; 2009.

FRAJACOMO FTT, PADILHA CS, MARINELLO PC, GUARNIER FA, CECCHINI R, DUARTE JAR, DEMINICE R. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. *Life Sciences*, 162: 47-53; 2016.

FRIEDMAN OM, WODINSKY I, MYLES A. Cyclophosphamide (NSC-26271) related phosphoramidate mustards- recent advances and historical perspective. *Cancer Treatments Reports*, 60 (4): 337-46; 1976.

FU XL, DUAN W, SU CY, MAO FY, LV YP, TENG Y, YU PW, ZHUANG Y, ZHAO YL. Interleukin 6 induces M2 macrophage differentiation by STAT3 activation that correlates with gastric cancer progression. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 66(12): 1597-1608; 2017.

FUKUSHIMA H, KUDO T, FUSKUSHIMA T, TAKAHASHI-IGARI M, SHIIGAI M, MORI K, SUMAZAKI R. An infant with life-threatening hemangioma successfully treated with low-dose cyclophosphamide. *Pediatr Int*, 53 (6): 1073-5; 2011.

GABOR M. Models of acute inflammation in the ear. *Methods in Molecular Biology*, 225: 129-137; 2003.

GE Y, DOMSCHKE C, STOIBER N, SCHOTT S, HEIL J, ROM J. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61(3): 353-62; 2012.

GNANASEKARAN S, SAKTHIVEL KM, CHANDRASEKARAN G. Immunostimulant and chemoprotective effect of vivartana, a polyherbal formulation against cyclophosphamide induced toxicity in swiss albino mice. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 11: 51–61; 2015.

GROSS R. Cytostatic therapy with radiations and chemically effective cell poisons in carcinomas and sarcomas. *Strahlentherapie Suppl*, 43:243–253; 1959.

GUERRA JL. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de Tumor de Ehrlich. 87 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. USP, São Paulo, SP; 1983.

GODFREY DI, ULDRICH AP, MCCLUSKEY J, ROSSJOHN J, MOODY DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nature Immunology*, 16 (11): 1114-1123; 2015.

GURTOO HL, HIPKENS JH, SHARMA SD. Role of glutathione in the metabolism-dependent toxicity and chemotherapy of cyclophosphamide. *Cancer Research*, 41(9) 1:3584-91; 1981.

HALES BF. Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites, 4-hydroxycyclophosphamide, phosphoramidate mustard, and acrolein. *Cancer Research*, 42 (8): 3016-21; 1982.

HALL JM, OHNO S, PRIBNOW JF. The effect of cyclophosphamide on an ocular immune response. I. Primary response. *Clinical Experimental Immunology*, 30: 309 – 316, 1977.

HANDOLIAS D, QUINN M, FOO S, MILESHKIN L, GRANT P, DUTU G. Oral cyclophosphamide in recurrent ovarian cancer. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*; 2013.

HAO NB, LU MH, FAN YH, CAO YL, ZHANG ZR, YANG SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012: 1-11; 2012.

HEUSINKVELD M, VAN DER BUR SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancer. *Journal Translational Medicine*, 9 (1): 216; 2011.

HIPKENS JH, STRUCK RF, GURTOO HL. Role of aldehyde dehydrogenase in the metabolism-dependent biological activity of cyclophosphamide. *Cancer Research*, 41:3571–3583; 1981.

IBRAHIM HM, GHAFAR FRA, EL-ELAIMY IA, GOUIDA MS, LATIF HMAE. Antitumor and immune-modulatory efficacy of dual-treatment based on levamisole and/or taurine in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106: 43–49; 2018.

JEON E, YOON B, LIM J, OH H, PARK H, PARK M, LIM M, PARK M, KIM K, CHO M, CHO S. Adoptive transfer of all-trans-retinal-induced regulatory T cells ameliorates experimental autoimmune arthritis in an interferon-gamma knockout model. *Autoimmunity*, 45: 460 –469; 2012.

JONES RJ, BARBER JP, VALA MS, COLLECTOR MI, KAUFMANN SH, LUDEMAN SM, COLVIN OM, HILTON J. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood*, 85:2742–2746; 1995.

JIVRAJANI M, SHAIKH MV, SHRIVASTAVA N, NIVSARKAR M. An Improved and Versatile Immunosuppression Protocol for the Development of Tumor Xenograft in Mice. *Anticancer Research*, 34: 7177-7184; 2014.

JOEKEL DE, DEPLAZES P. Optimized dexamethasone immunosuppression enables *Echinococcus multilocularis* liver establishment after oral egg inoculation in a rat model. *Experimental Parasitology*, 180:27-32; 2017.

KOHLGRUBER AC, DONADO CA, LAMARCHE NM, BRENNER MB, BRENNAN PJ. Immunogenetics, 68 (8): 649-643; 2016.

KRIJGSMAN D, HOKLAND M, KUPPEN PJK. The role of natural killer T cells in cancer – A phenotypical and functional approach. *Frontiers in Immunology*, 9: 1-21; 2018.

KRISL JC, DOAN VP. Chemotherapy and Transplantation: The Role of Immunosuppression in Malignancy and a Review of Antineoplastic Agents in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 17(8): 1974-1991; 2017.

KWON CH, MADDISON K, LOCASTRO L, BORCH RF. Accelerated decomposition of 4-hydroxycyclophosphamide by human serum albumin. *Cancer Research*, 47 (6): 1505-8; 1987.

LAOUI D, MOVAHEDI K, VAN OVERMEIRE E, VAN DER BOSSCHE J, SCHOUPE E, MOMMER C, NICOLAOU A, MORIAS Y, BAETSELIER P, VAN GINDERACHTER JA. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *The International Journal of Developmental Biology*, 55 (7-9): 861-867; 2011.

LEAL PC, MOURA ECR, COSSETTI RJD, NASCIMENTO JR, SERRA ICPB, RIBEIRO BP, VALE AAM, SANTOS APSA, NASCIMENTO FRF, SAKATA RK. High dose gabapentin does not alter tumor growth in mice but reduces arginase activity and increases superoxide dismutase, IL-6 and MCP-1 levels in Ehrlich ascites. *BMC Research Notes*, Jan 25, 12(1):59; 2019.

LEITE RB, SANTOS HBP, LUCIO PSC, ALVES PM, GODOY GP, NONAKA CFW. Macrófagos e sua relação com o carcinoma de células escamosas Oral. *FOL - Faculdade de Odontologia de Lins/Unimep*. 25 (1): 37-46; 2015.

LEWIS SM, WILLIAMS A, EISENBARTH SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Science Immunology*, 4(33): 1-12; 2019.

LIU C, YU S, KAPPES J, WANG J, GRIZZLE WE, ZINN KR, ZHANG HG. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood*, 109: 4336-4342; 2007.

LIU F, LI XL, LIN T, HE DW, WEI GH, LIU JH, LI LS. The cyclophosphamide metabolite, acrolein, induces cytoskeletal changes and oxidative stress in Sertoli cells. *Molecular Biology Reports*, 39 (1): 493-500; 2012.

LIU Y, CARLSSON R, COMABELLA M, WANG J, KOSICKI M, CARRION B, HASAN M, WU X, MONTALBAN X, DZIEGIEL MH, SELLEBJERG F, SØRENSEN PS, HELIN K, ISSAZADEH-NAVIKAS S. FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS. *Nature Medicine*, 20: 272 –282; 2014.

LUNA L. Manual of the histology staining methods of the armed forces institute of pathology. 3<sup>a</sup> Ed. New York: Ed. McGraw Hill, 560; 1968.

MADONDO MT, QUINN M, PLEBANSKI M. Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treatment Reviews*, 42:3-9; 2016.

MAIA LC, GUERRA RNM, ROSSI MI. Quantitation of tumor growth in the ears of mice. *Journal of Immunological Methods*, 55: 135-139; 1982.

MALORNY U, GOEBELER M, GUTWALD J, ROTH J, SORG C. Differences in migration inhibitory factor production by C57Bl/6 and BALB/c mice in allergic and irritant contact dermatitis. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 92: 356-360; 1990.

MANENTE FA, QUINELLO C, FERREIRA LS, ANDRADE CR, JELLMAYER JA, PORTUONDO DL, BATISTA-DUHARTE A, CARLOS IZ. Experimental sporotrichosis in a cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model. *Medical Mycology*, 1, 56 (6): 711-722; 2018.

MANEPALLI S, GANDHI JA, EK HAR VV, ASPLUND MB, COELHO C, MARTINEZ LR. Characterization of a cyclophosphamide-induced murine model of immunosuppression to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1747–1754; 2013.

MILIGY I, MOHAN P, GABER A, ALESKANDARANY MA, NOLAN CC, DIEZ-RODRIGUEZ M, MUKHERJEE A, CHAPMAN C, ELLIS IO, GREEN AR, RAKHA EA. Prognostic significance of tumour infiltrating B lymphocytes in breast ductal carcinoma in situ. *Histopathology*, 71(2): 258-268; 2017.

MORATH C, SCHMITT A, KÄLBLE F, ZEIER M, SCHMITT M, SANDRA-PETRESCU F, OPELZ G, TERNESS P, SCHAIER M, KLEIST C. Cell therapeutic approaches to immunosuppression after clinical Kidney transplantation. *Pediatric Nephrology*, 33(2): 199-213; 2018.

MORVAN MG, LANIER LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16(1):7-19; 2016.

NAIR S, DHODAPKAR MV. Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 8: 1178; 2017.

NASCIMENTO FRF, CRUZ GVB, PEREIRA PVS, MACIEL MCG SILVA LA, AZEVEDO APS, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sciences*, 78: 2650–2653; 2006.

NASCIMENTO JR. Amplificação da polarização de macrófagos M1 e inibição do desenvolvimento tumoral pelo tratamento com aminoguanidina. 2018.131f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA; 2018.

NAWATA T, KUBO M, OKUDA S, OMOTO M, YUJIRI T, KANDA T, YANO M. Successful treatment with intravenous cyclophosphamide for anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody-positive dermatomyositis associated with myelodysplastic syndrome. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 46(6):496-498; 2017.

NETEA MG, JOOSTEN LAB, MEER JWMVD, KULLBERG BJ, VEERDONK FLV. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 15: 630-642; 2015.

OCHSENBEIN AF. Immunological ignorance of solid tumor. Springer Seminars in Immunology, 27: 19-35; 2005.

O'CONNELL MJ, WIERNIK PH, SUTHERLAND JC. High dose intermitente intravenous cyclophosphamide in non-Hodkin's lymphomas: long-term patient follow-up. Oncology, 33(4): 170-2; 1976.

PARDOLL DM, TOPALIAN SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. Current Opinion in Immunology, 10: 588-594; 1998.

PAVELIC K, SLIJEPCEVIC M, PAVELIC J, IVIC J, AUDY-JURKOVIC S, PAVELIC ZP, BORANIC M. Growth and treatment of Ehrlich tumor in mice with alloxan-induced diabetes. Cancer Research, 39: 1807-1813; 1979.

PEARCE EL, POFFENBERGER MC, CHANG CH, JONES RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. Science, 342:54; 2013.

PENNELL NA. Understanding the Rationale for Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. Seminars in Oncology, 42 (2): 3-10; 2015.

POGGI A, ZOCCHI MR. Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis, 54: 323-333; 2006.

POTEL J, BROCK N. The influence of anticarcinogenic substances on immunologic reactions. 2. The influence of N, N-bis(2-chlorethyl) -N', O-propylenephosphoric acid ester diamide on antibody formation. Arzneimittelforschung, 15:659-666; 1965.

REIS AS. Caracterização histológica, imunofenotípica e produção de citocinas em camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida. 2012. 61F. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA; 2012.

REN X, WU H, LU J, ZHANG Y, LUO Y, XU Q, SHEN S, LIANG Z. PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. Cancer Biology & Therapy, 19(5): 373-380; 2018.

REPASKY EA, ENG J, HYLANDER BL. Stress, metabolism and cancer: integrated pathways contributing to immune suppression. Cancer Journal, 21(2):97-103; 2015.

ROBINSON JH, NAYSMITH JD. A comparison of four methods for measuring cutaneous delayed- type hypersensitivity reactions to protein antigens in the mouse. Scandinavian Journal of Immunology, 5: 299-304; 1976.

ROSSETTI RAM, LORENZI NPC, YOKOCHI K, ROSA MBSF, BENEVIDES L, MARGARIDO PFR, BARACAT EC, CARVALHO JP, VILLA LL, LEPIQUE AP. B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses. PLoS One, 13(7): e0199034; 2018.

RUIZ DE MORALES, J.; VÉLEZ, D.; SUBIZA, J. L. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colonystimulating factors and without engagement of host T cells. Experimental Hematology, 27:1757-1767; 1999.

SAKAI R, KURASAWA T, NISHI E, KONDOT, OKADAY, SHIBATA A, NISHIMURA K, CHINO K, OKUYAMA A, TAKEI H, NAGASAWA H, AMANO K. Efficacy and safety of multitarget therapy with cyclophosphamide and tacrolimus for lupus nephritis: a prospective, single-arm, single-centre, open label pilot study in Japan. *Lupus*, 1–10; 2017.

SALIO M, SILK JD, JONES EY, CERUNDOLO V. Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. *Annual Review of Immunology*, 32: 323-366; 2014.

SCHREIBER RD, OLD LJ, SMYTH MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024): 1565-1570; 2011.

SELVAKUMAR E, PRAHALATHAN C, SUDHARSAN PT, VARALAKSHMI P. Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide. *Archives of Toxicology*, 80: 115-9; 2006.

SERRA ICPB. *Croton triquetus* Lam.: Efeito antitumoral e ativação da imunidade inata. 2016. 168f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal: Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA; 2016.

SHEN M, SUN Q, WANG J, PAN W, REN X. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. *Oncotarget*, 7(34): 55828-55839; 2016.

SHULMAN LN. The biology of alkylating-agent cellular injury. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 7 (2): 325-35; 1993.

SICA A, LARGHI P, MANCINO A, RUBINO L, PORTA C, TOTARO MG, RIMOLDI M, BISWAS SK, ALLAVENA P, MANTOVANI A. Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biology*, 18 (5): 349-55; 2008.

SILVA JUNIOR RNC, FIALHO EMS, ASSUNÇÃO AKM, MACHADO JL, ARRUDA D, FURTADO PGR, GONÇALVES FILHO A, NASCIMENTO FRF. Caracterização do modelo inflamatório de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos *Swiss*. *Revista Ciências da Saúde*, São Luís, 15 (1): 55-67, jan-jun; 2013.

SILVA MPN. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 52(1): 59-77; 2006.

SINGH S, KUMAR N, DWIWEDI P, CHARAN J, KAUR R, SIDHU, PREETI, CHUGH VK. Monoclonal Antibodies: A Review. *Current Clinical Pharmacology*, 13(2): 85-99; 2018.

SMITH RD, KEHRER JP. Cooxidation of cyclophosphamide as an alternative pathway for its bioactivation and lung toxicity. *Cancer Research*, 51: 542–548; 1991.

SOLHEIM TS, BLUM D, FAYERS PM, HJERMSTAD MJ, STENE GB, STRASSER F, KAASA S. Weight loss, appetite loss and food intake in cancer patients with cancer cachexia: three peas in a pod? - analysis from a multicenter cross sectional study. *Acta Oncologica*, 53 (4): 539-46; 2014.

SOMAROUTHU B, LEE SI, URBAN T, SADOW CA, HARRIS GJ, KAMBADAKONE A. Immune-related tumour response assessment criteria: a comprehensive review. *The British Journal of Radiology*, 91(1084): 20170457; 2018

SOOD C, O'BRIEN PJ. 2-Chloroacetaldehyde-induced cerebral glutathione depletion and neurotoxicity. *British Journal of Cancer Suppl*, 27:S287–S293; 1996.

STANTON SE, DISIS ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 18:4:59; 2016.

STEVENSON HC, FAUCI AS. Activation of human B lymphocytes. XII. Differential effects of in vitro cyclophosphamide on human lymphocyte subpopulations involved in B-cell activation. *Immunology*, 39: 391-397; 1980.

SVENSSON HM, LJUNGMAN P, BJÖRKSTRAND B, OLSSON H, BIELENSTEIN M, ABDEL-REHIM M, NILSSON C, JOHANSSON M, KARLSSON MO. A mechanism-based pharmacokinetic-enzyme model for cyclophosphamide autoinduction in breast cancer patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48:669–677; 1999.

SZIGETI ZM, TALAS L, PALICZ Z, SZENTESI P, HARGITAI Z, CSERNOCH L, BALLA J, POCSI I, BANFALVI G, SZEMAN-NAGY G. Murine model to follow hyphal development in invasive pulmonary aspergillosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6): 2817-2825; 2018.

TAN HY, WANG N, LI S, HONG M, WANG X, FENG Y. Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Rev. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 16; 2016.

THATCHER N, WAGSTAFF J, WILKINSON P, PALMER M, CROWTHER D. Intermittent high-dose cyclophosphamide with and without prednisolone: a study of the relationships between toxicity, response and survival in metastatic lung cancer. *Cancer*, 50(6): 1051-6; 1982.

TORRES MP, ENTWISTLE F, COOTE PJ. Effective immunosuppression with dexamethasone phosphate in the *Galleria mellonella* larva infection model resulting in enhanced virulence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(4): 333-343; 2016

TRIPATHI DN, JENA GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutation Research*, 696, (1): 69-80; 2010.

VANDEWALLE J, LUYPAERT A, DE BOSSCHER K, LIBERT C. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 29(1): 42-54; 2018.

VAN PUTTEN LM, LELIEVELD P, KRAM-IDSENGA LKJ. Cellcycle specificity and therapeutic effectiveness of cytostatic agents. *Cancer Chemotherapy Reports*, 56:691–700; 1972.

WANG D, LI Q, QU Y, WANG M, LI L, LIU Y, LI Y. The investigation of immunomodulatory activities of *Gloeostereum incaratum* polysaccharides in cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15: 3633-3638; 2018.

WANG JY, PROROK G, VAUGHAN WP. Cytotoxicity, DNA cross-linking, and DNA single-strand breaks induced by cyclophosphamide in a rat leukemia in vivo. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 31:381–386; 1993.

WEI L, XUE T, YANG H, ZHAO G, ZHANG G, LU Z et al. Modified uterine allotransplantation and immunosuppression procedure in the sheep model. *PLoS One*, 8: e81300; 2013.

WEI X, JIN Y, TIAN Y, ZHANG H, WU J, LU W, LU X. Regulatory B cells contribute to the impaired antitumor immunity in ovarian cancer patients. *Tumour biology*, 37(5):6581–6588; 2016.

XIE H, AFSHARIAN P, TERELIUS Y, MIRGHANI RA, YASAR U, HAGBJÖRK A, LUNDGREN S, HU Y, RANE A, HASSAN M. Cyclophosphamide induces mRNA, protein and enzyme activity of cytochrome P450 in rat. *Xenobiotica*, 35 (3): 239-51; 2005.

YULE SM, BODDY AV, COLE M, PRICE L, WYLLIE R, TASSO MJ, PEARSON AD, IDLE JR. Cyclophosphamide metabolism in children. *Cancer Research*, 55:803–809; 1995.

YULE SM, PRICE L, COLE M, PEARSON AD, BODDY AV. Cyclophosphamide metabolism in children following a 1-h and a 24-h infusion. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 47:222–228; 2001.

ZHANG Q, CONG R, HU M, ZHU Y, YANG X. Immunoenhancement of Edible Fungal Polysaccharides (Lentinan, Tremellan, and Pachymaran) on Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Mouse Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017: 1-7; 2017.

ZIAI J, GILBERT HN, FOREMAN O, EASTHAM-ANDERSON J, CHU F, HUSENI M, KIM JM. CD8+ T cell infiltration in breast and colon cancer: A histologic and statistical analysis. *PLoS One*, 13(1):e0190158; 2018.

## ANEXO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA**  
**CIAEP:01.0341.2014**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da aminoguanidina e do imiquimode sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich" registrada com o nº 23115.003822/2016-26, sob a responsabilidade de Flávia Raquel Fernandes do Nascimento que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 07/06/2016.

FINALIDADE	( )ENSINO(X)PESQUISA ( ) EXTENSÃO
Vigência da autorização	01/05/2016 à 31/04/2018
Espécie linhagem/raça	Camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) linhagem Swiss
Nº de animais	400
Peso/Idade	25-30g / 3 a 4 meses de idade
Sexo	Macho e fêmeas
Origem	380 animais oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e 20 animais do Biotério Central do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (CPqGM-FioCruz/BA).

*Lucilene Amorim Silva*

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva  
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA  
 UFMA