Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado em Ciências da Saúde

# AMPLIFICAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO TUMORAL PELO TRATAMENTO COM AMINOGUANIDINA

JOHNNY RAMOS DO NASCIMENTO

São Luís
2018

JOHNNY RAMOS DO NASCIMENTO

# AMPLIFICAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO TUMORAL PELO TRATAMENTO COM AMINOGUANIDINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

São Luís
2018

JOHNNY RAMOS DO NASCIMENTO

# INIBIÇÃO DA INOS: AÇÃO ANTITUMORAL E AMPLIFICAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em ____/____/____ por:

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Doutora em Imunologia
(Orientadora)

_____

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
Doutora em Imunologia
(Examinadora)

_____

Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis
Doutor em Ciências
(Examinador)

_____

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
Doutora em Imunologia
(Examinadonra)

_____

Profa Dra Angela Falcai
Doutora em Imunologia
(Examinador)

_____

Profa Dra Lucilene Amorim Silva
Doutora em Patologia
(Suplente)

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

Ramos do Nascimento, Johnny.
AMPLIFICAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO TUMORAL PELO TRATAMENTO COM AMINOGUANIDINA / Johnny Ramos do Nascimento. - 2018.
138 p.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2018.

1. Aminoguanidina. 2. Macrófago M1. 3. Óxido nítrico. 4. Tumor de Ehrlich. I. Fernandes do Nascimento, Flávia Raquel. II. Título.

“Bom dia, Brasil.
Boa tarde, Suiça.”
(Johnny Ramos)

Dedico esta tese a todos os pesquisadores que
com sua paixão pela ciência e pela educação
tornam este país melhor

# AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me guiou no caminho da minha felicidade.

Ao LIF que foi a minha segunda casa nesses 6 anos de muito aprendizado. Digo com todo carinho que tenho uma família cientifica, com todo parentesco que tenho direito irmãos(ãs), primos(as) e tios(as). Em especial aos primos André Vale, Luis Douglas e Jefferson Brito por estarem sempre a postos para me ajudar. À minha tia Profa Ana Paula, por toda vez me receber com um sorriso lindo e sentar comigo pra ouvir minhas ideias.

À Profa. Flávia Nascimento, uma segunda mãe para mim, por sempre acreditar no meu potencial e me dar a confiança quando não tive, me fazendo superar todos os meus limites e também quando necessário por neles novamente. Pelos meus irmãos científicos, Emanuel Veras, Jaianna Campos e Dimitrius Garbis por me mostrar que sou capaz de transmitir conhecimento. Em especial a Paula Sibelly, Ronaldo Viana e Gustavo Rodrigues, me deram o apoio, a força, o carinho e a confiança para que a concretização deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Albeneide Ramos e Evandro Ferreira pelo amor eterno, dedicação e perseverança. A minha madrasta, Gessiaria Santos, por conferir o suporte necessário para que eu seguisse meu sonho. À minha irmã, Karolinne Ramos, pela paciência e apoio.

À FAPEMA e ao CNPq pela bolsa recebida e financiamento.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração desta tese.

**SUMÁRIO**

1 INTRODUÇÃO ..... 18
2 REFERENCIAL TEÓRICO ..... 20
2.1 Macrófagos ..... 20
2.1.1 Polarização de macrófagos ..... 21
2.1.2 Macrófagos associados ao tumor ..... 26
2.2 Óxido Nítrico ..... 28
2.3 Óxido Nítrico e o Tumor ..... 32
2.3.1 Inibidores do óxido nítrico ..... 37
2.3.2 Aminoguanidina ..... 40
2.4 Tumor de Ehrlich ..... 41
2.4.1 Macrófagos Associados ao Tumor de Ehrlich ..... 41
2.4.2 Óxido Nítrico e o Tumor de Ehrlich ..... 44
3 OBJETIVOS ..... 48
3.1 Objetivo Geral ..... 48
3.2 Objetivos específicos ..... 48
4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 49
4.1 Avaliação do efeito da inibição da iNOS sobre a polarização *in vitro* de macrófagos ..... 49
4.1.1 Cultura da linhagem Raw 264.7 ..... 49
4.1.2 Preparo da Solução de Aminoguanidina (AG) ..... 49
4.1.3 Ensaio de citotoxicidade da AG ..... 50
4.1.4 Determinação da concentração final de AG para os experimentos *in vitro* 50
4.1.5 Polarização de macrófagos ..... 51
4.1.6 Protocolos *in vitro* para avaliação do efeito da AG sobre a polarização de macrófagos ..... 51
4.1.7 Imunofenotipagem de macrófagos ..... 53
4.2 Avaliação da inibição da iNOS na forma ascítica e sólida do tumor de Ehrlich *in vivo* ..... 56
4.2.1 Animais ..... 56
4.2.2 Manutenção do tumor de Ehrlich ..... 56
4.2.3 Procedimento experimental com o tumor sólido de Ehrlich ..... 57
4.2.3.1 Obtenção do sangue ..... 59

4.2.3.2 Análise leucométrica....59
4.2.3.3 Avaliação histopatológica da orelha....59
4.2.3.4 Obtenção e contagem das células dos linfonodos, do baço e da medula óssea....60
4.2.3.5 Culturas do baço e peritônio....60
4.2.3.6 Fenotipagem das células do baço....61
4.2.4 Sobrevida de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados com AG....67
4.3 Técnicas realizadas....68
4.3.1 Determinação da produção de óxido nítrico....68
4.3.2 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$)....68
4.3.3 Quantificação de citocinas....69
4.4 Análise estatística....69
5 RESULTADOS....71
5.1 Efeito da inibição da iNOS na polarização de macrófagos RAW 264.7. ....71
5.1.1 Citotoxicidade da Aminoguanidina em macrófagos Raw 264.7....71
5.1.2 Aminoguanidina inibe a produção de óxido nítrico em macrófagos M1....72
5.1.3 A inibição da iNOS não promove a polarização de macrófagos....73
5.1.4 A polarização de macrófagos M1 é acentuada pela inibição da iNOS....77
5.1.5 Efeito transitório da Aminoguanidina na inibição da iNOS....80
5.2 Citotoxicidade da AG em células do tumor de Ehrlich....84
5.3 Efeito do inibidor da iNOS sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich ....85
5.3.1 Análise histopatológica das orelhas com tumor de Ehrlich. ....87
5.3.2 Efeito da AG sobre peso e o consumo de ração dos animais. ....91
5.3.3 O tratamento com aminoguanidina não altera parâmetros leucométricos dos animais portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida....92
5.3.4 O tratamento AG não altera a celularidade dos órgãos linfoides, no entanto o tratamento contínuo diminui o número de células do linfonodo....92
5.3.5 Perfil fenotípico das células do baço....93
5.3.5.1 Efeito do tratamento da AG nos linfócitos T e suas subpopulações do baço....93
5.3.5.2 Efeito do tratamento da AG nos linfócitos B do baço....96
5.3.5.3 O tratamento com AG aumenta o número de macrófagos do baço dos animais portadores do tumor sólido de Ehrlich....97

5.3.5.4 Efeito do tratamento com AG em células NK do baço de animais portadores de tumor sólido de Ehrlich .....98

5.3.5.5 Efeito do tratamento com AG em células NKT do baço de animais portadores de tumor sólido de Ehrlich .....99

5.3.6 Efeito do tratamento com AG na concentração de citocinas no soro e no sobrenadante da cultura de células do baço .....99

5.3.7 O tratamento com AG não altera a celularidade do peritônio dos animais .....101

5.4 Efeito do inibidor da iNOS sobre a sobrevida de animais portadores do TAE102

6 DISCUSSÃO .....104

7 CONCLUSÃO.....113

REFERENCIAS.....114

ANEXO.....130

PRODUÇÕES DURANTE O CURSO DE DOUTORADO .....1322

# LISTA DE ABREVIAÇÕES

| | |
|---|---|
| DC | células dendríticas |
| eNOS | oxido nítrico sintase endotelial |
| GM-CFU | unidades formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos |
| IFN-γ | interferon-γ |
| iNOS | oxido nítrico sintase induzida |
| IRF | fator de transição do fator regulador de IFN |
| LPS | lipopolissacarídeo |
| M-CFU | unidades formadoras de colônias de macrófagos |
| MR ou CD206 | receptores de manose |
| NF-kB | fator nuclear kappa B |
| NK | células *natural killers* |
| nNOS | oxido nítrico sintase neuronal |
| NO | oxido nitrico |
| NOS | oxido nítrico sintase |
| TNF-α | fator de necrose tumoral-α |
| ROS | espécies reativas de oxigênio |
| RNS | espécies reativas de nitrogênio |
| SR | *scavenger receptors* |
| STAT | transdutor de sinal e ativador de transcrição |
| TAM | macrófagos associados ao tumor |
| Th | T *helper* |
| TLR | receptores *Toll-like* |
| VEGF | fator de crescimento endotelial vascular |

Lista de Ilustrações


Figura 1. Os macrófagos de tecidos desempenham importantes funções homeostáticas..... 21

Figura 2. Indutores e propriedades funcionais de diferentes populações de macrófagos polarizados..... 23

Figura 3. O metabolismo da arginina via NOS ou arginase está no centro da polarização M1 / M2 dos macrófagos..... 26

Figura 4. Robert F. Furchgott..... 28

Figura 5. Homodímeros de óxido nítrico sintase (NOS)..... 31

Figura 6. Produção de óxido nítrico (NO) em tumores..... 33

Figura 7. Estrutura molecular da Aminoguanidina..... 40

Figura 8. Representação esquemática de células e mediadores que influenciam a função de TAM..... 43

Figura 9. Protocolo 1 de polarização dos macrófagos Raw264.7 e tratamento com AG..... 52

Figura 10. Protocolo 2 de polarização dos macrófagos Raw264.7 e tratamento com AG..... 52

Figura 11. Estratégia de análise da imunofenotipagem..... 55

Figura 12. Protocolo de tratamento no modelo sólido do Tumor de Ehrlich..... 58

Figura 13. Estratégia de análise para identificação de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos do baço dos animais..... 63

Figura 14. Estratégia de análise para identificação de células NK e NKT do baço dos animais..... 64

Figura 15. Estratégia de análise para identificação de Linfócitos B e macrófagos do baço dos animais..... 66

Figura 16. Protocolo de tratamento no modelo ascítico do Tumor de Ehrlich.. 67

Figura 17. Viabilidade das células Raw 264.7 após tratamento com Aminoguanidina..... 71

Figura 18. Aminoguanidina inibe a produção de óxido nítrico em macrófagos M1..... 72

Figura 19. Valor absoluto de macrófagos Raw 264.7 tratados com Aminoguanidina positivos para marcadores CD80, CD86 e iNOS. 74

Figura 20. Expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos Raw 264.7 tratados com Aminoguanidina..... 75
Figura 21. Histograma da expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos Raw 264.7 tratados com Aminoguanidina..... 76
Figura 22. Efeito da inibição da iNOS na produção de NO e na expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos M1..... 77
Figura 23. Histograma da expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos Raw 264.7 polarizados para o perfil M1 e tratados com Aminoguanidina..... 78
Figura 24. Valor absoluto de macrófagos M1 e tratados com Aminoguanidina positivos para marcadores CD80, CD86 e iNOS. 79
Figura 25. Efeito da inibição da iNOS na produção de citocinas em macrófagos polarizados..... 80
Figura 26. Efeito transitório da inibição da iNOS na produção de no e expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS de macrófagos M1 após retirada dos estímulos e tratamento..... 81
Figura 27. Histograma da expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos Raw 264.7 polarizados para o perfil M1 e tratados com Aminoguanidina..... 82
Figura 28. Valor absoluto de macrófagos M1 tratados com Aminoguanidina positivos para marcadores CD80, CD86 e Inos após retirada dos estímulos e tratamento..... 83
Figura 29. Viabilidade das células do tumor de Ehrlich após tratamento com Aminoguanidina..... 84
Figura 30. Avaliação do desenvolvimento TES em camundongos tratados ou não com AG..... 85
Figura 31. Avaliação do desenvolvimento TES em camundongos tratados ou não com AG..... 86
Figura 32. Fotomicrografia da orelha direita de camundongos com tumor de Ehrlich ou não e tratados ou não com AG..... 87
Figura 33. Fotomicrografia da orelha direita de camundongos com tumor de Ehrlich ou não e tratados ou não com AG..... 89

Figura 34. Fotomicrografia da orelha direita de camundongos com tumor de Ehrlich ou não e tratados ou não com AG..... 90
Figura 35. Peso corporal e consumo de ração de animais portadores do tumor sólido de Ehrlich e tratados com Aminoguanidina..... 91
Figura 36. Caracterização fenotípica dos linfócitos T do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG... 93
Figura 37. Caracterização fenotípica dos linfócitos T auxiliares do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG... 94
Figura 38. Caracterização fenotípica dos linfócitos T citotóxicos do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG... 95
Figura 39. Caracterização fenotípica dos linfócitos B do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG... 96
Figura 40. Caracterização fenotípica dos macrófagos do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG... 97
Figura 41. Caracterização fenotípica das células NK do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG... 98
Figura 42. Caracterização fenotípica das células NKT do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG... 99
Figura 43. Efeito do tratamento com AG na concentração de citocinas no soro e no sobrenadante da cultura de células do baço de animais com tumor sólido de Ehrlich..... 100
Figura 44. Efeito do tratamento com AG sobre o número de células do peritônio e produção de peróxido em animais com tumor de Ehrlich..... 101
Figura 45. Peso corporal e circunferencia abdominal de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com Aminoguanidina..... 102
Figura 46. Curva de sobrevida (Kaplan-Maier) (A), media de sobrevida (B) e expectativa de vida (% ILS) (C) de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com aminoguanidina..... 103

# Lista de Tabelas


| | | |
|---|---|---|
| Tabela 1. | Ações fisiológicas do óxido nítrico..... | 30 |
| Tabela 2. | Potências relativas e seletividade de inibidores de NOS..... | 38 |
| Quadro 1. | Painéis utilizados no ensaio de imunofenotipagem..... | 53 |
| Tabela 3. | Divisão dos grupos experimentais para os animais portadores da forma sólida do turmor de Ehlich..... | 57 |
| Quadro 2. | Painéis para marcação das células do baço..... | 62 |
| Tabela 4. | Divisão dos grupos experimentais para a sobrevida de animais portadores da forma ascítica do turmor de Ehlich..... | 67 |
| Tabela 5. | Escore clínico da orelha de camundongos com Tumor sólido de Ehrlich ou não e tratados com Aminoguanidina..... | 87 |
| Tabela 6. | Contagem global e diferencial de leucócitos no sangue de animais com TES tratados ou não com aminoguanidina..... | 92 |
| Tabela 7. | Celularidade dos órgãos linfóides dos camundongos com TES..... | 93 |

## RESUMO

O óxido nítrico (NO), produzido por macrófagos polarizados para o perfil M1, possuindo um papel dicotômico no controle de células malignas; estimulando ou inibindo o seu desenvolvimento de acordo com sua concentração e/ou origem. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inibição da produção de NO sobre a polarização de macrófagos e sobre o desenvolvimento tumoral. Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade do hemissulfato de aminoguanidina (AG) em células Raw 264.7. Em seguida, foi avaliada a concentração efetiva para a inibição do NO por macrófagos M1. Após estes ensaios, foi escolhida a concentração de 1mM de AG. A partir daí foi investigada se a AG interfere na polarização de macrófagos M1 e M2, baseado na produção de NO e citocinas e na expressão de CD80, CD86 e iNOS. Posteriormente, foi avaliado o tratamento com AG, na dose de 100mg/kg, v.o. em 3 tempos diferentes de tratamento, um inicial (AGI), final (AGF) e contínuo (AGC), de camundongos Swiss portadores das formas ascítica (n=30) e sólida (n=54) do tumor de Ehrlich. Os grupos Limpo e Controle não receberam tratamento e o grupo CICLO foi tratado com ciclofosfamida monoidratada (Genuxal – Baxter Oncology) na dose de 25mg/kg, i.p. Nos animais com tumor ascítico foi avaliada a sobrevida. Nos animais com tumor sólido, foi acompanhada a área de crescimento do tumor e após eutanasiados foi realizada a coleta do soro para as análises bioquímicas; retirada da pata e orelha com tumor para análise histopatológica e retirada dos órgãos linfóides e lavagem peritoneal para verificar a celularidade e cultura. A AG não foi capaz, por si só, de polarizar macrófagos Raw264.7, não alterando a produção de citocinas, nem a expressão de CD80, CD86 e iNOS. Entretanto, a inibição da iNOS em macrófagos polarizados para o perfil M1 intensificou a expressão do CD80, CD86 e da iNOS. A produção das citocinas inflamatórias IL-6; MCP-1 e IL-12p70 e da reguladora IL-10 também foi aumentada. Macrófagos M1 não produziram NO na presença do inibidor em 24 e 48h, no entanto após a retirada do inibidor, iniciaram a produzir NO, sendo maior em 48 horas em relação ao grupo M1 não inibido. Nos animais portadores do tumor ascítico, o inibidor da iNOS não foi capaz de aumentar a sobrevida e nem a expectativa de vida. Em contrapartida, nos animais portadores do TSE, foi observado nos grupos AGI e AGC um retardo no crescimento tumoral. Na análise histopatológica, a presença de vasos sanguíneos foi menor nos grupos AGI, AGF e AGC. Em todos os grupos houve um predomínio de infiltrado de células polimorfonucleares, necrose e edema. Não houve alteração na celularidade dos órgãos linfoides, com exceção da celularidade do linfonodo drenante, que foi menor nos grupos AGI e AGC. Diante disso, o bloqueio da produção NO pela iNOS, *in vitro*, intensifica a polarização de macrófagos M1 e a inibição desta enzima nos momentos iniciais da instalação do tumor sólido de Ehrlich, impede o processo de angiogênese, retardando a progressão tumoral.

Palavras-chave: óxido nítrico, macrófago M1, aminoguanidina, tumor de Ehrlich

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO), produced by M1 macrophages, has a dichotomous role in the control of malignant cells, stimulating or inhibiting their development according to their concentration and/or origin. The aim of this work was to evaluate the effect of inhibition of NO production on macrophage polarization and on tumor development. Initially, the cytotoxicity of aminoguanidine hemisulfate (AG) in Raw 264.7 cells was evaluated. Next, the effective concentration for NO inhibition by M1 macrophages was evaluated. After these assays, the concentration of 1mM AG was chosen. Following, it was investigated whether AG interferes in the M1 and M2 macrophages polarization, based on the NO and cytokines production and the CD80, CD86 and iNOS expression. Subsequently, treatment with AG at a dose of 100 mg/kg, v.o. in 3 different treatment times, initial (AGI), final (AGF) and continuous (AGC), of Swiss mice bearing the ascitic (n = 30) and solid (n = 54) forms of the Ehrlich tumor. The Clean and Control groups received no treatment and the CICLO group was treated with cyclophosphamide monohydrate (Genuxal - Baxter Oncology) at a dose of 25mg/kg, i.p. Survival was evaluated in animals with ascites tumor. In the animals with solid tumor, the tumor growth area was monitored and after the euthanasia the serum collection was done for the biochemical analyzes; removal of paw and ear with tumor for histopathological analysis and removal of lymphoid organs and peritoneal lavage to verify cellularity and culture. AG was not able by itself to polarize Raw264.7 macrophages, without altering the production of cytokines, nor the CD80, CD86 and iNOS expression. However, iNOS inhibition in macrophages polarized into the M1 profile enhanced the CD80, CD86 and iNOS expression. The production of inflammatory cytokines, IL-6, MCP-1 and IL-12p70, and the regulator, IL-10, was also increased. M1 macrophages did not produce NO in the presence of the inhibitor in 24 and 48h, however after the withdrawal of the inhibitor, they began to produce NO, being higher in 48 hours in relation to the non-inhibited M1 group. In the animals bearing the ascites tumor, the iNOS inhibitor was not able to increase survival or life expectancy. On the other hand, in the animals bearing the solid tumor, a delay in tumor growth was observed in the AGI and AGC groups. In the histopathological analysis, the presence of blood vessels was lower in the AGI, AGF and AGC groups. In all groups there was a predominance of polymorphonuclear cell infiltration, necrosis and edema. There was no alteration in the cellularity of the lymphoid organs, except for the cellularity of the draining lymph node, which was lower in the AGI and AGC groups. Therefore, blocking NO production by iNOS *in vitro* enhances the polarization of M1 macrophages and the inhibition of this enzyme in the early stages of Ehrlich solid tumor implantation impedes the angiogenesis process, delaying tumor progression.

Keywords: Nitric oxide, M1 macrophage, aminoguanidine, Ehrlich tumor.

## 1 INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor (MURAD, 1999). Nos organismos vivos essa molécula é sintetizada a partir da oxidação da L-arginina por uma família de isoenzimas conhecidas como Óxido Nítrico Sintase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*) (BANULS et al., 2014).

Os efeitos biológicos do NO estão intimamente relacionados com as 3 isoformas de óxido nítrico sintase: a NOS endotelial (eNOS), atuando na regulação circulatória; a NOS neuronal (nNOS), como transmissor neuronal e a NOS induzível (iNOS), presentes principalmente em macrófagos M1 atuando no processo inflamatório, exercendo papel crucial nos mecanismos de eliminação de patógenos e de células tumorais. (MONCADA; HIGGS, 1991; NATHA, 1992; BREDT; SYNDER, 1992; RATH et al., 2015).

Dados clínicos e experimentais indicam que os macrófagos e seus produtos, como o NO, embora originalmente, fossem considerados parte de uma resposta antitumoral, na grande maioria dos casos, promovem a iniciação, progressão e metástase do tumor (QIAN; POLLARD, 2010). O efeito do NO sobre a progressão tumoral depende da sua fonte, tipo e a atividade das NOS, células endoteliais tumorais vasculares expressam predominantemente eNOS e os macrófagos associados ao tumor expressam iNOS (FUKUMURA et al., 2006).

Nosso grupo de pesquisa tem avaliado o modelo tumoral de Ehrlich, nas suas duas formas, sólida e ascítica, na tentativa de elucidar os efeitos que NO possui no processo de desenvolvimento e no controle tumoral em suas diferentes formas. Assunção et al. (2011) e Fortes et al. (2011) demonstraram que animais tratados com extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHGP) e com o extrato aquoso de mesocarpo de babaçu (EAB) inibiu significativamente o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich, conferindo o efeito tumoricida dos extratos ao aumento no número de células do peritônio e na produção de NO e $H_2O_2$. Em contrapartida, o efeito antitumoral do EHGP na forma sólida do tumor de Ehrlich, foi conferida pela inibição da produção destas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, enquanto que o EAB induziu a expressão de iNOS e consequentemente de NO, promovendo apoptose das células tumorais via caspase-3.

Serra et al. (2016) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *Croton triqueter* Lam. também foi capaz de diminuir o número total de células tumorais e aumentar a sobrevida de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich, atribuindo este efeito tumoral ao aumento da expressão dos marcadores CD14, IA-IE e CD86 em macrófagos Raw 264.7 estimulados ou não com LPS tratados com o EEJ, indicando a capacidade de polarizar macrófagos para o perfil M1, produtor de NO.

Como demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa, diversos agentes modulam a produção de NO pelos macrófagos M1, determinando o desfecho do desenvolvimento tumoral. Diante deste contexto, na luz de compreender melhor o papel desempenhado pelo óxido nítrico produzido pela iNOS de macrófagos M1 no processo tumoral, propomos que o bloqueio direto da iNOS em macrófagos M1 direciona-os para um novo perfil de ativação não produtor de NO e com atividade citotóxica, capaz de impedir o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em suas diversas formas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Macrófagos

Os macrófagos, considerados como importantes células imunes efetoras, foram inicialmente descritos por Elie Metchnikoff, que ganhou o prêmio Nobel em 1908 por sua identificação de fagócitos e sua teoria de fagocitose (NATHAN, 2008). Considerados, células imunes inatas importantes, desempenham papéis essenciais na resposta primária aos patógenos, homeostasia normal do tecido, apresentação de antígenos não próprios e auto-antígenos após infecção ou lesão, resolução de inflamação e cicatrização de feridas (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os macrófagos se diferenciam dos monócitos do sangue periférico, que se desenvolvem a partir de células progenitoras mieloides, identificadas como unidades formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CFU) na medula óssea. Em resposta ao fator de formação de colônias de macrófagos, as GM-CFU sequencialmente dão origem a unidades formadoras de colônias de macrófagos (M-CFU), monoblastos e pró-monócitos. Posteriormente, eles migram para o sangue periférico e se diferenciam em monócitos. Finalmente, os monócitos migram para diferentes tecidos e reabastecem as populações de macrófagos específicos de tecido de vida longa (GORDON; TAYLOR, 2005).

Os macrófagos se apresentam em subpopulações baseados nos tecidos onde se apresentam com grande diversidade anatômica e funcional (GORDON; TAYLOR, 2005). Os macrófagos especializados residentes em tecidos incluem osteoclastos (osso), macrófagos alveolares (pulmão), histiócitos (tecido conjuntivo intersticial) e células de Kupffer (fígado). O intestino é preenchido com vários tipos de macrófagos e células dendríticas (DC), que possuem fenótipos e funções distintas que trabalham juntos para manter a tolerância à flora intestinal e aos alimentos (IANNACOME et al., 2010) (FIGURA 1).

Os órgãos linfoides secundários também possuem populações distintas de macrófagos que realizam funções únicas, incluindo macrófagos de zona marginal no baço, que suprimem a imunidade inata e adaptativa, e os macrófagos dos seios subcapsulares dos linfonodos, iniciam respostas imunitárias humorais antivirais. Macrófagos também residem nos tecidos imune-privilegiados, como o cérebro

(microglia), olho e testículos, onde se supõe que têm funções centrais na remodelação tecidual e na homeostase. (JUNT et al., 2007; MCGAHA et al., 2011).

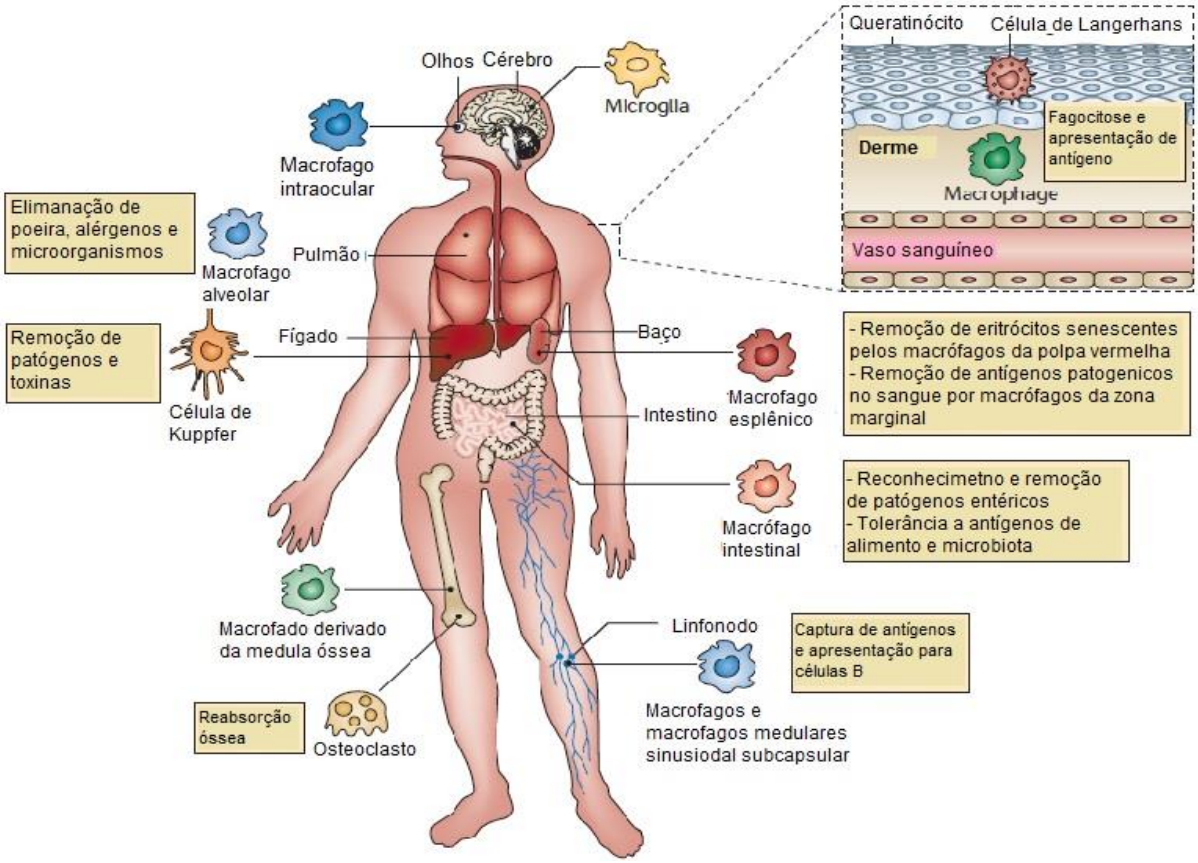



**Figura 1. Os macrófagos de tecidos desempenham importantes funções homeostáticas.** Os fagócitos mononucleares são gerados a partir de células estaminais hematopoiéticas comprometidas localizadas na medula óssea. Os precursores de macrófagos são liberados na circulação como monócitos e migram rapidamente para quase todos os tecidos do corpo, onde se diferenciam em macrófagos maduros. Várias populações de macrófagos de tecidos maduros estão estrategicamente localizadas em todo o corpo e realizam importantes atividades de vigilância imune, incluindo fagocitose, apresentação de antígenos e supressão imune. (Adapatado de MURRAY e WYNN, 2011).

### 2.1.1 Polarização de macrófagos

A heterogeneidade e a plasticidade são características importantes dos macrófagos. Sinais presentes nos diferentes microambientes derivados de agentes patogênicos, tecidos lesados, ou células ativadas da imunidade adaptativa, desencadeiam a ativação de programações genéticas distintas nos macrófagos induzindo diferentes estados de polarização funcional (MANTOVANI et al., 2005).

Por analogia com a classificação de ativação dos linfócitos T auxiliares nos perfis de T *helper* (Th)1 e 2, os macrófagos foram classificados ao longo do que

poderia ser visto como uma escala linear, em que os macrófagos M1 representam um extremo e os macrófagos M2 representam o outro. Nesta classificação, a designação M1 foi reservada para macrófagos classicamente ativados e a designação M2 para macrófagos alternativamente ativados e podem ser ainda subdivididos em macrófagos M2a, M2b e M2c. (MARTINEZ et al. 2008; MURRAY; WYNN, 2011)(FIGURA 2).

Estímulos microbianos, como lipopolissacarídeo (LPS), sozinhos ou em conjunto com citocinas, tais como interferon-γ (IFN-γ), fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e GM-CSF, induzem macrófagos M1 classicamente ativados. Além dos sinais M1 (por exemplo, IFN-γ e LPS), é necessário a ativação de receptores adicionais, como receptores fagocíticos Fc para suportar uma produção robusta e prolongada de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ROS e RNS) (STEEVELS; MEYAARD, 2011).

Os macrófagos M1 aumentam o IRF5 e o fator nuclear kappa B (NF-κB) que induzem produção e secreção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23, e de aniões superóxido, ROS e RNS, nos quais aumentam atividades de citotoxicidade destas células e estão envolvidas na obtenção de respostas Th1 e Th17 (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009; KRAUSGRUBER et al., 2011SINDRILARU et al., 2011)

A IL-12 produzida pelos macrófagos M1 pode promover a diferenciação das células Th1, que podem melhorar a fagocitose antigênica (MARIE et al., 2008; CASSOL et al., 2010). A IL-23 está associada ao desenvolvimento e expansão de células Th17, que podem secretar altos níveis de IL-17, atuando no controle de infecções, especialmente bacterianas e fúngicas extracelulares. contribuindo na proteção epitelial e da mucosa (VERRECK et al., 2004; MIOSSEC. P.; KOLLS 2012). Além disso, os macrófagos M1 expressam níveis elevados de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II e dos receptores co-estimuladores (CD80 e CD86) e secretam fatores de complemento que facilitam a fagocitose mediada pelo complemento (MANTOVANI et al., 2004).

O LPS e o IFN-γ também induzem macrófagos M1 a expressar os ligando de quimiocinas (motivo C-X-C) 9 (CXCL9), CXCL10 e CXCL5 através da ativação do fator de transição do fator regulador de IFN-3 (IRF-3), que resulta na expressão de IFN-β e subsequente ativação STAT1 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 1). Essas

quimiocinas pró-inflamatórias podem promover o recrutamento de células Th1, Tc1 e células *natural killers* (NK), o que pode melhorar sua capacidade de eliminar patógenos intracelulares (MANTOVANI et al., 2004).

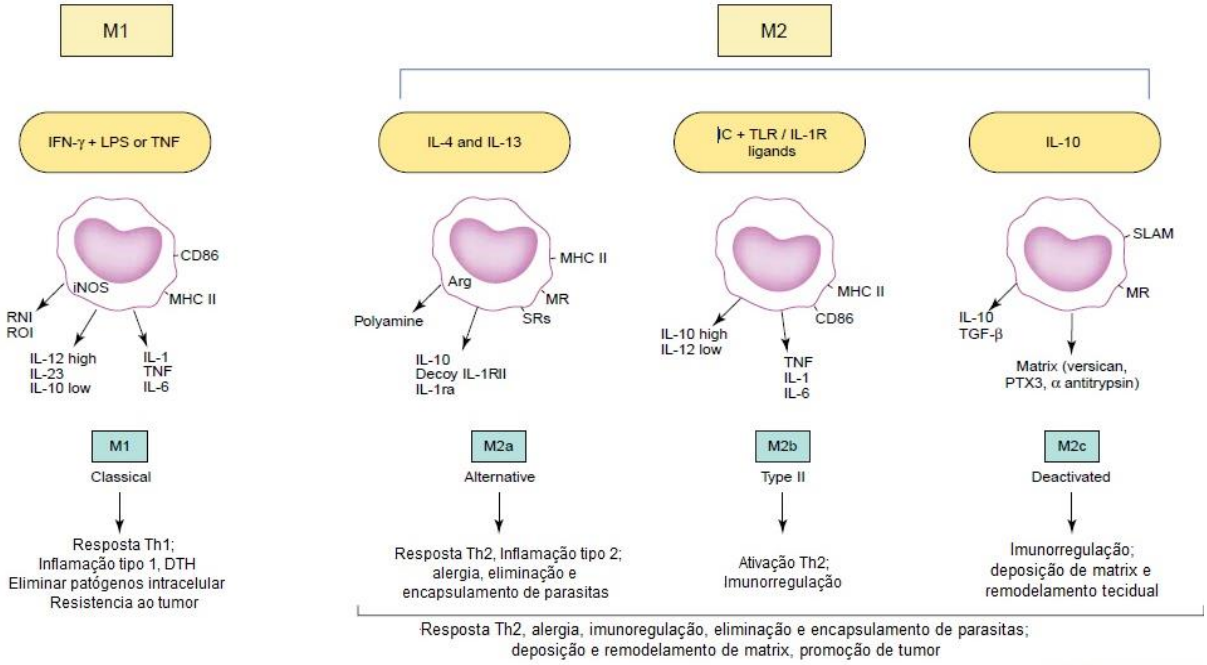



**Figura 2. Indutores e propriedades funcionais de diferentes populações de macrófagos polarizados.** Os macrófagos polarizam e adquirem diferentes propriedades funcionais em resposta a sinais derivados de meio ambiente. A exposição de macrófagos a IFN-γ e LPS conduz a polarização M1, com propriedades citotóxicas e antitumorais potenciadas, enquanto que os macrófagos M2 são, em geral, mais propensos a atividades imunorreguladoras e protumorais. Em particular, M2a (induzida por exposição a IL-4 e IL-13) e M2b (induzida por exposição combinada a complexos imunes e agonistas de TLR ou IL-1R) exercem funções imunorreguladoras e conduzem respostas de tipo II, enquanto que os macrófagos M2c (induzidos por IL-10) estão mais relacionados à supressão de respostas imunes e à remodelação de tecido. Abreviações: DTH, hipersensibilidade de tipo tardio; IC, imunocomplexos; IFN-g, interferon-γ; iNOS, sintase de óxido nítrico induzível; LPS, lipopolissacarídeo; MR, receptor de manose; PTX3, pentraxina longa PTX3; RNI, intermediários reativos de nitrogênio; ROI, intermediários reativos de oxigênio; SLAM, molécula de sinalização de ativação linfocítica; SRs, receptores de eliminação; TLR, receptor Toll like. (Adaptado de Mantovani et al., 2004).

Em contraste, os macrófagos M2 são polarizados por estímulos distintos e podem ser ainda subdivididos em macrófagos M2a, M2b e M2c. Os macrófagos M2a são estimulados pelas citocinas Th2, IL-4 ou IL-13, e os macrófagos M2b são induzidos por complexos imunes (ICs), LPS, receptores *Toll-like* (TLRs) ou o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). Finalmente, os macrófagos M2c são induzidos por IL-10, fator de crescimento transformante-β (TGF-β) ou glicocorticoides (MARTINEZ et al., 2009).

Os macrófagos M2 secretam a IL-10 que promovem a produção de IL-4 e IL-13 por células Th2 (MANTOVANI et al., 2009). A IL-4 é um importante promotor da

cicatrização de lesões por ativar a arginase, o que contribui para a produção da matriz extracelular. A expressão de *scavenger receptors* (SR) e de receptores de manose (MR ou CD206) levam os macrófagos M2 a participarem principalmente da depuração de parasita, remodelação dos tecidos, modulação imunológica e progressão tumoral (SINDRILARU et al., 2011).

Os macrófagos M2 inibem CXCL9, CXCL10 e CXCL5 por diminuir a regulação do NF-κB e STAT1 (LI; VERMA, 2002). Os macrófagos M2a induzidos por IL-4 e IL-13 promovem a expressão da quimiocina (motivo C-C) ligando 24 (CCL24), CCL17 e CCL22. Essas quimiocinas podem se combinar especificamente com o receptor 3 de Quimiocina (motivo C-C) (CCR3) e CCR4, que aceleram o recrutamento de eosinófilos, basófilos e células Th2, para levar a uma resposta de tipo II (MANTOVANI et al., 2004).

As células M2b sempre secretam CCL1, que se liga ao CCR1 para promover a infiltração de eosinófilos, Th2 e células T reguladoras. Essas células exercem regulação imunológica e conduzem a resposta Th2. Em macrófagos M2c, a IL-10 induz a produção de CXCL13, CCL16 e CCL18, que podem se ligar ao CXCR5, CCR1 e CCR8 para promover a acumulação de eosinófilos e células T *naive*, que desempenham um papel proeminente na supressão de respostas imunes e promovendo a remodelação de tecidos (MANTOVANI et al., 2004).

Uma rede de sinalização de moléculas, fatores de transcrição, mecanismos epigenéticos e reguladores pós-transcrição subjazem as diferentes formas de ativação de macrófagos. As vias de sinalização IRF e STAT, ativadas por IFN-γ e pela ativação dos TLR polarizam para fenótipo M1 (via STAT1) ou por IL-4 e IL-13 em direção ao fenótipo M2 (via STAT6) (SICA; BRONTE, 2007).

Os receptores de tipo I e tipo II de IL-4 (JUNTTILA et al., 2008) ativam STAT6, o qual, por sua vez, ativa a transcrição de genes típicos da polarização M2, por exemplo, receptor de manose (Mrc1), resistina tipo α (Retnla, Fizz1) e quitinase 3-like 3 (Chi3l3, Ym1) (PAULEAU, et al., 2004). A IL-10 ativa a expressão de genes mediadas por STAT3 (Il10, Tgfb1, Mrc1) associados a um fenótipo tipo M2 (LANG et al., 2002).

A ativação mediada por STAT de macrófagos é regulada por membros da família SOCS. A IL-4 e o IFN-γ, este último em conjunto com estimulação de TLR,

aumenta a regulação de SOCS1 e SOCS3, que por sua vez inibem a ação de STAT1 e STAT3, respectivamente (WHYTE et al., 2011).

Os receptores nucleares PPARγ (ODEGAARD et al., 2007) e PPARδ (ODEGAARD et al., 2008) controlam subconjuntos distintos de genes associados à ativação de macrófagos M2 e ao metabolismo oxidativo. Curiosamente, STAT6 coordena e sinergiza tanto com o PPARγ (SZANTO et al., 2010) quanto com o fator 4 de Krüppel (KLF4).

O KLF4 coopera com STAT6 para induzir genes M2 (Arg-1, Mrc1, Fizz1, PPARγ) e inibe os genes M1 (TNFa, Cox-2, CCL5, iNOS) por meio do sequestro de coativadores necessários para a ativação NF-κB. O KLF2 regula a ativação de macrófagos pela inibição das atividades NF-κB / HIF-1α (MAHABELESHWAR et al., 2011). A IL-4 também induz a atividade de c-Myc em macrófagos humanos, que controla genes de ativação de M2 (Scarb1, Alox15 e Mrc1), bem como a ativação STAT6 e PPARγ (PELLO et al., 2012).

O envolvimento de TLR leva à ativação de NF-κB e à produção de mediadores inflamatórios (BONIZZI; KARIN, 2004) associados a macrófagos M1. No entanto, a ativação de NF-κB também ativa um programa genético essencial para a resolução da inflamação (LAWRENCE; GILROY, 2007) e para a polarização de M2 de macrófagos associados a tumores (TAMs) (HAGEMANN et al., 2008). Além disso, a indução dos homodímeros p50 NF-κB é essencial para a polarização M2 *in vitro* e *in vivo* (PORTA et al., 2009). Os fatores induzíveis de hipóxia HIF-1α e HIF-2α são expressos diferencialmente em macrófagos polarizados com M1 e M2 (TAKEDA et al., 2010) e regulam a iNOS (M1) e a arginase 1 (M2).

A ativação de macrófagos nos seus dois perfis pode ser distinguida também através do metabolismo diferencial da L-arginina. Os macrófagos M1 apresentam a iNOS que cataboliza a L-arginina em óxido nítrico (NO) e citrulina, enquanto que os macrófagos M2 induzem arginase 1, que metaboliza arginina em ornitina e poliaminas, que são precursores necessários para a síntese de colágeno e proliferação celular (RATH et al., 2015) (Figura 3).

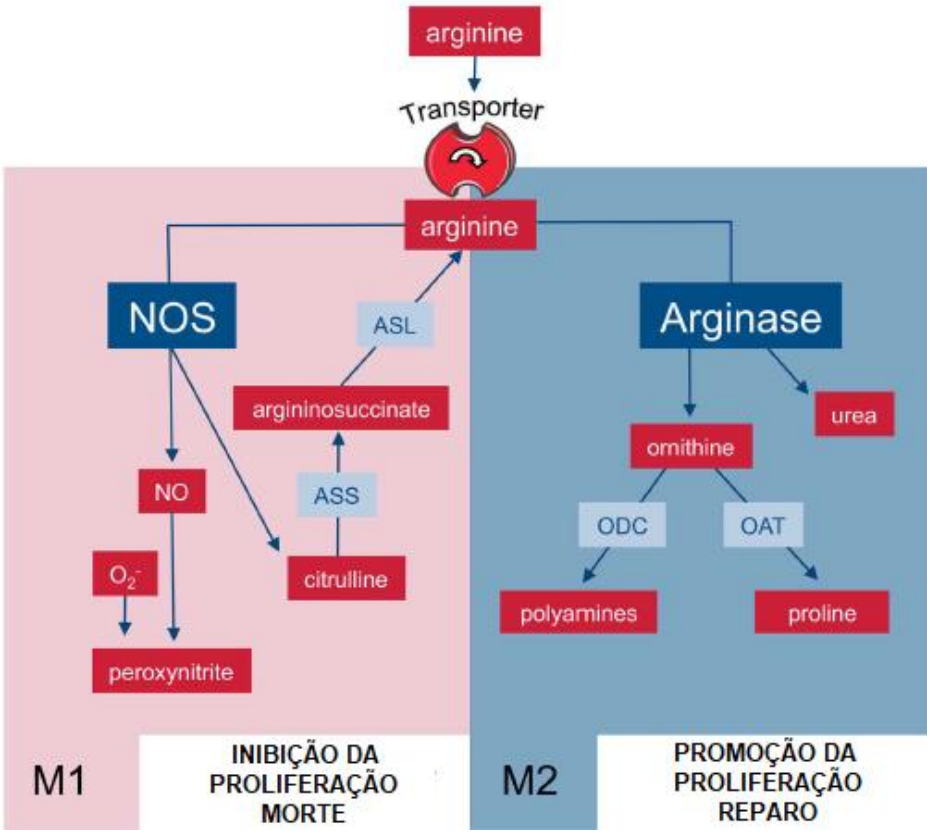



**Figura 3. O metabolismo da arginina via NOS ou arginase está no centro da polarização M1 / M2 dos macrófagos.** Os macrófagos M1 e M2 são caracterizados pelo metabolismo da arginina via NOS ou arginase com consequências funcionais importantes. ASL, succinato de arginino-lisiase, ASS, succinato de arginino sintase; NOS, óxido nítrico sintase; OAT, ornitina aminotransferase; ODC, ornitina decarboxilase. (Adaptado de RATH et al., 2014).

A alta plasticidade é uma característica importante dos macrófagos, investigações *in vitro* mostraram claramente que os macrófagos polarizados (M1 ou M2) alteram seu perfil de expressão de acordo com as mudanças nos estímulos. Portanto, os macrófagos poderiam repolarizar em resposta às mudanças no microambiente local, permitindo que eles formem o meio inflamatório local para se adaptar aos estímulos externos e contribuir para o desenvolvimento de certos distúrbios (MOSSER; EDWARDS, 2008).

### 2.1.2 Macrófagos associados ao tumor

Um tumor, conforme definido por Willis (1951), é "uma massa anormal de tecido, cujo crescimento não está coordenado com o dos tecidos normais e persiste após a cessação dos estímulos que provocaram a mudança". Os tumores são

compostos por células tumorais em proliferação e células estromais, incluindo células endoteliais, células inflamatórias e fibroblastos (MUKHTAR et al., 2011). Na década de 1970, descobriu-se que os macrófagos associados ao tumor (TAM), como principais leucócitos, desempenham um papel fundamental no crescimento tumoral (BALKWILL et al., 2005).

Dados clínicos e experimentais indicam que os macrófagos, embora originalmente, fossem considerados parte de uma resposta antitumoral, na grande maioria dos casos, promovem a iniciação, progressão e metástase do tumor (QIAN; POLLARD, 2010). Em tumores estabelecidos, as TAMs estimulam a migração de células tumorais e invasão, bem como a resposta angiogênica necessária para crescimento tumoral (QIAN; POLLARD, 2010).

Foi descrito um papel protetor na tumorigênese para os macrófagos M1, que ativam os mecanismos de morte tumoral e antagonizam as atividades de supressão de TAMs, MDSCs, macrófagos M2, macrófagos regulatórios e células mieloides imaturas, que demonstraram suprimir a resposta imune adaptativa específico ao tumor e promover o crescimento tumoral, invasão, metástase, estroma remodelação e angiogênese (NARDIN; ABASTADO, 2008).

Os macrófagos têm um papel importante na angiogênese do tumor, pois regulam o aumento marcado da densidade vascular, conhecido como o interruptor angiogênico, que é necessário para a transição para o estado maligno (LIN et al., 2006). Estas TAM angiogênicas são caracterizadas pela expressão do receptor de angiopoietina TIE2, que também é expresso em macrófagos durante o desenvolvimento. Ablação desta população específica inibe a angiogênese tumoral e, portanto, crescimento tumoral e metástase em uma variedade de modelos (MAZZIERI et al., 2011). As TAM secretam muitas moléculas angiogênicas, incluindo membros da família de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TNF-α, IL-1β, IL-8, PDGF, FGF e óxido nítrico (STOCKMANN et al., 2008).

O papel das TAMs nos tumores ainda é controverso. Foi relatado que, nos tumores colorretais, as TAMs são pró-inflamatórias e desempenham um papel antitumoral, o que leva a um bom prognóstico (ONG et al., 2012). Uma das possíveis razões é que as TAM M1 promovem células de tumor de colón que expressam galcetina-3, que induzem mais a infiltração de TAMs e levam a uma resposta imune

de amplificação para destruição de células tumorais (DUMONT et al., 2008). Por outro lado, as TAMs expressam uma série de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-γ, IL-1 e IL-6, que ativam a célula T de tipo 1 associada a respostas imunes antitumorais (ONG et al., 2012).

No entanto, na maioria dos tumores, como mama, próstata, ovário, cervical, carcinoma pulmonar e melanoma cutâneo, as TAMs são consideradas antiinflamatórias e correlacionadas com um prognóstico ruim. Estudos epidemiológicos sugeriram que um microambiente rico em macrófagos promoverá um tumor agressivo com alto potencial metastático (NARDIN; ABASTADO, 2008).

## 2.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*), é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor (MURAD, 1999), gerado naturalmente por descargas elétricas (GOLDENBAUM; DICKERSON, 1993), produzido industrialmente como um intermediário químico importante (CHEN et al., 1990), ou liberado como um poluente do ar de motores de automóveis ou usinas de energia de combustíveis fósseis (FAIZ et al., 1996).

Furchgott e Zawadzki (1980) (Figura 4) atribuiram ao NO a sua primeira função biológica como vasodilatador ao estudar o fator de relaxamento derivado do endotélio, sendo este radical livre, altamente lipofílico, uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (DUSSE, 2003).

**Figura 4. Robert F. Furchgott.** Furchgott identificou a primeira função biológica do NO como vasodilatador. Fonte: www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/**.**

As funções do NO, até hoje descobertas, são complexas e antagônicas. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual. Essa molécula é um importante mensageiro intracelular nos mamíferos superiores, atuando como neurotransmissor, possui uma função chave na formação de novos vasos sanguíneos, processo denominado angiogênese, além do tônus da musculatura lisa, a reposta imune e apoptose (BANULS et al., 2014; COOKE; LOSORDO, 2002; IGNARRO, 2000). Esse papel dicotômico, também é reportado no controle de células malignas; estimulando ou inibindo o seu desenvolvimento de acordo com sua concentração e/ou origem (CHENG et al., 2014) (TABELA 1).

Nos organismos vivos essa molécula é sintetizada a partir da oxidação de um dos nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida a L-citrulina através da ação catalítica de uma família de isoenzimas conhecidas como Óxido Nítrico Sintase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*) (BANULS et al., 2014; MONCADA et al., 1991).

Apesar de gerarem os mesmos produtos, três distintas isoformas das NOS já foram identificadas. Elas são geralmente conhecidas como NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS induzida (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase* ou NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3) (ALDERTON et al., 2001). A iNOS é expressa em uma variedade de células, incluindo macrófagos, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas, entretanto, diferente da nNOS e da eNOS, seu gene apresenta-se sob controle transcricional de uma variedade de mediadores inflamatórios (MATTILA; THOMAS, 2014).

Tsutsui et al. (2015) demonstraram que camundongos deficientes das três isoformas de NOS exibem dilatação dependente do endotélio reduzida e possuem expectativa de vida mais curta devido ao surgimento precoce de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca diastólica, arterisclerose e infarto do miocárdio.

A catalisação da L-arginina em NO pelas NOS somente é possível na presença de vários co-fatores, incluindo tetrahidrobiopterina (BH4), dinucleótido de flavina e adenina, mononucleótido de flavina, calmodulina e protoporfirina IX de ferro (heme) (ALDERTON et al., 2001; FORSTERMANN; MUNZEL, 2006). As três isoformas NOS são sintetizadas como monómeros e precisam formar dímeros para se ligar a BH4 e

ao substrato L-arginina para catalisar a produção de NO (RAFIKOV et al., 2011). Os monómeros geram superóxido ($O_2^-$) em vez de NO do seu domínio oxigenase, uma condição que é referida como desacoplamento de NOS (FORSTERMANN; MUNZEL, 2006)(Figura 5).

**Tabela 1. Ações fisiológicas do óxido nítrico.**

| Origem/Ação | EFEITO |
|---|---|
| **AÇÃO VASOMOTORA** | - Promove a vasodilatação dependente do endotélio.<br>- Inverte os efeitos constritivos intrínsecos da acetilcolina no músculo liso vascular.<br>- No endotélio normal, NO diminui o efeito vasoconstritor do aumento do $Ca^{2+}$ livre intracelular nas células do músculo liso.<br>- A produção simultânea de peroxinitrito ($ONOO^-$) diminui o papel vasodilatador do NO.<br>- No endotélio normal, fatores de relaxamento (em particular NO) predominam sobre fatores constritivos (como NG-monometil-Larginina (L-NMMA), NG-nitro-L-arginina (L-NA) e éster metílico de NG-nitro-L-arginina (L-NAME)).<br>- A liberação de óxido nítrico pode ser de importância fisiológica na regulação do tônus basal sistêmico e coronário, especialmente no nível das arteríolas nessas distribuições vasculares<br>-´Na circulação coronária normal, o óxido nítrico contribui para o tônus dilatador epicárdico e arteriolar basal. |
| **INFLAMAÇÃO** | - Vários mediadores inflamatórios, como bradicinina e histamina, produzem vasodilatação através da estimulação da liberação de endotélio NO.<br>- NO diminui a permeabilidade endotelial, atuando predominantemente como agente anti-inflamatório.<br>- O NO desempenha um papel importante na regulação da expressão da P-selectina, ao reduzir a expressão da P-selectina e diminuir a adesão dos leucócitos ao endotélio.<br>- NO inibe a expressão das moléculas de adesão β-2 nos neutrófilos.<br>- A adesão de leucócitos ao endotélio vascular em resposta à estimulação com um fator quimiotáctico pode ser marcadamente suprimida por doadores de NO.<br>- NO *down*-regula a agregação e secreção de neutrófilos.<br>- NO regula cuidadosamente a reatividade dos mastócitos (as células desempenham um papel central no processo inflamatório).<br>- A produção de NO por mastócitos pode resultar em uma diminuição da propensão para que estas células se desgranem.<br>- NO também inibe a produção de uma variedade de citocinas imunomoduladoras (por exemplo, IL-12, IL-1) por macrófagos.<br>- NO age para regular a agregação e adesão de plaquetas.<br>- NO também medeia pelo menos alguns dos efeitos pró-angiogênicos do VEGF. |
| **ANTIOXIDANTE** | - NO é um importante radicais livres *in vitro* e *in vivo*.<br>- A administração de doadores de NO duplica a capacidade antioxidante do plasma<br>- A produção de NO em quantidades que excedem a produção local de $O_2^-$ leva à decomposição acelerada de $ONOO^-$ para nitrato e nitrito, reduzindo a exposição do tecido a $ONOO^-$ e ao $OH^-$ que pode ser formado por $ONOO^-$.<br>- A falta de NO, após a administração de um inibidor de NO sintase (NOS), resultou em uma acumulação de $O_2^-$ |

Fonte: Adaptado de Tousoulis et al., 2012.

A eNOS é a principal isoforma que regula a função vascular, atuando como um potente vasodilatador (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; FORSTERMANN; MUNZEL, 2006). A atividade de eNOS e, consequentemente, a produção de NO pode ser iniciada e reforçada por vários estímulos como estresse de cisalhamento (ANDREWS et al., 2010), acetilcolina (CHEN et al., 1996), bradicinina (BAE et al., 2003), histamina (LI et al., 2003) e 17β-estradiol (SELLES et al., 2001). Os agonistas, como a acetilcolina, a bradicinina e a histamina, atuam em receptores específicos na membrana das células endoteliais para aumentar a concentração intracelular de cálcio, que se liga à calmodulina e leva à ativação do domínio de ligação à calmodulina do eNOS (WALCH et al., 2000). Este processo facilita o fluxo de elétrons dos domínios da redutase para a oxigenase da enzima para a produção de NO (SESSA, 2004).

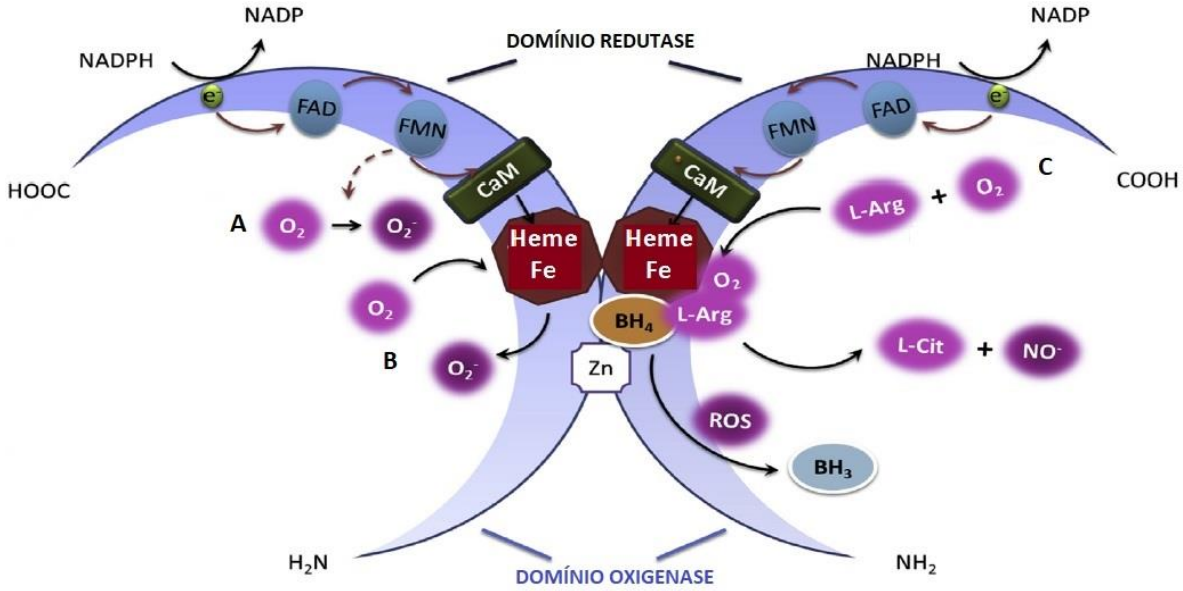



**Figura 5. Homodímeros de óxido nítrico sintase (NOS).** A - Como monodímeros, a NOS produz $O_2^-$ em vez de $NO^-$. B - Mesmo como monodímeros, a produção significante de $O_2^-$ ocorrerá quando as concentrações efetivas de L-arginina (L-Arg) estiverem abaixo dos níveis necessários para saturar a enzima; C – Quando há L-arginina e tetrahidrobiopterina suficientes (BH4), estas se ligam as duas NOS acopladas e o fluxo de elétrons fornecido pelo fosfato de dinucleótido de adenina de nicotinamida (NADPH) passa através de dinucleótido de flavina adenina (FAD), flúor mononucleótido (FMN), calmodulina (CaM) e protoporfirina IX de ferro (Haeme Fe), e eventualmente é usado na produção de NO. A BH4 é essencial para o acoplamento da NOS e as espécies reativas de oxigênio (ROS) oxidam BH4 para o radical $BH3^{\cdot}$, levando ao desacoplamento NOS (Adaptado de RAFIKOV et al., 2011).

A nNOS produz NO tanto no sistema nervoso central e como no periférico e, portanto, desempenha um papel na comunicação celular (BREDT et al., 1990; DAWSON et al., 1991). O NO produzido pela nNOS atua na regulação da excitabilidade e do disparo neuronal, na potencialização ou depressão a longo prazo

da plasticidade sináptica, bem como na memória e nos processos de aprendizagem. Além disso, regula a liberação de neurotransmissores como acetilcolina, histamina e serotonina (STRAUB et al., 2007). A nNOS também é expressa em miócitos cardíacos e esqueléticos (XU et al., 1999; KOBZIK et al., 1994), músculo liso e células endoteliais (BOULANGER et al., 1998), a camada adventícia das artérias penianas (BURNNET et al., 1992) e as células da mácula densa no rim (BACHMANN et al., 1995).

Uma característica do iNOS é a falta de expressão em células em condições fisiológicas, sendo induzida por estímulos imunológicos de forma independente de cálcio, o que levou à sua designação original como NO sintase induzível (iNOS) (NATHAN, 1992). A indução de iNOS ocorre principalmente durante a infecção, inflamação crônica e tumores (KRONCKE, 1998). A ativação do gene promotor da iNOS requer o IRF-1 e o NF-κB ativadas, explicando por que a expressão de iNOS é característica da inflamação (MARTIN et al., 1994; XIE et al., 1994).

O NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais, através de sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório (DUSSE, 2003). Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido ($O_2^-$) resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas (BECKMAN; KOPPENOL, 1994.).

## 2.3 Óxido Nítrico e o Tumor

As células tumorais muitas vezes expressam iNOS e, em alguns casos, eNOS e nNOS, dependendo do tipo e estágio do tumor. O efeito do NO sobre a progressão tumoral depende da sua fonte (células tumorais ou células estromais), tipo e a atividade das NOS. As células endoteliais tumorais vasculares expressam predominantemente eNOS. Os fibroblastos estromados associados aos tumores e as células imunes geralmente expressam iNOS. Em muitos tumores, os níveis de

expressão e as atividades das diferentes NOS aumentam em comparação com os tecidos normais correspondentes (Figura 6) (FUKUMURA et al., 2006).

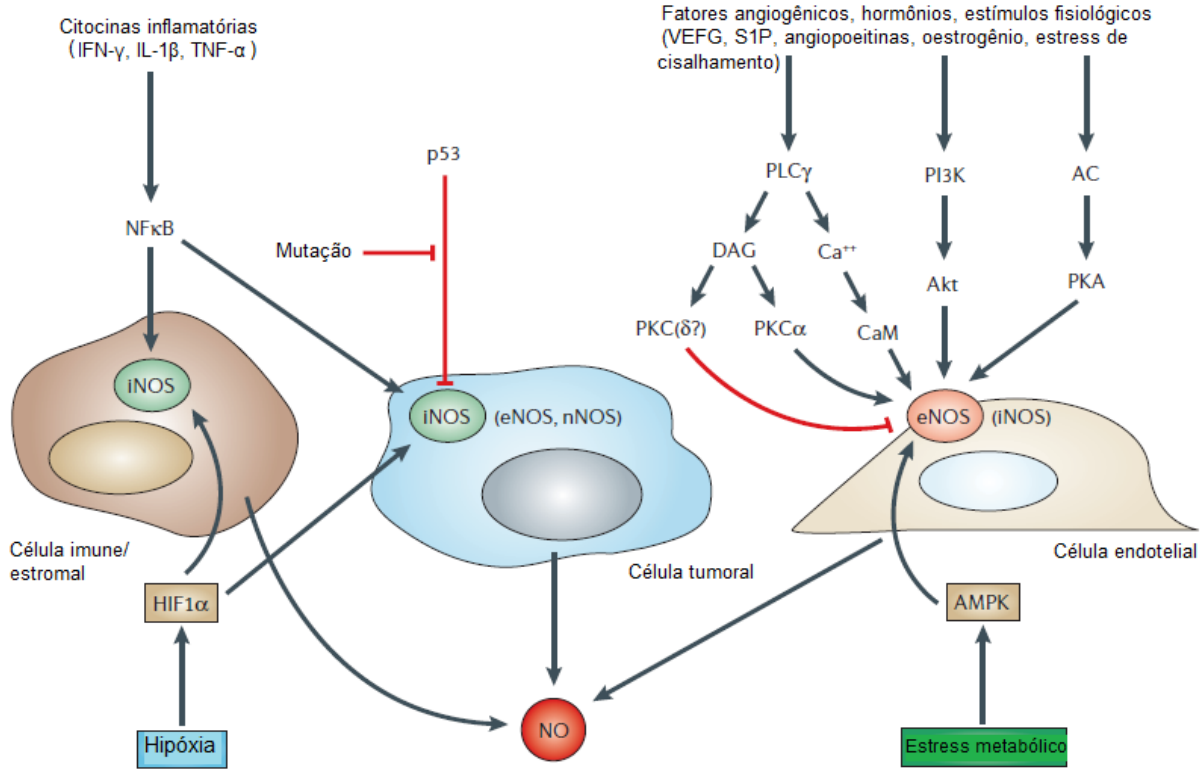



**Figura 6. Produção de óxido nítrico (NO) em tumores.** As células tumorais muitas vezes expressam NO sintase induzível (iNOS) e, em alguns casos, NOS endoteliais (eNOS) e NOS neuronais (nNOS). As células endoteliais vasculares tumorais expressam predominantemente eNOS. Os fibroblastos estromados associados aos tumores e as células imunes expressam iNOS. As citocinas inflamatórias, como o interferon-γ (IFN-β), a interleucina 1-β (IL1-β) e o fator de necrose tumoral α (TNF-α) induzem a expressão de iNOS através do fator nuclear κB (NF-κB). A hipóxia também induz iNOS através do fator induzível 1 da hipóxia (HIF1-α). Enquanto o supressor de tumor de tipo selvagem p53 inibe a expressão de iNOS, o p53 mutante não consegue fazê-lo. Fatores angiogênicos como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), esfingosina-1-fosfato (S1P), angiopoietinas, hormônios sexuais e esforço de cisalhamento ativam eNOS em células endoteliais vasculares através de adenilato ciclase (AC), proteína quinase A (PKA), fosfoinositide 3-kinase (PI3K), Akt, fosfolipase Cγ (PLCγ), diacilglicerol (DAG), proteina quinase Cα (PKCα) e PLCγ, cálcio citossólico ($Ca^{2+}$). calmodulina (CaM). O estresse metabólico também ativa o eNOS através da AMP kinase (AMPK). O NO é produzido por todas essas fontes diferentes em tumores. (Adaptado de FUKUMURA et al., 2006).

A inflamação crônica e a exposição contínua a concentrações moderadas a altas de NO que são produzidas pela iNOS podem estar envolvidas na transformação neoplásica. O NO e seus derivados podem promover danos ao DNA, como desaminação nitrosa de bases de ácido nucleico, transição e ou transversão de ácidos nucleicos, alquilação e ruptura de cadeia de DNA, e inibição de enzimas de reparo de DNA, como a alquil-transferase e DNA-ligase, através de mecanismos diretos ou indiretos (LALA; CHAKRABORTY, 2001). Mutações no gene que codifica o supressor de tumor p53, ou nitrosilação de S de caspases, podem produzir células resistentes a

apoptose e facilitar a acumulação adicional de mutações e seleção clonal subsequente (EKMEKCIOGLU et al., 2005).

Uma série de estudos demonstraram que o NO produzido pela iNOS, pode iniciar e ou promover a tumorigênese (HOFSETH, et al., 2003). Ahn e Ohshima (2001) demonstraram que camundongos com duplas mutações em polipose coli adenomatosa (Apc) e na iNOS apresentaram menos pólipos adenomatosos nos pequenos e grandes intestinos em comparação com ratos com mutação apenas na Apc. Além disso, ratos $iNOS^{-/-}$ mostraram diminuição da incidência de carcinogênese gástrica induzida por *Helicobacter pylori* (NAM et al., 2004). A interrupção genética de iNOS produziu uma redução de 80% na formação de tumor de pulmão induzido por uretano e níveis mais baixos de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)(KISLEY et al., 2002).

Em contraste, efeitos inibitórios do NO sobre a tumorigênese foram demonstrados. Concentrações relativamente baixas de NO aumentaram a proteína quinase dependente do DNA (DNA-PK), que mantém a integridade do genoma (XU, et al., 2000). Foi demonstrado também que o TNF-α pode induzir a transformação de células epidérmicas de rato JB6, sendo este processo inibido por um doador de NO, enquanto um inibidor de NOS aumentou (DHAR et al., 2003). Um terceiro estudo mostrou que o NO derivado de iNOS suprime a linfomagênese mesmo na deficiência de p53, promovendo a apoptose e diminuindo a proliferação de células tumorais (HUSSAIN et al., 2004).

Vários mecanismos foram propostos para explicar como a expressão de NOS nas células tumorais promove a progressão do tumor: primeiro, foi demonstrado que iNOS e eNOS aumentaram a migração e invasão das células de câncer de mama e de câncer de cólon através de guanilato ciclase solúvel (sGC) e via de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (JADESKI et al., 2003); segundo, descobriu-se que a iNOS estava associada ao aumento da proliferação celular em linfoma T (BARREIRO et al., 2003).

Em terceiro lugar, o NO a partir de células de melanoma murino reduziu a reação dos linfócitos em camundongos portadores de tumores, o que indica uma fuga da imunovigilância através de disfunção de células imunes induzidas pelo NO (ZHANG; XU, 2001) e, por último, vários estudos mostraram que a indução de iNOS

em células tumorais promove a angiogênese (aumentando a expressão de VEGF), o que aumenta a densidade microvascular e a progressão tumoral (JENKINS et al., 1995).

Estudos relataram que a NO induziu citotoxicidade para várias células tumorais, sugerindo que o NO e seus produtos induzem a apoptose e necrose das células cancerosas (KIM, 2012; ZANG et al., 2012). O NO recém-formado passa a membrana celular e é consumido em uma reação complexa com $H_2O_2$ ou reage com aniões de superóxido ($O2^-$) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). Após a protonação do peroxinitrito, o ácido peroxinítrico resultante (ONOOH) decompõe-se espontaneamente e produz $NO_2$ e radicais hidroxilo induzindo a morte celular por necrose induzida pela depleção de energia e apoptose induzida pela sua ação oxidante (BROWN; BORUTAITE, 2001; BAUER, 2014).

A necrose induzida por depleção de energia resulta da depleção de ATP causada pelo NO e seus derivados através de quatro mecanismos diferentes: inibição da respiração mitocondrial, indução de transição de permeabilidade mitocondrial, inibição da glicólise em gliceraldeído-3-fosfato e desidrogenase, e ativação de poli-ADP ribose polimerase (PARP, ou sintetase: PARS) (BROWN; BORUTAITE, 2001).

Em células expostas ao NO, a glicólise é crítica para a sobrevivência, pois níveis moderados de NO invariavelmente inibem a respiração mitocondrial e, portanto, a produção de ATP mitocondrial. Na ausência de glicose ou capacidade glicolítica suficiente, níveis moderados de NO causam necrose simplesmente devido à inibição respiratória e consequente depleção de ATP e a apoptose é impedida pela falta de ATP (LEIST et al., 1999).

Se a glicólise é suficiente para compensar a inibição respiratória, então o NO pode induzir a apoptose. A apoptose induzida pelo NO é acompanhada por ativação de caspases (como a caspase-3) e é bloqueada por inibidores da caspase (BAL-PRICE e BROWN, 2000). O citocromo c é geralmente liberado, sugerindo que a apoptose induzida pelo NO é normalmente mediada por mitocôndrias, mas em alguns tipos de células é observada a ativação precoce de caspase-8 ou caspase-2 indicando que a apoptose induzida pelo NO pode ser desencadeada não através da via mitocondrial (YABUKI et al., 2000).

Foram sugeridas três rotas principais de como o NO induz a apoptose: pela transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), regulação positiva de p53 e ativação da MAP quinase (HEALES et al., 1999). O NO por si só geralmente não induz o MPT; no entanto, o peroxinitrito e outros produtos podem causar apoptose ativando diretamente o MPT, levando a liberação do citocromo c e ativação de caspase, portanto, esses eventos podem ser bloqueados com o inibidor de MPT ciclosporina A (BORUTAITE et al., 2000).

O NO pode causar fosforilação e acumulação de p53, seja por danos no DNA causadas por quinases ativadas, inibição do proteassoma ou MAP quinases, o que pode levar à apoptose, como demonstrado pela descoberta de que os oligonucleotídeos anti-p53 podem bloquear a morte induzida pelo NO em algumas células (MESSMER; BRUNE, 1996). NO também pode causar danos ao DNA, possivelmente através de peroxinitrito, $NO_2$, $N_2O_3$, ferro livre ou ROS (BURNEY et al., 1998).

As vias de MAP quinase podem ser ativadas por NO e induzir a apoptose, através do aumento da proporção das proteínas proto-anti-apoptóticas de domínio BH3 (por exemplo, Bax / Bcl-2) que induzem a clivagem e translocação de lances para mitocôndrias levando à liberação do citocromo c (ZHUANG et al., 2000). A ativação induzida pelo NO da p38 MAP quinase mostrou promover a translocação de Bax para mitocôndrias e causar a morte celular, que não é bloqueada pelos inibidores de caspase (GHATAN et al., 2000).

A acumulação de dados clínicos e pré-clínicos demonstram que NO medeia a angiogênese através de mecanismos diretos e indiretos e mantém o fluxo sanguíneo do tumor e o suprimento de nutrientes e oxigênio, promovendo assim a progressão tumoral. Portanto, a inibição da sinalização NO é uma estratégia terapêutica anti-angiogênica potencial (GRATTON et al., 2003).

A inibição contínua de iNOS por um inibidor seletivo, 1400W, inibe o crescimento de cancros no colón humano, bem como de câncer de mama murino que expressam iNOS endógeno. No entanto, 1400W não conseguiram inibir os cancros do colón murino que não expressavam iNOS em níveis apreciáveis (THOMSEN et al., 1997).

Estudos pré-clínicos indicam que a diminuição na produção do NO pode ser de valor na quimioprevenção. A prevenção da tumorigênese por inibidores seletivos de iNOS foi relatada em três modelos de tumorigênese diferentes: polipose colônica induzida por mutação Apc (AHN; OHSHIMA, 2001), formação de focos aberrantes no colón (RAO, et al., 2002) e irradiação de baixa dose combinada com tumorigênese mamária induzida por dietilestilbestrol (ELLIES et al., 2003).

Tanto as células epiteliais como as células imunes infiltradas expressam iNOS nesses modelos de tumorigênese, embora suas contribuições relativas aos efeitos pró ou antitumorigênicos sejam difíceis de distinguir. O nível de expressão, a duração e o tempo de entrega do NO, o microambiente, o fundo genético e o tipo de célula podem determinar a sensibilidade e o efeito geral do NO (FUKUMURA et al., 2006).

### 2.3.1 Inibidores do óxido nítrico

O aumento da produção de NO, por si só ou na presença de outros radicais livres, como o superóxido, tem sido implicado em mudanças fisiopatológicas em praticamente todos os sistemas orgânicos, onde a célula produtora de NO e seu microambiente não estão a salvo da toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas (DUSSE, 2003). A indução de iNOS é vista em modelos de choque séptico (VALLANCE; CHARLES, 1998), dor inflamatória e não inflamatória (LUO; CIZKOVA, 2000; SABAN et al., 2002), artrite (VAN´T HOF; RALSTON, 2001), doença inflamatória intestinal (KUBES; MCCAFFERTY, 2001), asma (SANDERS, 1999) e no cérebro após isquemia ou trauma, bem como em vários modelos de neurodegeneração ou inflamação cerebral (IRAVANI et al., 2002).

A iNOS não é a única isoforma que pode causar um aumento fisiopatológico no NO. Em particular, o aumento da atividade de nNOS está associado a certos tipos de neurotoxicidade. A neurotoxicidade induzida por NMDA (N-metil-D-aspartato) é reduzida por inibidores de NOS em alguns modelos (IZUME et al., 1992), e o dano de acidente vascular cerebral é reduzido em ratos deficientes de nNOS (HUANG et al., 1994). A nNOS desacoplada também pode gerar superóxido através de oxidação NADPH quando as concentrações de arginina ou BH4 são baixas, ou na presença de certos inibidores de NOS à base de arginina (ALDERTON et al., 2001).

Em relação a eNOS, tem se concentrado nos seus efeitos cardioprotetores, no entanto existem algumas situações nas quais o NO derivado de eNOS pode ser prejudicial. A deficiência de eNOS parece ser benéfica na retinopatia induzida por hiperoxia (ANDO et al., 2002). Além disso, nos seres humanos, a vasodilatação induzida por citocinas pró-inflamatórias pode ser mediada pelo eNOS, embora não seja claro se é protetor ou prejudicial (BHAGAT et al., 1999).

Diante da ambiguidade dos efeitos do NO, o bloqueio de sua produção tem se tornado um potencial para alcançar benefícios terapêuticos. As dificuldades residem na obtenção da especificidade da isoforma, na segmentação de células ou tecidos específicos e na garantia de que o grau correto de inibição seja alcançado (KUBES, 2000)(Tabela 2). Como esperado, o maior interesse se concentrou em inibidores de iNOS, mas com interesse substancial também em inibidores de nNOS. Dentro do universo dos inibidores da NOS, podem ser citados os análogos da L-arginina, os inibidores da dimerização, inibidores dos cofatores e as isotioureias.

**Tabela 2. Potências relativas e seletividade de inibidores de NOS.**

| INIBIDOR | $IC_{50}$(μM) | | | Seletividade (vezes) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | iNOS | nNOS | eNOS | iNOS vs nNOS | iNOS vc eNOS | nNOS vs eNOS |
| **L-NNA** | 3.1 | 0.29 | 0.35 | 0.09 | 0.11 | 1.2 |
| **L-NMMA** | 6.6 | 4.9 | 3.6 | 0.7 | 0.5 | 0.7 |
| **7-NI** | 9.7 | 8.3 | 11.8 | 0.9 | 1.2 | 1.4 |
| **ARL 17477** | 0.33 | 0.07 | 1.6 | 0.2 | 5 | 23 |
| **Aminoguanidina** | 31 | 170 | 330 | 5.5 | 11 | 1.9 |
| **L-NIL** | 1.6 | 37 | 49 | 23 | 9 | 1.3 |
| **PBITU** | 0.047 | | 9 | | 190 | |
| **Vinil l-NIO** | 60 | 0.1 | 12 | 0.002 | 5 | 120 |

As potências absolutas podem não ser diretamente comparáveis devido às condições experimentais em que os estudos foram realizados. eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; IC50, concentração inibidora semi-máxima; iNOS, sintase de óxido nítrico inflamatório; 7-NI, 7-nitroindazole; L-NIL, N (6) -(1-iminoetil) lisina; L-NIO, N-iminoetil-L-ornitina; L-NMMA, NG-monometil-L-arginina; L-NNA, NG-nitro-L-arginina; nNOS, sintase de óxido nítrico neuronal; PBITU, S, S'-1,3-fenileno-bis (1,2-etanodiil) bis-isotioureia. Adaptado de Vallance e Leiper (2002).

Os primeiros inibidores descritos de NOS foram análogos da L-arginina (REES et al., 1990). Estes compostos competem com a L-arginina e se ligam no mesmo local de ligação à arginina. No entanto, alguns deles também são metabolizados por NOS, enzimas ativas e NADPH são necessárias para a inibição. Os primeiros inibidores iNOS altamente seletivos descritos foram as bis-isotioureas e outros análogos temos a Aminoguanidina e L-NMMA (N-metilarginina) (GARVEY et al. 1994).

Estudos de ligação levaram à sugestão de que um inibidor seletivo de isoforma teria três características. Primeiro, deve haver uma estrutura que forneça um grupo

guanidino, amidino ou ureído que doe ligações de hidrogênio ao resíduo de glutamato no local ativo da NOS. Deve também haver um pequeno grupo hidrofóbico, tal como um grupo alquilo ou tienilo, como parte da estrutura para proporcionar uma interação não polar mais próxima com a proteína oposta ao resíduo de glutamato (RAMAN et al., 2001).

Em segundo lugar, deve ter um grupo funcional conferindo a seletividade de isoforma com capacidade de ligação de hidrogênio que pode alcançar o canal de acesso ao substrato remoto do site ativo. Tal grupo poderia tirar proveito das diferenças de aminoácidos neste canal entre as isoformas. Em terceiro lugar, deve ter um link entre a estrutura e o grupo funcional de comprimento e flexibilidade apropriados para alcançar regiões específicas de isoformas. (RAMAN et al., 2001).

Uma abordagem alternativa é bloquear a dimerização da enzima. Os compostos à base de pirimidinaimidazole coordenam o heme no monómero de iNOS, perturbando uma das hélices e deslocando um resíduo crucial de ligação à arginina do local ativo (BLASKO et al., 2002). Essencialmente, o efeito é bloquear a formação de ambos os locais de ligação à arginina e à BH4 e produzir um complexo inibidor-monômero. Esses efeitos são semelhantes aos produzidos pelos imidazoles antifúngicos, o clotrimidazol e o miconazol, embora estes compostos também evitem a ligação da calmodulina à iNOS (WOLFF et al., 1993).

Os inibidores de dimerização mostram alguma afinidade específica para monómeros iNOS e nNOS e têm afinidade fraca para monómeros de eNOS, mas a base molecular para esse efeito não é clara. Esta classe de composto também é conhecida por inibir as enzimas do citocromo P450, o que poderia apresentar um problema em termos de efeitos indesejados. Os inibidores de dimerização demonstraram ter efeitos potencialmente benéficos em cenários usuais de formação de nitrato induzida por endotoxina e artrite adjuvante, e também na encefalomielite alérgica experimental como modelo de doença desmielinizante (BLASKO et al., 2002).

Os bloqueadores de cofatores são inibidores que afetam as flavoproteínas ou a ligação à calmodulina, mas parece improvável que esses compostos tenham a seletividade ou especificidade necessárias para serem úteis como abordagens para descoberta de drogas. Foi feita uma série de inibidores que visam o local de ligação de BH4. As diferenças no local de ligação a BH4 entre as isoformas de NOS foram

identificadas e os compostos de antipterina foram desenvolvidos que se mostram seletividade em dez vezes para nNOS sobre as outras duas isoformas (MATTER et al., 2002).

### 2.3.2 Aminoguanidina

Aminoguanidina foi inicialmente identificada como um inibidor da formação não enzimática de produtos finais de glicação avançada (AGE) (BROWNLEE et al., 1986). Esses produtos resultam da glicosilação de constituintes de proteínas extracelulares ou celulares e sua acumulação tem sido associada ao desenvolvimento de complicações diabéticas. Aminoguanidina impede a formação de produtos AGE e atenua o desenvolvimento de várias alterações vasculares, neuronais e colágenas induzidas pelo diabetes em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (BAYNES, 1990).

Aminoguanidina foi identificada em 1992 como um dos primeiros inibidores seletivos de iNOS (CORBETT et al., 1992). Semelhante à L-arginina, a aminoguanidina contém dois grupos quimicamente equivalentes de nitrogênio guanidino bem como uma fração hidrazina (Figura 7). É a química desta fração de hidrazina que se acredita conferir seletividade de aminoguanidina para iNOS.

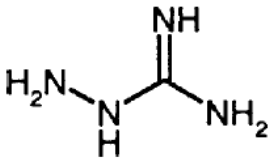



**Figura 7. Estrutura molecular da Aminoguanidina. Adaptado de Alderton, et al. (2001)**

Aminoguanidina melhora a capacidade de velocidade do nervo, aumenta o fluxo sanguíneo, inibe a formação de produtos finais de glicação avançada, atrasa o surgimento e o desenvolvimento da albuminúria (MASER; LENHARD, 2005). A análise de ensaios controlados confirmou alta eficiência de aminoguanidina em pacientes com neuropatia diabética, mas o desenvolvimento de uma série de efeitos colaterais encerrou sua aplicação (CALLAGHAN et al., 2012). O uso de derivados de aminoguanidina é acompanhado de eficácia clínica e falta de efeitos colaterais

adversos. Os resultados são promissores, mas precisam de mais estudos clínicos duplo-cegos e controlados por placebo (VINIK; ZIEGLER, 2007).

## 2.4 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich, um adenocarcinoma espontâneo mamário murino (EHRLICH, 1906). Este modelo tumoral tem sido amplamente caracterizado ao longo do tempo, demonstrando ser um modelo experimental com diversas vantagens no estudo da relação câncer-hospedeiro e no desenvolvimento de novas terapias anticâncer. Como principais características pode-se destacar o seu rápido desenvolvimento e alta agressividade, podendo apresentar duas formas de acordo com o local de inoculação (MAYER, 1966).

Quando inoculado em tecidos sólidos, se desenvolve na sua forma sólida, com formação de uma massa celular homogenia e delimitada. Por outro lado, quando inoculado no peritônio murino se desenvolve na sua forma ascítica, com o aumento progressivo de edema e do número celular, com a progressão do tumor, os animais desenvolvem uma anemia progressiva, hemodiluição e hipertrofia cardíaca levando a quadro de insuficiência cardíaca e morte (HARTVEIT, 1966).

A agressividade da forma ascítica do tumor de Ehrlich está diretamente relacionada com a espécie do camundongo e o número de células inoculadas. Após a inoculação das células tumorais, um intenso processo inflamatório se instala, promovendo um aumento da permeabilidade vascular e formação da ascite que irá dar o suporte necessário para o desenvolvimento tumoral (FECCHIO et al., 1990; DONENKO et al., 2013).

### 2.4.1 Macrófagos Associados ao Tumor de Ehrlich

No processo inflamatório do tumor ascítico de Ehrlich, foi constatando um rápido aumento do volume de ascite e concentração de proteína. Com a progressão tumoral, os leucócitos do sangue aumentaram os eritrócitos diminuíram. Em relação as células imunes na cavidade peritoneal, não foi observado a presença dos linfócitos

T $CD4^+$ e $CD8^+$, no entanto observou-se o aumento de células $F4/80^+/GR1^+$, chamadas de monócitos inflamatórios (FERNANDES et al., 2015).

Estes monócitos inflamatórios, podem estar relacionados com o aumento da expressão da iNOS e consequentemente da concentração de NO, bem como de citocinas pro-inflamatórias, como proteína quimitática de monócitos - 1 (MCP-1), interferon gama (IFN-γ) e interleucina 1 beta (IL-1β), entretanto também foi observado um aumento de citocinas antinflamatórias, como interleucina 10 (IL-10) (FERNANDES et al., 2015). Portanto, os TAMs são células chave no entendimento da relação inflamação e tumor, devido seu espectro de polarização (TAM)(MANTOVANI; ALLAVENA, 2015).

A plasticidade é uma característica marcante de células da linhagem monocítica e especificamente de TAM. A sua polarização é induzida, não com base na sua localização, mas pela combinação de sinais específicos de tecidos diversos e distintos encontrados no microambiente tumoral, desempenhando um papel importante nas diferentes fases do desenvolvimento tumoral, pela promoção da angiogênese, imunossupressão, metástase e quimioresistência (JINUSHI; KOMOHARA, 2015; JOSEPHS et al., 2015) (Figura 8).

De acordo com o estímulo recebido, os macrófagos podem ser polarizados para dois perfis distintos, macrófagos M1 e M2. Os macrófagos M1 são ativados pela via clássica que expressam mediadores pró-inflamatórios, incluindo o TNF-α, IL-1, IL-6, espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio com atividades microbicida e tumoricida (JINUSHI; KOMOHARA, 2015; JOSEPHS et al., 2015). Por outro lado, os macrófagos M2, ativados pela via alternativa, expressam Fizz1, Arginase1 (Arg1), Ym1, IL-10 e CD206 envolvidos na infestação parasitária e remodelação de tecidos, sendo o perfil mais encontrado no microambiente tumoral e associado à progressão do tumor (LIU et al., 2014).

Nesse panorama, os TAM tem sido alvo no desenvolvimento de estratégias para a terapia tumoral, nas quais se concentram na inibição do recrutamento dos macrófagos para o microambiente tumoral, diminuição do tempo de vida destas células, aumento do número de macrófagos M1 e de sua atividade tumoricida, e o bloqueio da polarização e da atividade de macrófagos M2, bem como na sua

repolarização para o perfil M1 (TANG et al., 2013; KONO et al., 2014; XING et al., 2015).

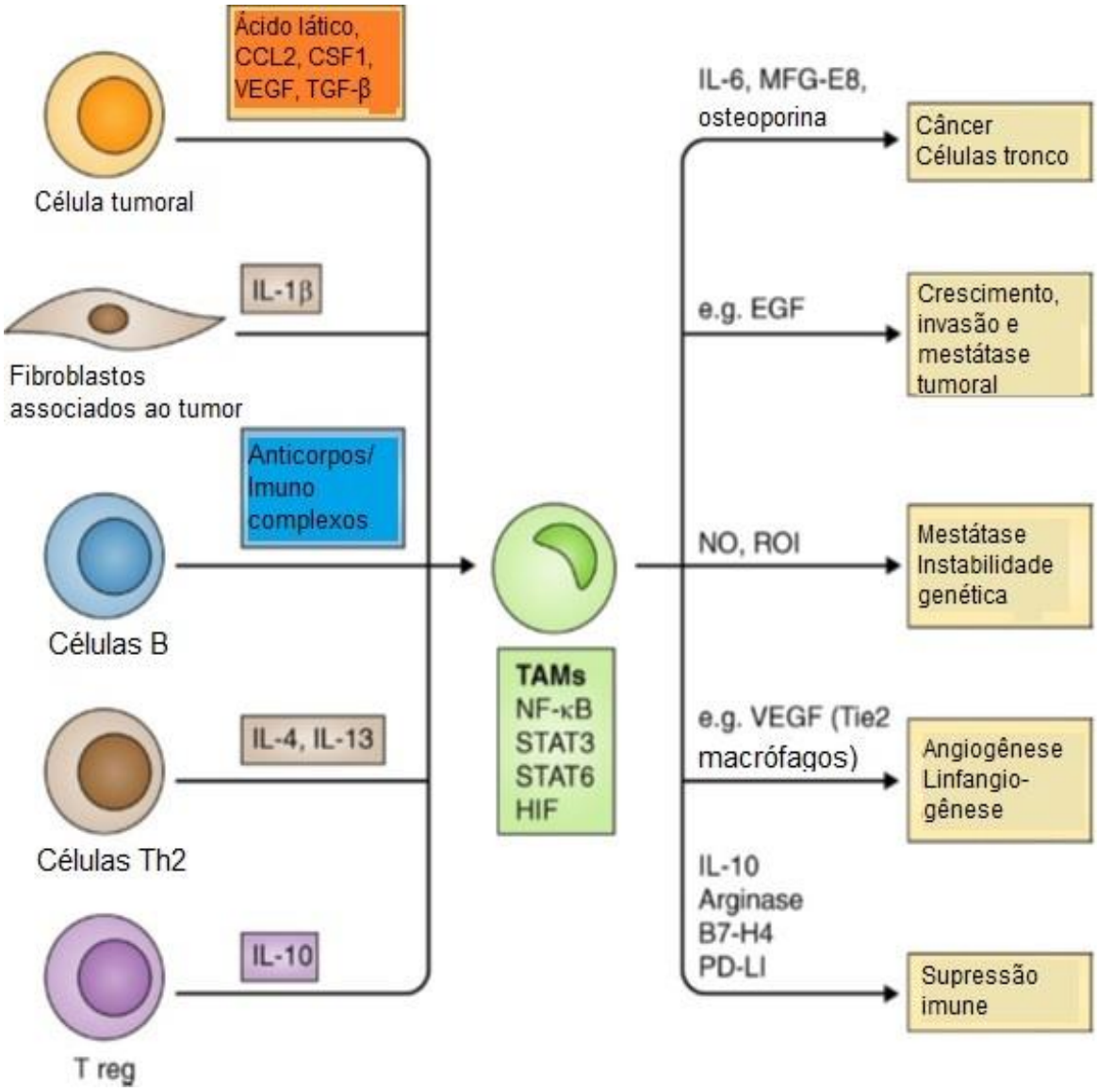



**Figura 8. Representação esquemática de células e mediadores que influenciam a função de TAM.** No lado esquerdo, as diferentes células, pertencentes à rede imunológica, bem como células de tumor e fibroblastos associados aos tumores, todos podem influenciar o condicionamento funcional de TAM através da produção de mediadores solúveis específicas tais citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Por exemplo, as citocinas Th2 (IL-4 / IL-13) e outras citocinas, tais como IL-10 e TGF-β, os produtos metabólicos resultantes de células tumorais (ácido láctico) e complexos imunes, conduzem os TAM a polarização em macrófagos promotores de tumor. No lado direito estão listadas as principais funções pro-tumor de TAM. Por exemplo, através da produção de fatores de sobrevivência (IL-6 e MFG-E8) e osteopontina, TAM protege CSCs do efeito tóxico da quimioterapia ou estimula diretamente a proliferação das células do tumor através do fator de crescimento epidérmico (EGF). A produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROI) pela TAM induz instabilidade genética. TAM ativa a neoangiogênese através da secreção de VEGF e suprimir respostas imunes porque expressam moléculas inibidoras (PD-L1 e B7-4) e produz citocinas imunossupressoras/mediadores (IL-10 e arginase). No retângulo, fatores de transcrição selecionados que orquestram função TAM são realçados (Adapatado de MANTOVANI; ALLAVENA, 2015).

Os estudos têm se intensificado para se compreender a relação dos macrófagos, seus produtos e seus efeitos no desenvolvimento tumoral. Sobre mais essa ótica, o óxido nítrico tem sido alvo dos pesquisadores para esclarecer o seu efeito no microambiente tumoral. Os macrófagos desempenham uma ação importante no controle das células tumorais, pela liberação de mediadores solúveis. Onde um dos responsáveis pela ação citostática e citolítica dos macrófagos frente aos tumores se dá pela liberação de óxido nítrico (CHATTOPADHYAY et al., 2002; CRUZ et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2010).

### 2.4.2 Óxido Nítrico e o Tumor de Ehrlich

Além do seu papel no processo inflamatório e na eliminação de patógenos, tem sido descrito o envolvimento do NO oriundo da iNOS no desenvolvimento do tumor de Ehrlich, onde a participação do NO, bem como da sua enzima produtora, a iNOS, nos dois modelos tumorais de Ehrlich, a forma ascítica e a forma sólida (NISHIKAWA et al.; 2004; DERYAGINA et al., 2015).

Animais deficientes de iNOS com a forma ascítica do tumor apresentaram maior sobrevida, porém um aumento constante no número de células tumorais, sem alteração na produção de NO no soro e no líquido ascítico. Em contrapartida nos animais que expressavam a iNOS, observou-se o aumento contínuo da produção de NO no soro e na ascite ao longo desenvolvimento tumoral, no entanto o crescimento no número de células tumorais foi interrompido em torno de uma semana e meia após o inóculo com a morte dos mesmos na segunda semana (NISHIKAWA et al., 2004).

Nishikawa et al. (2004), também demonstraram que o NO presente em um ambiente com baixa tensão de oxigênio, como a cavidade peritoneal, pode promover o processo de apoptose celular, pela inibição da transdução de energia na mitocôndria, prejudicando a produção de altas concentrações de ATP necessárias para a síntese de DNA requerida no processo de divisão celular pela célula tumoral, além da liberação do citocromo c, um dos gatilhos para o início do processo de apoptose.

Por outro lado, a presença da iNOS, consequentemente do NO, foi requerido no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich. O tumor sólido não foi capaz de se instalar e crescer nos animais deficientes de iNOS, diferente dos animais que expressavam iNOS, nos quais o tumor se desenvolveu acompanhado pelo aumento da concentração de NO. Apesar de sua atividade citotóxica frente as células tumorais, nas formas sólidas, o NO oriundo de macrófagos associados ao tumor também estimulam o aumento do fluxo sanguíneo e a formação de novos vasos. A angiogênese e o aumento da permeabilidade vascular, necessários para o desenvolvimento de tumores sólidos, se deve a produção do VEGF promovido pelo NO. As concentrações de VEGF estavam menores nos animais deficientes de iNOS em relação aos animais selvagens, demonstrando que a expressão comprometida do VEFG ao redor tumor inibe o desenvolvimento tumoral pela não formação de novos vasos na periferia e dentro do tumor e não fornecimento nutricional e de oxigênio (NISHIKAWA et al.; 2004).

O aumento crescente na produção de NO durante a progressão do tumor de Ehrlich foi demonstrado por Ziche et al. (1997), corroborando a necessidade da instalação de um processo inflamatório no microambiente tumoral. Evidenciando o efeito paradoxal do NO, uma vez que seu efeito antitumoral, ele também é necessário para o desenvolvimento do tumor.

Kalish et al. (2015) demonstraram que diferentes concentrações de NO entre linhagens de camundongos podem determinar a susceptibilidade ao tumor. A linhagem C57BL/6N, onde houve maior produção de óxido nítrico, apresentaram menor progressão tumoral e maior sobrevida. Em contraste, a linhagem C57BL/6J apresentou menor sobrevida e maior progressão tumoral com níveis inferiores de produção de NO.

Antígenos não próprios, substâncias endógenas, fármacos destinados a terapia de outras patologias e produtos naturais tem sido avaliado na ativação de macrófagos e na mediação da produção de mediadores inflamatórios no combate ao tumor. Como um exemplo de substância endógena temos a prolactina, uma proteína de secreção pituitária que possui a capacidade de aumentar a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, bem como a produção de interleucina 12 (IL-12) em TAM (MAJUMDER et al. 2002).

Além da via clássica de ativação por LPS para o perfil M1, tem se descrito na literatura que outros antígenos bacterianos como a Proteina A de *Staphylococcus aureus*, DNA e oligonucleotídeos sintéticos com CpG não metilados são capazes de aumentar a produção de NO tanto em macrófagos peritoneais de animais sem tumor quanto nos portadores do tumor de Ehrlich (CHATTOPADHYAY et al., 2002, OLISHEVSKY et al., 2006).

Em relação aos medicamentos utilizados no tratamento de outras doenças, como o diazepam, foi observada uma diminuição no recrutamento e na atividade dos macrófagos com menor produção de NO levando ao aumento da progressão do tumor (SAKAI et al., 2006). Por outro lado, o haloperidol e o diocloroacetato, foram capazes de aumentar a ativação e a produção de NO em TAM de animais com tumor ascítico de Ehrlich (KLEEB et al., 1999; PYASKOVSKAYA et al., 2015).

Estudos realizados com o extrato bruto das folhas de *Attalea speciosa*, mostrou que o extrato foi capaz de aumentar o recrutamento de macrófagos para a cavidade peritoneal e aumentar a produção de NO em animais sadios, elucidando um possível mecanismo de eliminação do tumor ascítico de Ehrlich em animais tratados com o extrato (CRUZ et al., 2007). Por outro lado, outros autores relatam o controle do desenvolvimento tumoral através do efeito antinflamatório e antioxidante de extratos de *Ichnocarpus frutescens, Ipomoea obscura* (L) *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana câmara* Linn (KUMARAPPAN et al., 2007; GOSH et al., 2010; HAMSA; KUTTAN, 2011).

Nosso grupo de pesquisa tem avaliado o modelo tumoral de Ehrlich, nas suas duas formas, sólida e ascítica, na tentativa de elucidar os efeitos que NO possui no processo de desenvolvimento e no controle tumoral em suas diferentes formas. Assunção et al. (2011) e Fortes et al. (2011) demonstraram que animais tratados com extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHGP) e com o extrato aquoso de mesocarpo de babaçu (EAB) inibiu significativamente o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich, conferindo o efeito tumoricida dos extratos ao aumento no número de células do peritônio e na produção de NO e $H_2O_2$. Em contrapartida, o efeito antitumoral do EHGP na forma sólida do tumor de Ehrlich, foi conferida pela inibição da produção destas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, enquanto que o EAB induziu a

expressão de iNOS e consequentemente de NO, promovendo apoptose das células tumorais via caspase-3.

Serra et al. (2016) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *Croton triqueter* Lam.(EEJ) também foi capaz de diminuir o número total de células tumorais e aumentar a sobrevida de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich, atribuindo este efeito tumoral ao aumento da expressão dos marcadores CD14, IA-IE e CD86 em macrófagos Raw 264.7 estimulados ou não com LPS, indicando que o EEJ apresenta a capacidade de polarizar macrófagos para o perfil M1, produtor de NO.

O NO desempenha um papel importante no desenvolvimento tumoral, desde a eliminação de tumores, bem como favorecendo na sua instalação e a progressão. Demonstrando que de acordo com o microambiente inserido desempenha funções distintas, assim como as células que expressam sua enzima produtora, os macrófagos, podem apresentar perfis funcionais distintos de acordo com os estímulos fornecidos. Estando intimamente relacionados com a fisiopatologia tumoral, se tornam alvos de diversos estudos para o tratamento desta doença.

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da inibição iNOS sobre a polarização de macrófagos e sobre o desenvolvimento tumoral.

## 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da inibição da iNOS sobre a polarização de macrófagos *in vitro*.
- Acompanhar o desenvolvimento tumoral de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich e tratados com o inibidor da iNOS.
- Investigar os possíveis efeitos imunológicos afetados pela inibição da iNOS em camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida.
- Avaliar a sobrevida e o desenvolvimento tumoral de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com o inibidor da iNOS.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Avaliação do efeito da inibição da iNOS sobre a polarização *in vitro* de macrófagos

### 4.1.1 Cultura da linhagem Raw 264.7

As células da linhagem de macrófago murino Raw 264.7 foram cedidas gentilmente pelo Professor Dr. Wanderson Pereira. Para a manutenção das células Raw 264.7, estas foram expandidas em frascos de cultura de 25 $cm^2$ (Thermo Fisher Scientific) em meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 2 mM de L-glutamina (SIGMA), 23 mM de L-asparagina (SIGMA), 0,1 mM de ácido pirúvico (SIGMA), 1 mM de ácido fólico (SIGMA), 1% de estreptomicina (100 µg/mL, Merck), penicilina G (100 U/mL, SIGMA) e 10% de soro fetal bovino (SFB)(SIGMA), a 37°C em estufa contendo 5% de $CO^2$. Após as mesmas atingirem confluência, o meio RPMI das garrafas foi descartado, sendo os frascos lavados duas vezes com 10 mL de PBS estéril, a fim de evitar que células mortas fossem plaqueadas. Em seguida, foram adicionados 2 mL de meio RPMI completo e as células que permaneceram aderidas no frasco foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico (Cell Scraper, Corning Glass Workers, New York, USA). O meio contendo as células foi transferido para um tubo de 15 mL contendo previamente 1 mL de meio RPMI completo. Este foi centrifugado em 290 G a 4°C, 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e 5 mL de meio RPMI completo foram adicionados ao tubo Falcon.

A contagem global de células foi efetuada na câmara de Neubauer em solução de azul de Trypan para avaliação da viabilidade celular. Em todos os protocolos foram empregadas somente as suspensões que apresentaram viabilidade superior a 95%.

### 4.1.2 Preparo da Solução de Aminoguanidina (AG)

Para os ensaios *in vitro*, foi preparada a solução mãe de AG (SIGMA, ALEMANHA) na concentração de 1M utilizou-se o sal hemissulfato de AG. Foram pesados 123mg, após diluição com 1mL de água de injeção a solução foi agitada e posteriormente filtrada na câmara de fluxo. Para obtenção das concentrações de interesse, foi realizada diluição com meio RPMI suplementado com 2% de SFB a partir

da solução mãe. Foram utilizadas as concentrações finais de 0,01mM; 0,1mM; 1mM e 10mM para os experimentos propostos.

Para a administração por via oral da dose de 100mg/kg de AG para os experimentos *in vivo*, foi preparada a solução de AG na concentração de 65mg/mL utilizando o sal hemissulfato de AG. Foram pesados 910mg, após reconstituição com 15mL de PBS, a solução foi agitada e armazenada protegida da luz e à 4° C. O volume a ser administrado de acordo com a dose de 100mg/kg foi calculado através da formula abaixo.

$$V\ (\mu L) = \frac{\text{Peso (g) x 0,1 x 1000}}{65}$$

4.1.3 Ensaio de citotoxicidade da AG

Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* da AG nas concentrações de 0,01mM; 0,1mM, 1mM e 10mM sobre as células Raw 264.7 e nas células do tumor de Ehrlich na concentração de $1x10^6$ células/mL em 48 horas, pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) brometo de 2,5-difeniltetrazólio) (SIGMA-ALDRICH, EUA) (MOSMANN, 1983). Após 48h, foi adicionado 10 uL de MTT (5mg/mL). Após incubação durante 3 horas a 37°C, os cristais de formazan incorporados em células viáveis foram solubilizados com 100uL de SDS/HCL (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ, BR) e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 12h. A absorbância a 540 nm foi determinada com um leitor de microplacas (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384). A citotoxicidade foi calculada subtraindo-se a partir do quociente entre o valor médio de absorbância para as células tratadas com AG em relação ao valor médio de absorbância para as células não tratadas, seguindo a fórmula abaixo:

$$\%\ \text{Viabilidade} = \frac{\text{Absorbância do Tratamento}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

4.1.4 Determinação da concentração final de AG para os experimentos *in vitro*

Macrófagos Raw 264.7 foram transferidos para placas de 96 poços com fundo chato na concentração de $1x10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 2% de SFB(SIGMA), em triplicata e incubadas 1 hora a 37°C e 5%

de $CO_2$. Após esse período inicial de incubação, as células aderentes foram estimuladas ou não para o perfil M1, tratadas ou não com as concentrações não tóxicas de AG obtidas nos ensaios de Citotoxicidade e incubadas 37°C e 5% de $CO_2$ por 24 horas. A concentração final de AG foi determinada a partir da medida da concentração de nitritos no sobrenadante, descrita no item 4.3.1, sendo escolhida a que inibiu por completo a produção de óxido nítrico.

### 4.1.5 Polarização de macrófagos

Nos experimentos *in vitro*, foram utilizados macrófagos Raw 264.7 polarizados ou não para os perfis M1 e M2. Para a indução para o perfil M1, os macrófagos foram estimulados com 10ng/mL de IFN-γ (PEPROTECH, Catalogo 315-05) e 200ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, 0111:B4, SIGMA). Para o perfil M2 foram estimulados com 40ng/mL de IL-4 (PEPROTECH, Catalogo 214-14) e 20ng/mL de IL-13 (PEPROTECH, Catalogo 213-10). Como controle negativo, macrófagos M0, os macrófagos Raw 264.7 foram mantidos apenas em meio RPMI suplementado com 2% de SFB.

### 4.1.6 Protocolos *in vitro* para avaliação do efeito da AG sobre a polarização de macrófagos

Após a determinação da concentração final efetora de AG, foram realizados dois protocolos para avaliação do efeito da AG sobre a polarização de macrófagos. Inicialmente os macrófagos Raw 264.7 foram transferidos para placas de 96 poços com fundo chato na concentração de $1x10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 2% de SFB (SIGMA), em triplicata e incubadas por 1 hora a 37°C e 5% de $CO_2$.

Após esse período inicial, no primeiro protocolo, os macrófagos foram polarizados para os perfis M1 e M2, tratados concomitantemente 1mM de AG e incubados à 37°C e 5% de $CO_2$ por 24 e 48 horas. Macrófagos M0 também foram tratados com 1mM de AG e mantidos em cultura pelo mesmo período. Após 24 e 48 horas os sobrenadantes foram retirados para a dosagem de NO e citocinas e realizada a imunofenotipagem com os macrófagos. (Figura 9).

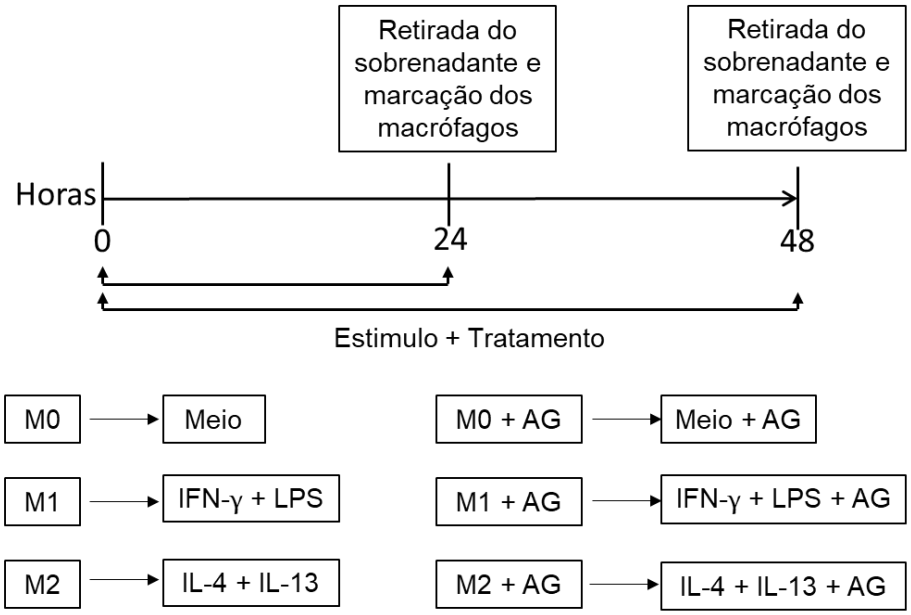



**Figura 9. Protocolo 1 de polarização dos macrófagos Raw264.7 e tratamento com AG.**

No segundo protocolo, os macrófagos foram polarizados e tratados concomitantemente 1mM de AG e incubados à 37°C e 5% de $CO_2$ por 24 horas, seguindo da retirada dos estímulos e tratamento pela da troca do sobrenadante por meio RPMI 1640 sem estímulo e tratamento e incubados por mais 24 e 48 horas (Figura 10). Após esses tempos de incubação, os sobrenadantes foram retirados para a dosagem de NO e citocinas e realizada a imunofenotipagem com os macrófagos.

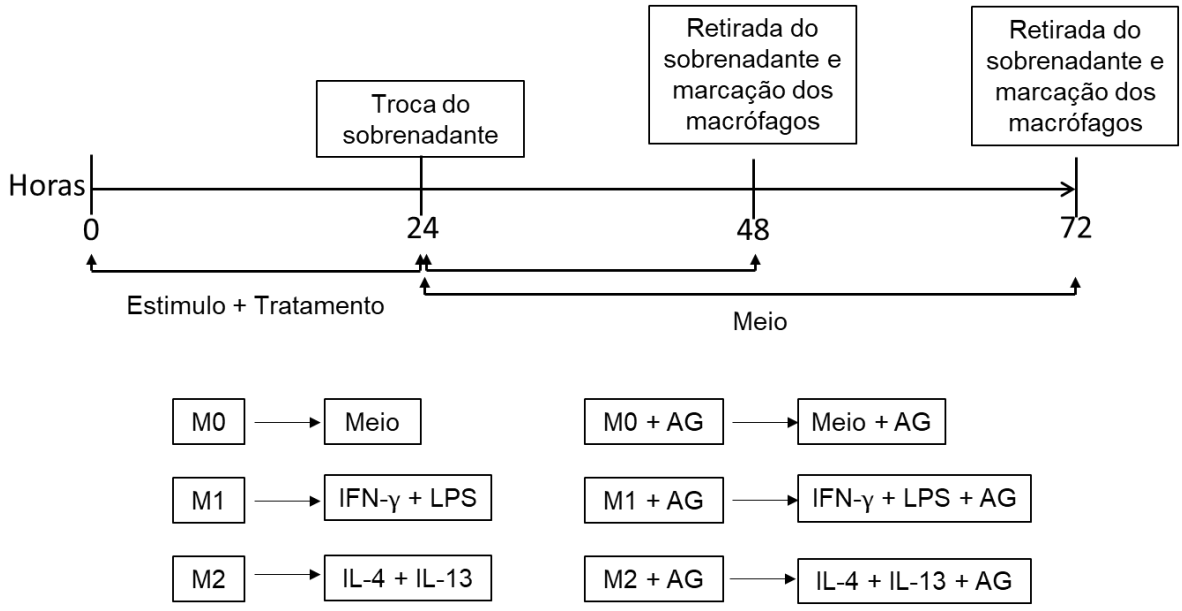



**Figura 10. Protocolo 2 de polarização dos macrófagos Raw264.7 e tratamento com AG.**

### 4.1.7 Imunofenotipagem de macrófagos

Para caracterização fenotípica dos perfis de macrófagos foram utilizados os anticorpos para os marcadores de superfície CD80 e CD86 (moléculas co-estimuladoras) conjugado com PE (BD Pharmingen) e o marcador intracelular iNOS conjugado ao PE-Cy7 (BD Pharmingen), conforme a distribuição em painéis no Quadro 1.

**Quadro 1. Painéis utilizados no ensaio de imunofenotipagem**

| Fluorocromo | Painel 1 | Painel 2 |
|---|---|---|
| **PE** | CD80 | Cd86 |
| **PE-Cy 7** | iNOS | iNOS |

Seguido as culturas e retirada dos sobrenadantes, os macrófagos foram desprendidos do fundo da placa com adição de 200µL de PBS (Solução Tamponada com Fosfato – pH 7,4) gelado com 10mM EDTA (do inglês e*thylenediamine tetraacetic acid*) e incubados por 10 minutos à 4°C. Em seguida as células foram transferidas para placa de 96 poços de fundo U redondo e centrifugadas a 340 G; 4ºC durante 3 minutos.

Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200µL de PBSA 1% (PBS mais BSA 1%) ao *pellet* formado para ser lavado por duas vezes. Após a lavagem foram adicionados aos poços 50µL anticorpo Fc Block (BD Pharmingen) na proporção de 1µL do Anticorpo:100µL de PBSA 1% em todos os poços para incubar por 15 min a 4°C. Adicionou-se 150µL de PBSA 1% e foi feita centrifugação das células a 340 G; 4ºC durante 3 min. O sobrenadante foi descartado novamente e o *pellet* desprendido para ser incubado com 100µL do mix de anticorpos de superfície, anti-CD86 e anti-CD80 (BD Pharmingen) e incubados durante 20 min ao abrigo da luz a 4ºC.

Passado o período de incubação foi adicionado mais 200µL de PBSA 1% para o pellet ser centrifugado por mais duas vezes (340 G / 4ºC / 3 min). Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeido à 4% e incubadas por 15min à 4ºC ao abrigo da luz para em seguida serem novamente lavadas por mais duas vezes com PBSA 1%.

Para permeabilização dos macrófagos, estes foram lavados duas vezes com PERM/WASH 1x (BD Pharmingen) e incubados com 50µL desta solução por 20min a

4ºC no escuro. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células incubadas com 100µL de anti-iNOS por 20min a 4ºC ao abrigo da luz. Após essa etapa foi realizada mais duas lavagens com PERM/WASH 1x (340 G / 4ºC / 3 min) e o *pellet* ressuspenso em 150µL de PBSA 1%. As suspensões de macrófagos foram transferidas para microtubos de leitura para aquisição no de citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Os dados foram analisados no programa Flow Jow®(TreeStar), com a seguinte estratégia de análise. Foram adquiridos 10000 eventos levando-se em consideração os parâmetros de tamanho (*Forward Scatter*, FSC) e complexidade celular (*Side Scatter*, SSC) para estabelecimento do *gate* de aquisição da população de macrófagos (FIGURA 11A). Após a determinação do *gate* principal, as células foram avaliadas segundo os canais de fluorescência utilizados com o auxílio dos respectivos isotipos, sendo determinado inicialmente o *gate* para os macrófagos positivos para os marcadores de superfície CD80 ou CD86 no parâmetros SSC *versus* FL2-H (FIGURA 11B), partindo-se então para os macrófagos positivos para o marcador intracelular iNOS nos parâmetros SSC *versus* FL3-H (FIGURA 11C), para determinação e análise do número absoluto das células expressando os marcadores e média da intensidade de fluorescência (MFI).

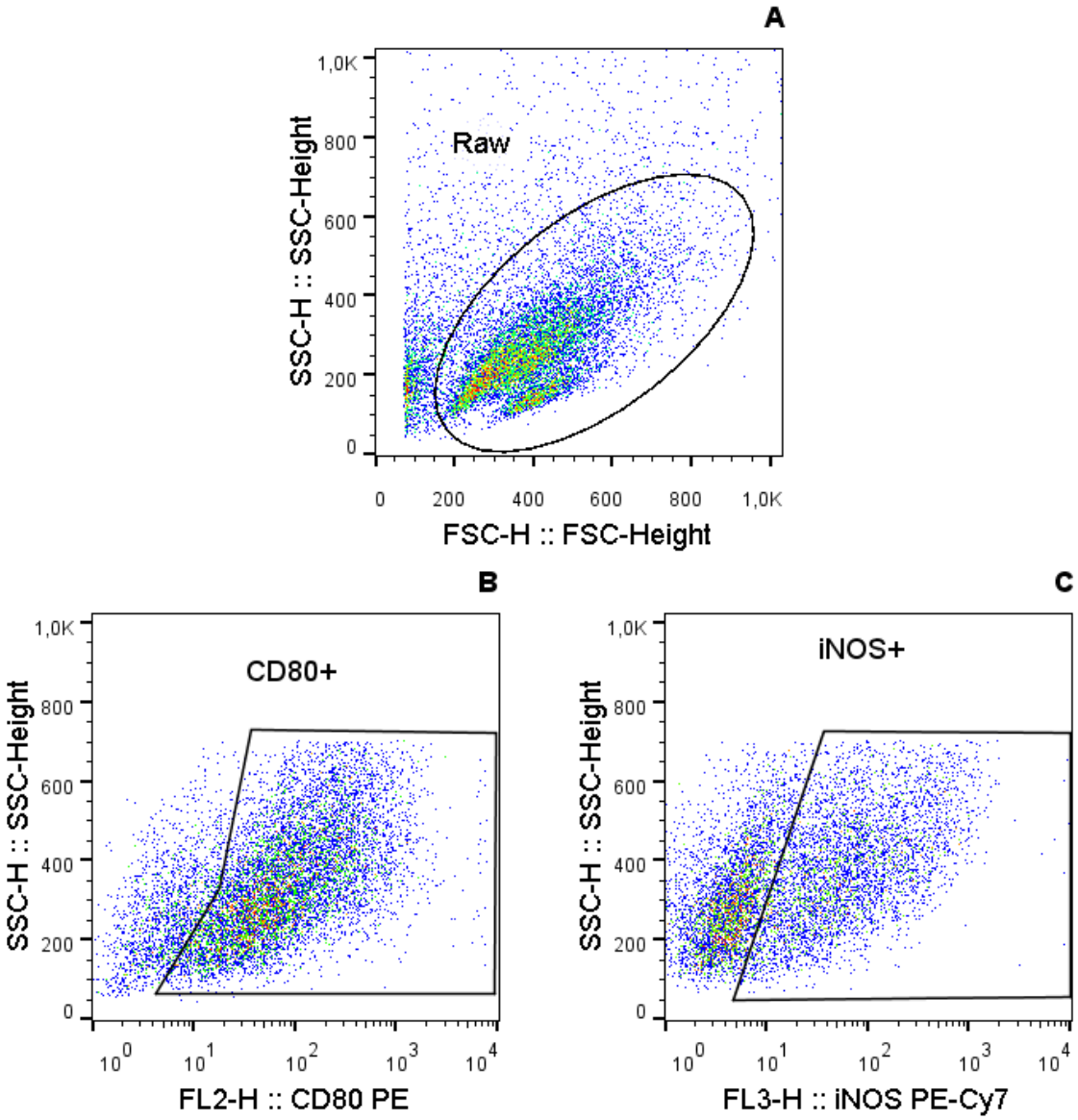



**Figura 11. Estratégia de análise da imunofenotipagem.** Macrófagos Raw 264.7 foram induzidos ou não para os perfis M1 (10ng/mL de IFN-γ e 200ng/mL de LPS) e M2 (40ng/mL de IL-4 e 20ng/mL de IL-13), tratados ou não com AG e realizada a marcação de superfície anti-CD80 e anti-CD86 (PE), seguindo da marcação intracelular anti-iNOS (PE-Cy7). Foram adquiridos 10000 eventos levando-se em consideração os parâmetros de tamanho (*Forward Scatter*, FSC) e complexidade celular (*Side Scatter*, SSC) para estabelecimento do *gate* de aquisição da população de macrófagos (A). Após a determinação do *gate* principal, as células foram avaliadas segundo os canais de fluorescência utilizados, sendo determinado inicialmente o gate para os macrófagos positivos para os marcadores de superfície CD80 ou CD86 no parâmetros SSC *versus* FL2-H (B), partindo-se então para os macrófagos positivos para o marcador intracelular iNOS nos parâmetros SSC *versus* FL3- (C), para determinação e análise do número absoluto das células expressando os marcadores e média da intensidade de fluorescência (MFI).

## 4.2 Avaliação da inibição da iNOS na forma ascítica e sólida do tumor de Ehrlich *in vivo*

### 4.2.1 Animais

Foram utilizados 65 camundongos machos da linhagem Swiss, com peso em torno de 25-30g 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*. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão (CEUA/UFMA nº 23115.003822/2016-26).

### 4.2.2 Manutenção do tumor de Ehrlich

A manutenção do tumor de Ehrlich é realizada no Laboratório de Imunofisiologia da UFMA, por meio de transplantes intraperitoneais (ip.) semanais das células neoplásicas em camundongos sadios (BALA et al., 2010). Para obtenção das células neoplásicas, camundongos com aproximadamente sete dias de evolução do tumor ascítico de Ehrlich foram eutanasiados com uma sobredose da solução anestésica (solução 2:1:1, Ketamina 100mg/mL, Cloridrato de Xilasina 20mg/mL, PSB, via im). Após a assepsia com álcool 70% e excisão da parede abdominal, o fluido ascítico foi puncionado da cavidade peritoneal e ressuspendido em PBS, pH 7,2. Em seguida, a suspensão celular obtida foi centrifugada (290 G a 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 suspenção uma alíquota foi diluída, sendo realizada a contagem de células na câmara de Neubauer, e a viabilidade celular determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Trypan. A concentração da suspensão celular ajustada para $10^7$ células tumorais/mL e inoculado 200 µL contendo $2x10^6$ células tumorais por via intraperitoneal em um animal sadio e acompanhado por 7 dias. Em todos os protocolos foram empregadas somente as suspensões que apresentaram viabilidade superior a 95%.

### 4.2.3 Procedimento experimental com o tumor sólido de Ehrlich

Para avaliação do desenvolvimento do Tumor de Ehrlich na forma sólida, foi realizado o protocolo de indução do tumor tanto no coxim plantar como na orelha direita de camundongos Swiss. Inicialmente, foi inoculado 50µL de uma suspensão celular contendo $10^7$ células tumorais/mL no coxin plantar de dezoito (18) camundongos. O grupo Limpo recebeu 50µL de uma solução de PBS (NASCIMENTO et al., 2006).

Após a inoculação ou não da suspensão celular os animais foram subdivididos em quatro grupos (n=6/grupo). Um grupo Limpo, sem tumor e sem tratamento; e três grupos que receberam as células tumorais, os quais não foram tratados (Controle), ou foram tratados, oralmente, com uma solução aquosa de AG na dose 100mg/Kg durante cinco primeiros dias a partir do primeiro dia do inoculo (AG Inicial) ou por cinco dias a partir do 10º dia após o inoculo (AG Final).

A cada dois dias foi mensurada a espessura da pata dos animais com o tumor, com auxílio de um paquímetro, e vinte dias após o inóculo do tumor os animais foram eutanasiados e feita coleta do soro para as análises bioquímicas; amputação das patas para análise histopatológica e retirada dos órgãos linfóides (baço, linfonodo drenante e medula) para verificar a celularidade.

Para o protocolo de indução do tumor na orelha, foram inoculados 20µL de uma suspensão celular contendo $2{,}5x10^7$ células/mL na orelha direita de 30 camundongos. O restante dos animais (n=5) recebeu 20µL de uma solução de PBS (NASCIMENTO et al., 2006).

Após a inoculação ou não da suspensão celular os animais foram subdivididos em seis grupos (n=5/grupo), conforme Tabela 3.

**Tabela 3. Divisão dos grupos experimentais para os animais portadores da forma sólida do turmor de Ehlich.**

| **GRUPOS** | | |
|---|---|---|
| **CONTROLE** | SEM TUMOR | LIMPO |
| | COM TUMOR | CONTROLE |
| | | CICLO |
| **AMINOGUANIDINA** | COM TUMOR | AG INICIAL |
| | | AG FINAL |
| | | AG CONTÍNUO |

O grupo Limpo, sem tumor, e o grupo Controle, com tumor, não receberam tratamento. O tratamento dos demais grupos iniciaram no segundo dia após o inóculo. No primero dia após o inóculo, o grupo Ciclo foi tratado com ciclofosfamida monoidratada (Genuxal – Baxter Oncology) na dose de 25mg/kg, ip., por dez dias após 48 horas do inóculo. Os Grupos AG foram tratados com uma solução aquosa de hemissulfado de AG na dose de 100mg/kg, por via oral (v.o.) durante cinco dias a partir do segundo dia após o inoculo (AGI), por cinco dias a partir do 7º dia após o inoculo (AGT) ou por dez dias após segundo dia após o inóculo (AGC), conforme Figura 12.

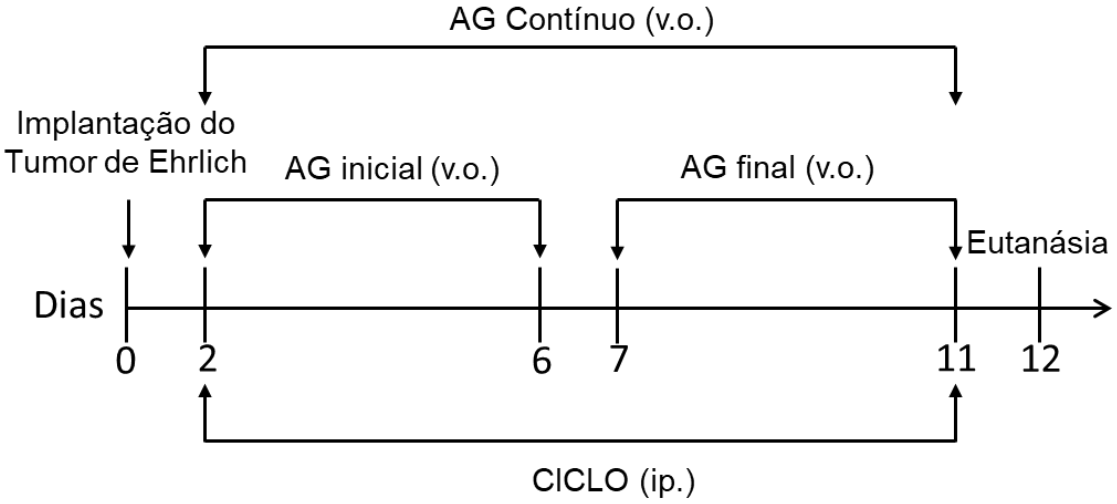



**Figura 12. Protocolo de tratamento no modelo sólido do Tumor de Ehrlich.**

No dia zero (D0) e a cada dois dias, o peso dos animais e o consumo de ração foram verificados em balança analítica. A cada 4 dias (D4, D8 e 12) as orelhas com tumor foram fotografadas para cálculo da área do tumor e da orelha através do programa ImageJ (versão 1.52A, Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, USA) e expressa em $mm^2$.

No décimo segundo dia após o inóculo do tumor os animais foram eutanasiados com uma sobredose da solução anestésica e foram coletados: o sangue (para obtenção de citocinas, esfregaço sanguíneo e contagem global de leucócitos), a orelha direita (para análise macroscópica); os órgãos linfóides – baço (pesagem, contagem, cultura, citocinas, NO e imunofenotipagem), linfonodo drenante (contagem) e medula (contagem) e o lavado peritoneal (contagem, cultura, produção de $H_2O_2$ e NO).

4.2.3.1 Obtenção do sangue

Após a anestesia, com 50µL da solução anestésica dos animais o sangue foi obtido a partir do plexo orbital e coletado em tubo cônico de 2mL. Foi realizado o esfregaço sanguíneo imediatamente com 10µL de sangue e 20µL foram 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. Após cinco minutos de descanso a temperatura ambiente, o tubo com o sangue foi acondicionado em caixa com gelo, até a formação do coágulo. Após centrifugação (290 G, 4°C, 10 minutos), o soro foi coletado, uma parte foi utilizada para fazer dosagem de nitritos e a outra foi armazenada em -20º C para dosagem de citocinas.

4.2.3.2 Análise leucométrica

A contagem global de leucócitos foi feita nos quatro quadrados grandes laterais (L1, L2, L3, L4) da câmara Neubauer, com auxílio de microscópio óptico comum (Olympus CX40), sob aumento de 40X. Ao total de células contadas (N), foi aplicada a fórmula: Leucócitos/$mm^3$ = N x 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), com auxílio de microscópio óptico comum, sob aumento de 100X. Estabeleceu-se a quantidade de cada tipo de célula, encontrada ao final da contagem de 100 leucócitos.

4.2.3.3 Avaliação histopatológica da orelha

Após a eutanásia, as orelhas dos animais foram coletadas, 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 (DE ASSIS et al., 2007). O sistema de escore utilizado para caracterizar os parâmetros analisados foi determinado da seguinte forma: (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso (CHARRET et al., 2013). Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

4.2.3.4 Obtenção e contagem das células dos linfonodos, do baço e da medula óssea

Os linfonodos foram retirados e triturado s em 1 mL de PBS, sendo as suspensões celulares diluídas 10x em PBS para a realização das contagens. Os baços foram retirados, pesados e triturados em 3 mL de PBS e as suspensões celulares foram mantidas em banho de gelo e diluídas 50x em PBS para contagem. Para obtenção das células da medula óssea, o fêmur esquerdo 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 (0,05%) dissolvido em ácido acético 30%. As contagens celulares foram realizadas em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio ótico de luz comum (CRUZ et al., 2007).

4.2.3.5 Culturas do baço e peritônio

As células do baço e peritônio foram cultivadas em placas de 96 poços a uma concentração de $2x10^6$ células/ mL ($2x10^5$ por poço) em meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 2 mM de L-glutamina (SIGMA), 23 mM de L asparagina (SIGMA), 0,1 mM de ácido pirúvico (SIGMA), 1 mM de ácido fólico (SIGMA), 1% de estreptomicina (100 µg/mL, Merck), penicilina G (100 U/mL, SIGMA) e 2% de SFB(SIGMA). O sobrenadante foi coletado e armazenado em -20° C, após incubação por 48 horas a 37°C e 5% de $CO_2$, para dosagem de nitrito e de citocinas.

4.2.3.6 Fenotipagem das células do baço

Para avaliação fenotípica, um número de $1x10^6$/mL das células do baço foram ressuspensas em 100 µL 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 200µL de PBSA 1% (PBS 1x mais BSA 1%) ao pellet formado para ser lavado por duas vezes. Após a lavagem foi adicionado aos poços 50µL anticorpo Fc Block (BD Pharmingen) na proporção de 1µL do Anticorpo:100µL de PBSA 1% em todos os poços para incubar por 15 min a 4°C. Adicionou-se 150µL de PBSA 1% e foi feita centrifugação das células a 340 G; 4ºC durante 3 min. O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet desprendido para ser incubado com o 100µL do mix de anticorpos e incubados durante 20 min ao abrigo da luz a 4ºC. Passado o período de incubação foi adicionado mais 200µL de PBSA 1% para o pellet ser centrifugado por mais duas vezes (340 G/ 4ºC / 3 min). Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeido à 4% e incubadas por 15min à 4ºC 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 150µL 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 Jow®(TreeStar).

Foram montados 4 painéis de marcação com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 e anti-IaIe 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 2). Para cada painel foi realização 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 2. Painéis para marcação das células do baço**

| FLUOROCROMO | FITC | PE | PerCP | PerCP-Cy5.5 |
|---|---|---|---|---|
| **PAINEL 1** | **CD3** | **CD28** | **CD4** | **-** |
| **PAINEL 2** | **CD3** | **CD69** | **CD8** | **-** |
| **PAINEL 3** | **CD3** | **CD49b** | **-** | **NK1.1** |
| **PAINEL 4** | **Iale** | **CD19** | **-** | **F4/80** |

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 13A). Em seguida, 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 13B) e CD3 (canal 1) versus CD8 (canal 3) para linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) (Figura 13C). 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 13D 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.

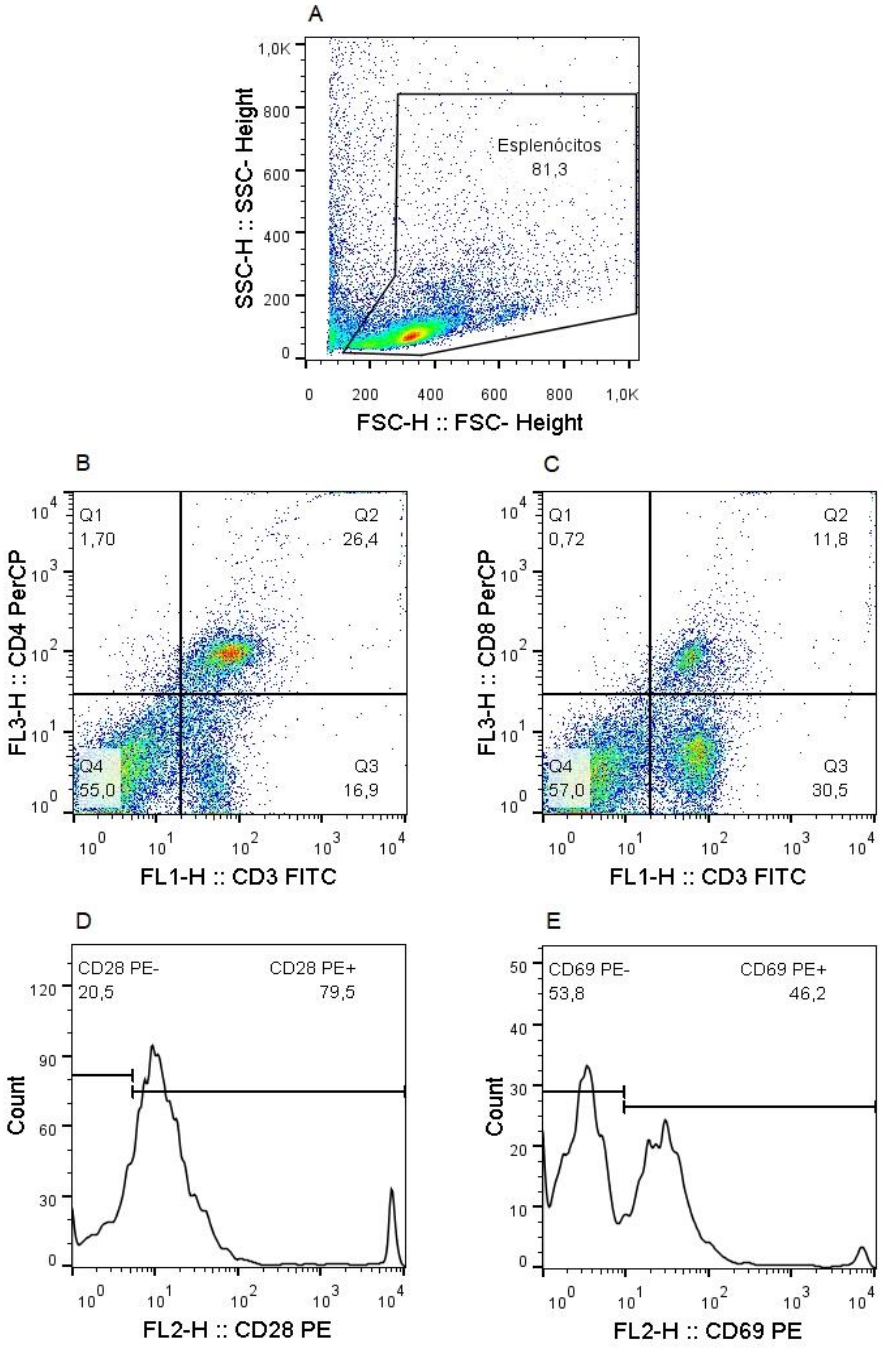



**Figura 13. Estratégia de análise para identificação de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos do baço dos animais.** As células do baço foram obtidas dos animais inoculados (ou não) com tumor de Ehrlich e tratados (ou não) com AG ou ciclofosfamida. Para análise das células inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos esplenócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) (8A). 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 8B) e CD3 (canal 1) versus CD8 (canal 3) para linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) (Figura 8C). 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 8D 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 14A). Em seguida foi feita a seleção da região negativa e positiva para CD3+, respectivamente no histograma baseado em CD3 (canal 1) (Figura 14B). Seguindo a análise para as células duplo positivas para CD49b e NK1.1(Figuras 14C). Onde NK são CD3-CD49b+NK1.1+ e as células NKT são CD3+CD49b+NK1.1+. Nas populações de células 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.

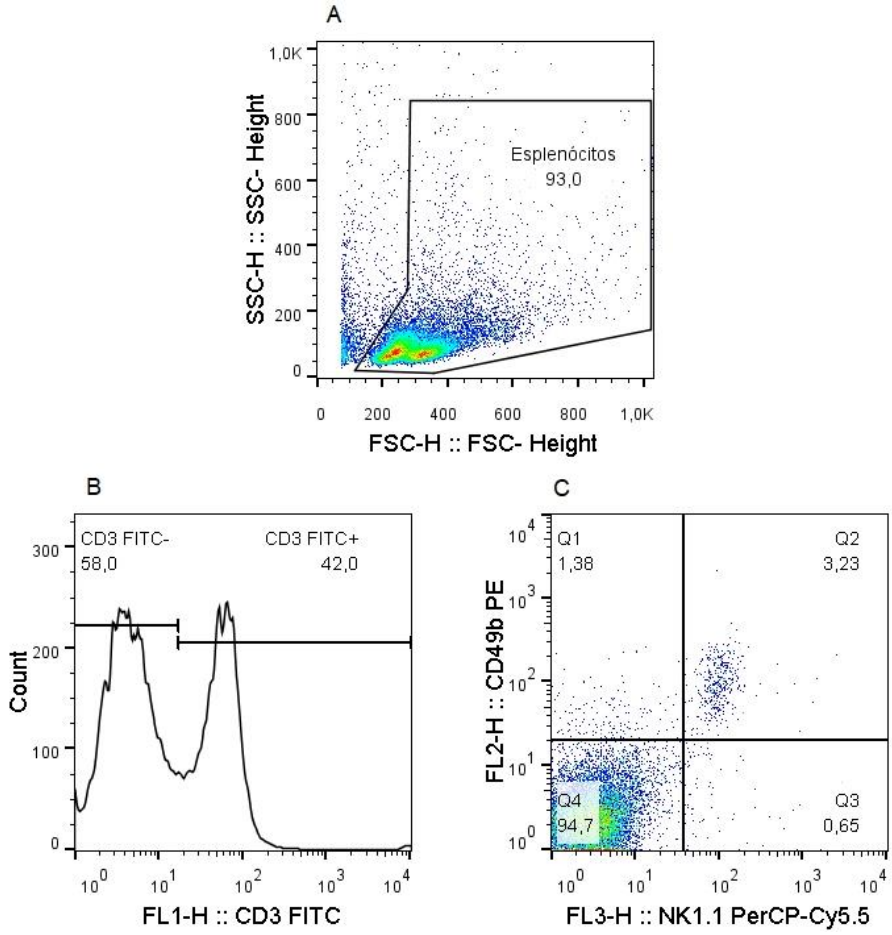



**Figura 14. Estratégia de análise para identificação de células NK e NKT do baço dos animais**. As células do baço foram obtidas dos animais inoculados (ou não) com tumor de Ehrlich e tratados (ou não) com AG ou ciclofosfamida. As células foram marcadas com anticorpos específicos para células NK. Para 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) (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 células NK e NKT 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 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 15A). Para análise dos linfócitos B foi feita a seleção da região positiva para CD19+ no histograma baseado em CD19 (canal 2) (Figura 15B). Em seguida foi avaliada a expressão do IaIe na região positiva para IaIe+ no histograma baseado em IaIe (canal 1) (Figura 15C). Para análise dos macrófagos foi feita a seleção da região positiva para F4/80+ no histograma baseado em F4/80 (canal 3) (Figura 15D). Em seguida foi avaliada a expressão do IaIe na região positiva para IaIe+ no histograma baseado em IaIe (canal 1) (Figura 15E). 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.

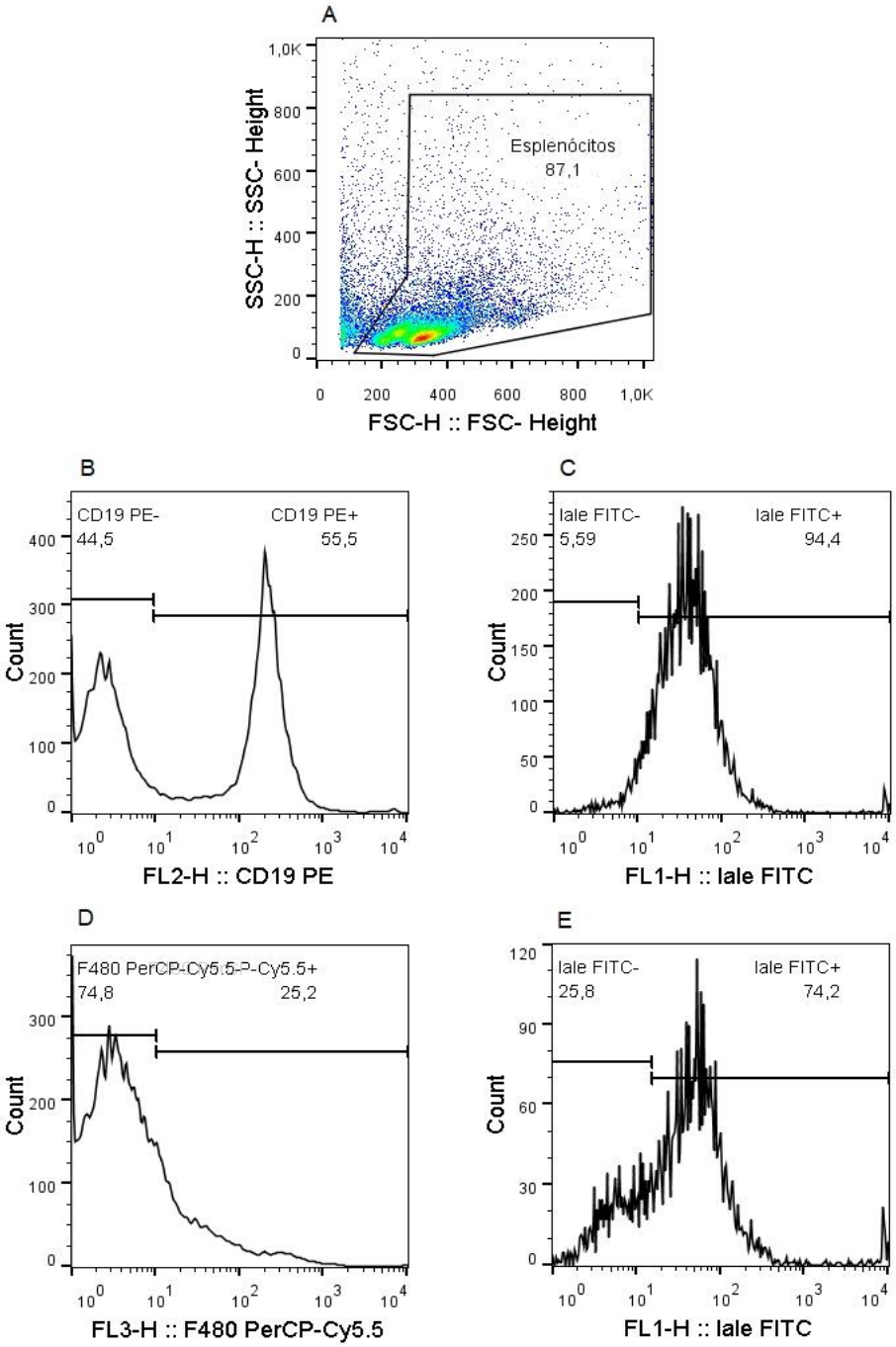



**Figura 15. Estratégia de análise para identificação de Linfócitos B e macrófagos do baço dos animais.** As células do baço foram obtidas dos animais inoculados (ou não) com tumor de Ehrlich e tratados (ou não) AG ou ciclofosfamida. As células foram marcadas com anticorpos específicos para linfócitos 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 granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) (10A). Para análise dos linfócitos B foi feita a seleção da região positiva para CD19+ no histograma baseado em CD19 (canal 2) (Figura 10B). Em seguida foi avaliada a expressão do Iale na região positiva para Iale+ no histograma baseado em Iale (canal 1) (Figura 10C). Para análise dos macrófagos foi feita a seleção da região positiva para F4/80+ no histograma baseado em F4/80 (canal 3) (Figura 10D). Em seguida foi avaliada a expressão do Iale na região positiva para Iale+ no histograma baseado em Iale (canal 1) (Figura 10E). 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.

4.2.4 Sobrevida de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados com AG

Os animais foram separados em 5 grupos (n=6/grupo), conforme descrito na tabela 4.

**Tabela 4. Divisão dos grupos experimentais para a sobrevida de animais portadores da forma ascítica do turmor de Ehlich.**

| GRUPOS | |
|---|---|
| **CONTROLE** | NEGATIVO (CONTROLE) |
| | POSITIVO (CICLO) |
| **AMINOGUANIDINA** | INÍCIAL (AGI) |
| | FINAL (AGF) |
| | CONTÍNUO (AGC) |

Para avaliação da sobrevida, os animais foram inoculados com 200 µL contendo $2x10^6$ células tumorais de Ehrlich pela via intraperitoneal (ip.). Os Grupos AG foram tratados com uma solução aquosa de hemissulfado de AG na dose de 100mg/kg, por via oral (v.o.) durante os cinco primeiros dias a partir de 24 horas após o inoculo (AGI), por cinco dias a partir do 6º dia após o inoculo (AGF) ou por dez dias após 24 horas do inóculo (AGC). O grupo Controle não recebeu tratamento e o grupo CICLO foi tratado com ciclofosfamida monoidratada (Genuxal – Baxter Oncology) na dose de 25mg/kg, ip. por dez dias após 24 horas do inóculo (Figura 16).

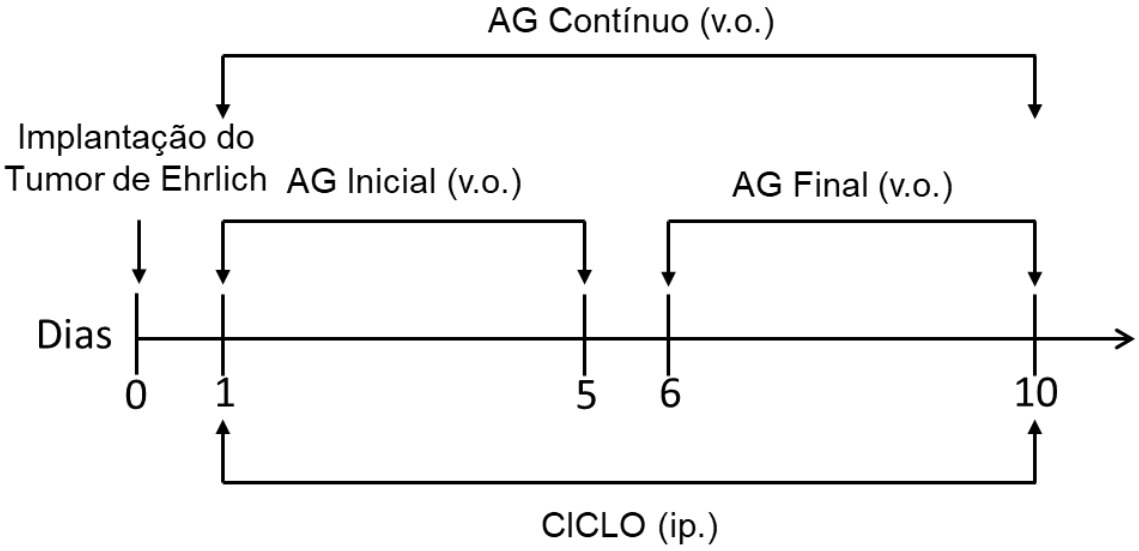



**Figura 16. Protocolo de tratamento no modelo ascítico do Tumor de Ehrlich.**

O peso e a circunferência abdominal foram medidos a cada dois dias após o inóculo e os animais foram mantidos com comida e água *ad libitum*. O efeito do

tratamento com AG sobre a sobrevida de animais portadores do tumor de Ehrlich foi avaliado com base na mediana do tempo de sobrevida (MST) e aumento da expectativa de vida (% ILS). A MST e ILS (%) foram calculadas a partir dos dados da mortalidade no período de observação. O aumento da expectativa de vida foi calculado usando-se a equação segundo (GUPTA et al., 2004): ILS%= (MST grupo tratado/MST grupo controle) – 1 x 100.

## 4.3 Técnicas realizadas

### 4.3.1 Determinação da produção de óxido nítrico

Foram transferidos 50µL dos sobrenadantes das culturas para uma placa de 96 poços de fundo chato aos quais foram adicionados 50µL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida/0,1% de dihidrocloreto de naftileno/2,5% de ácido orto-fosfórico) em temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz. A absorbância foi determinada no leitor de microplaca (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384), com filtro de 540nm, com branco constituído por meio RPMI mais reagente de Griess. Os resultados obtidos em densidade óptica foram transformados em µM de NO, mediante equação de regressão linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (0, 5, 10, 30 e 60µM de NO)(DING, 1988).

### 4.3.2 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$)

As células do peritônio foram suspendidas com PBS e ajustadas para $1x10^6$/mL, e 100 µL foram transferidos para cada poço em placa de 96 poços. Cada amostra foi feita em triplicata, para estimação 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 37ºC, 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 Jow® (TreeStar) e expressos em média de intensidade de fluorescência (MFI).

### 4.3.3 Quantificação de citocinas

Para a quantificação das citocinas IL-6; IL-10; MCP-1; IFN-γ; TNF-α e IL-12p70, no sobrenadante das culturas e no soro, foi utilizada a técnica de CBA (*Cytometric Bead Array*) utizando o kit *Mouse Inflammation cytokine* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Em cada poço da placa de 96 poços, fundo U, foram adicionados 25µL da amostra padrão fornecida pelo fabricante ou dos sobrenadantes a serem testados. Em seguida receberam 25µL de cada reagente *cytokine beads* para marcar a produção de cada citocina e 25µL de anticorpo conjugado ao fluorocromo PE. Os poços foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 2 horas protegidos da luz. Após o período de incubação as amostras foram ressupensas com 150µL de solução tampão. A placa foi centrifugada por 3 minutos à 340 G e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram então ressuspensas em 150µL de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

## 4.4 Análise estatística

Foi realizado o teste de normalidade nos dados obtidos através do teste de D'Agostino & Pearson. Os dados que apresentaram distribuição normal foram apresentados como média e desvio padrão, no entanto na ausência de normalidade os valores foram apresentados como mediana. Os grupos foram comparados pelos testes *t* de Student e ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Para os dados não paramétricos foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. A avaliação da sobrevida foi realizada pelo teste de Log-Rank. Os

resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias (e.p.m.) (SOKAL & ROHLF, 1996). O software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para realização dos testes estatísticos, levando-se em consideração de significância o p valor menor que 0,05 e o intervalo de confiança de 95%.

## 5 RESULTADOS

5.1 Efeito da inibição da iNOS na polarização de macrófagos RAW 264.7.

5.1.1 Citotoxicidade da Aminoguanidina em macrófagos Raw 264.7

Inicialmente, a análise do efeito citotóxico da AG sobre as células foi avaliada por estimativa da viabilidade dos macrófagos Raw 264.7, pelo ensaio MTT, após 48h de cultura com AG nas concentrações 0,01; 0,1; 1 e 10mM. Os resultados obtidos demonstraram que os macrófagos Raw 264.7 que foram tratados apenas na concentração de 10mM apresentaram viabilidade <30%, sendo as demais não tóxicas (Figura 17).

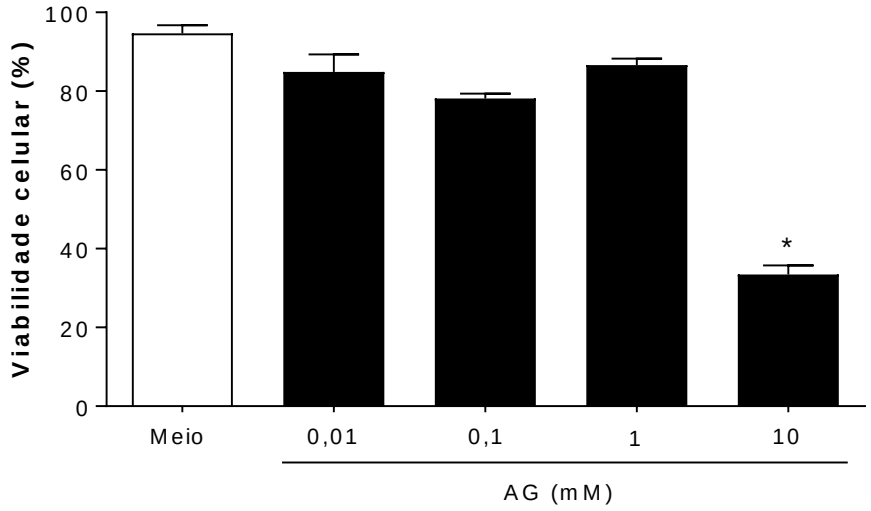



**Figura 17. Viabilidade das células Raw 264.7 após tratamento com Aminoguanidina.** As células foram cultivadas por 48 horas em estufa a 37°C, 5% de CO2, com diferentes concentrações de AG, (0,01; 0,1; 1 e 10mM). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias de dois experimentos realizados em triplicata. * (p<0,05) em comparação ao grupo controle. Teste Mann Whitney.

5.1.2 Aminoguanidina inibe a produção de óxido nítrico em macrófagos M1

Após determinar as concentrações não tóxicas (0,01; 0,1 e 1mM), verificou-se qual das concentrações seria capaz de inibir a produção de óxido nítrico em macrófagos Raw 264.7 polarizados para o perfil M1. Após 24 e 48 horas de tratamento *in vitro* (Figura 18A e B), apenas a concentração de 1mM apresentou o percentual de inibição próximo a 100% (Figura 18C e D), sendo a de escolha para os experimentos seguintes.

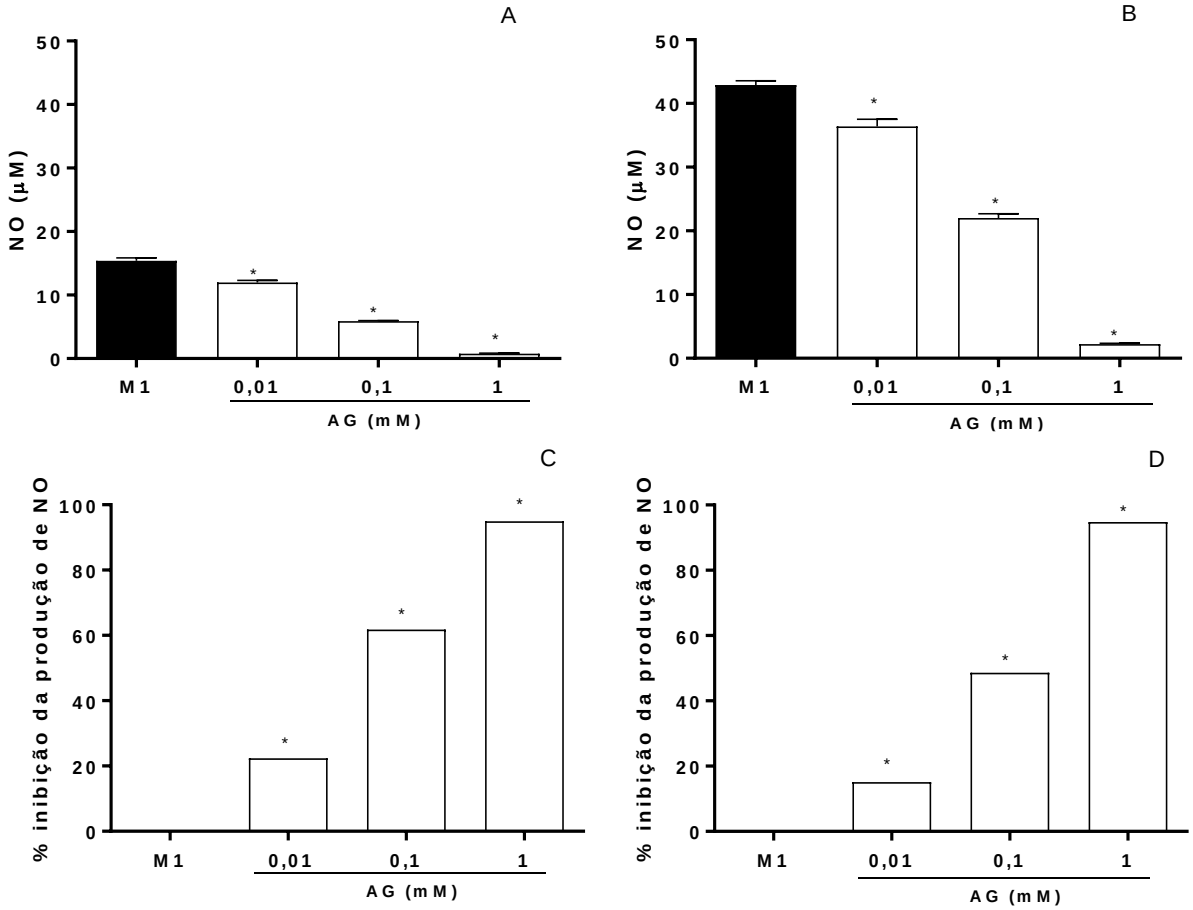



**Figura 18. Aminoguanidina inibe a produção de óxido nítrico em macrófagos M1.** As células foram estimuladas para o perfil M1 e cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato na concentração de $1x10^6$/mL, em quadruplicada, e incubadas 24 (A e C) e 48 horas (B e D) a 37°C e 5% de $CO_2$ na presença ou ausência de AG (0,01; 0,1 e 1 mM). Os macrófagos foram estimulados para o perfil M1 com LPS de *E.Coli* (0111:B4) (200ng/mL) e IFN-γ (10ng/mL). A concentração de NO foi analisada indiretamente por meio da mensuração das concentrações de nitrito pelo método colorimétrico de Griess. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias. * ($p<0,05$) em comparação ao grupo M1. N.D. Teste *One Way* ANOVA.

,

### 5.1.3 A inibição da iNOS não promove a polarização de macrófagos

Por uma vez que a concentração de 1mM de AG capaz de inibir a produção de NO, macrófagos Raw 264.7 foram cultivados com tal concentração durante 24 e 48 horas para avaliar se o inibidor da iNOS, por si só, polarizaria os macrófagos. Os grupos controles foram estimulados ou não para os perfis M1 e M2.

A Aminoguanidina não foi capaz de alterar o número de células positivas para os marcadores CD80 e CD86 em 24 e 48 horas (FIGURA 19A, B, D e E). Em relação ao marcador iNOS, foi menor que o grupo controle M1 e não foi diferente dos grupos controle M0 e M2 (FIGURA 19C e F).

Tal como os grupos M0 e M2, o grupo AG não foi capaz de aumentar a expressão de CD80 e CD86 em 24 horas (Figura 20A e B), no entanto após 48 horas a expressão destes marcadores aumentaram em relação aos grupos M0 e M2 e continuaram menor em comparação ao grupo M1 (Figura 20D e E). Em relação a expressão da iNOS, a AG não foi capaz de promover a expressão desta enzima nos dois tempos de cultura, assim como os grupos M0 e M2, quando comparados ao grupo M1 (Figura 20C e F). Os histogramas da expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos Raw 264.7 tratados com Aminoguanidina está representado na Figura 21.

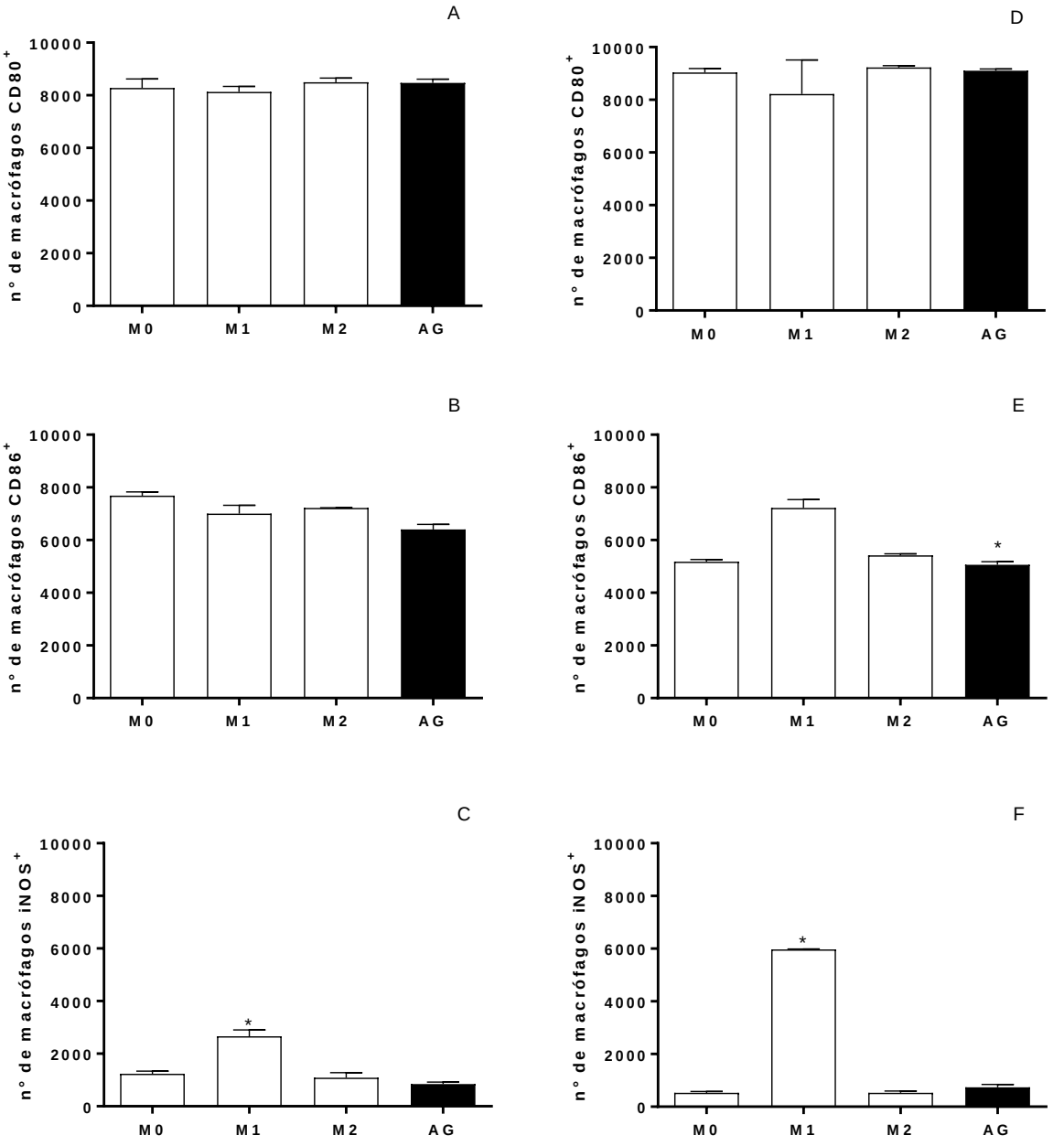



**Figura 19. Valor absoluto de macrófagos Raw 264.7 tratados com Aminoguanidina positivos para marcadores CD80, CD86 e iNOS.** Macrófagos 264.7 cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de $1x10^6$/mL, em triplicata, e incubadas por 24 (A, B e C) e 48 horas (D, E e F) a 37°C e 5% de CO2 na presença de AG a 1mM. Os grupos controle M1 e M2 foram estimulados com LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL) ou IL-13 (20ng/mL) e IL-4 (40ng/mL) respectivamente. O grupo M0 não recebeu estímulo. Foi avaliado o número de células positivas para os marcadores CD80, CD86 e iNOS. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias. * ($p<0,05$) em comparação ao Grupo m1. Teste Kruskal-Wallis e pos-teste de Dunn.

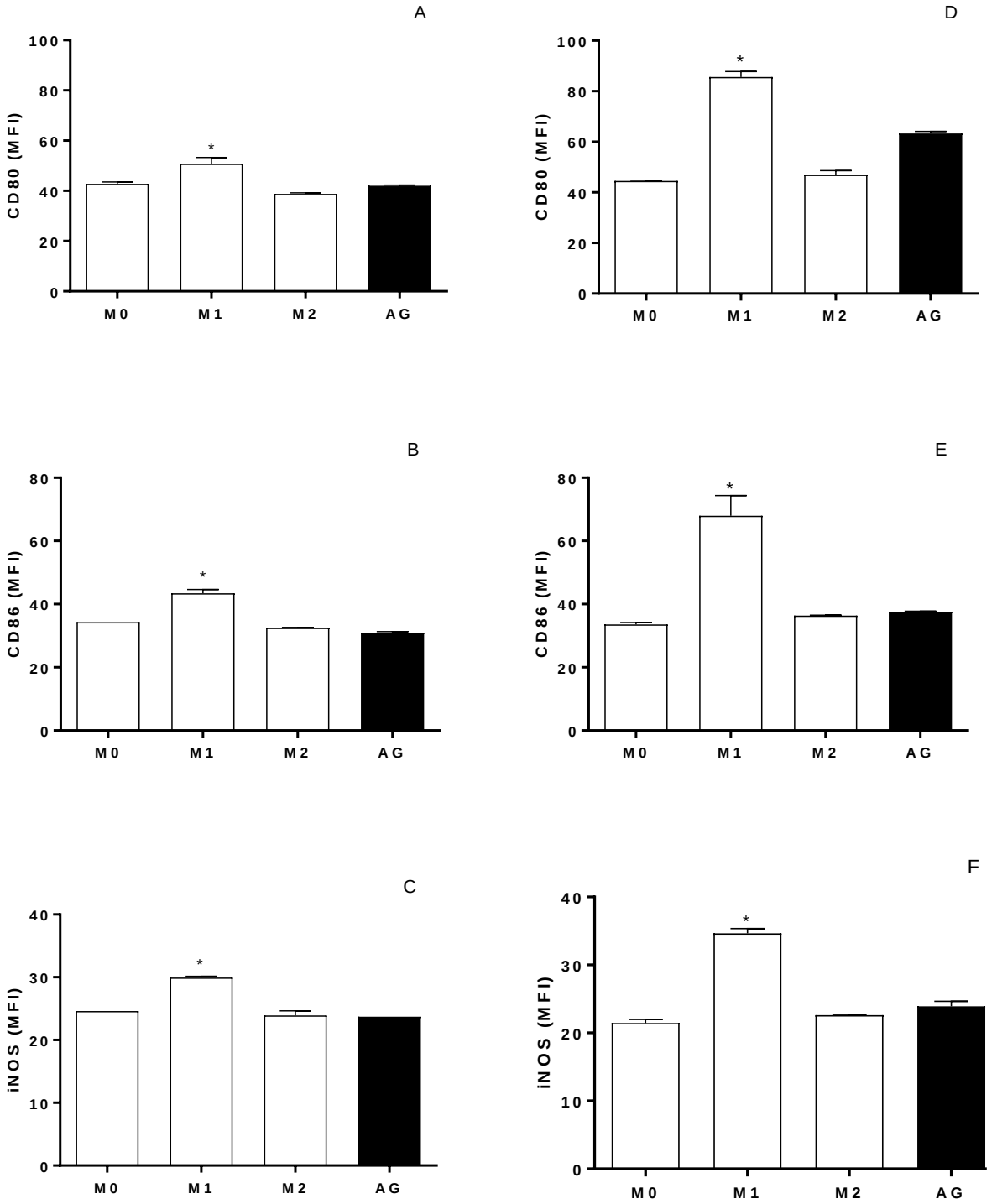



**Figura 20. Expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos Raw 264.7 tratados com Aminoguanidina.** Média de intensidade de fluorescência da expressão de CD80, CD86 e iNOS de macrófagos cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de $1x10^6$/mL, em quadruplicada, e incubadas por 24 (A, B e C) e 48 horas (D, E e F) a 37°C e 5% de CO2 na presença de AG a 1mM. Os grupos controle M1 e M2 foram estimulados com LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL) ou IL-13 (20ng/mL) e IL-4 (40ng/mL) respectivamente. O grupo M0 não recebeu estímulo. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias. *(p<0,05)Teste Kruskal-Wallis e pos-teste de Dunn.

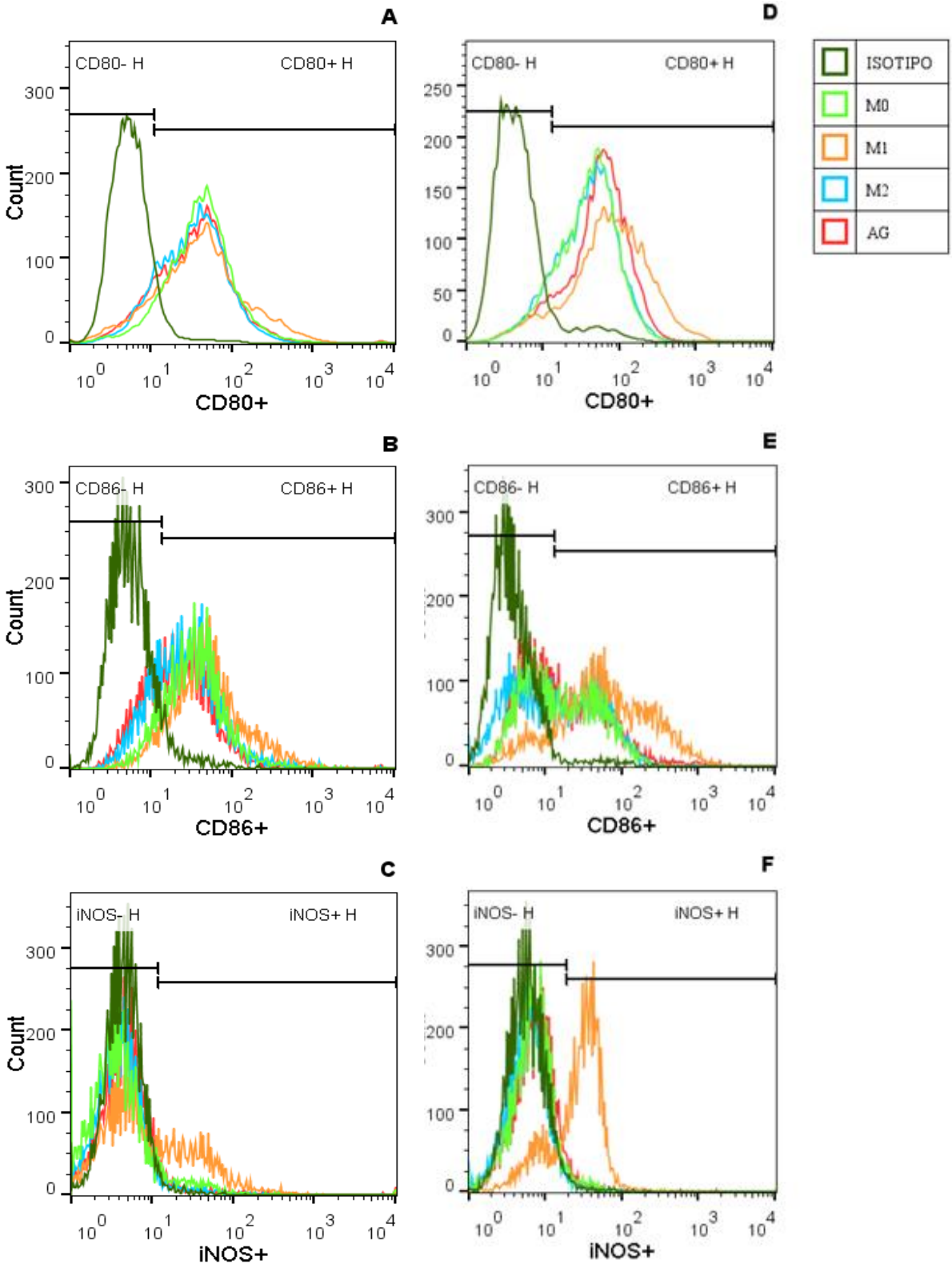



**Figura 21. Histograma da expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos Raw 264.7 tratados com Aminoguanidina.** Histograma da expressão de CD80, CD86 e iNOS de macrófagos cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de 1x10$^6$/mL, em quadruplicada, e incubadas por 24 (A, B e C) e 48 horas (D, E e F) a 37°C e 5% de CO2 na presença de AG a 1mM. Os grupos controle M1 e M2 foram estimulados com LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL) ou IL-13 (20ng/mL) e IL-4 (40ng/mL) respectivamente. O grupo M0 não recebeu estímulo.

5.1.4 A polarização de macrófagos M1 é acentuada pela inibição da iNOS

Como anteriormente observado, a concentração de 1mM de AG foi capaz de inibir a produção de NO por macrófagos estimulados para o perfil M1 em 24 horas e que se manteve por 48 horas (Figura 22A). Apesar da AG não ser capaz de polarizar os macrófagos Raw 264.7, esta promoveu a acentuação da polarização dos macrófagos quando estimulados para o perfil M1 e tratados concomitantemente com o inibidor. A expressão dos receptores co-estimuladores CD80 e CD86 foi maior em 24 horas de cultura, se intensificando em 48 horas. De forma inesperada, a iNOS, sua enzima alvo de inibição, também apresentou sua expressão aumentada em 24 horas e intensificada em 48 horas (FIGURA 22B, C e D).

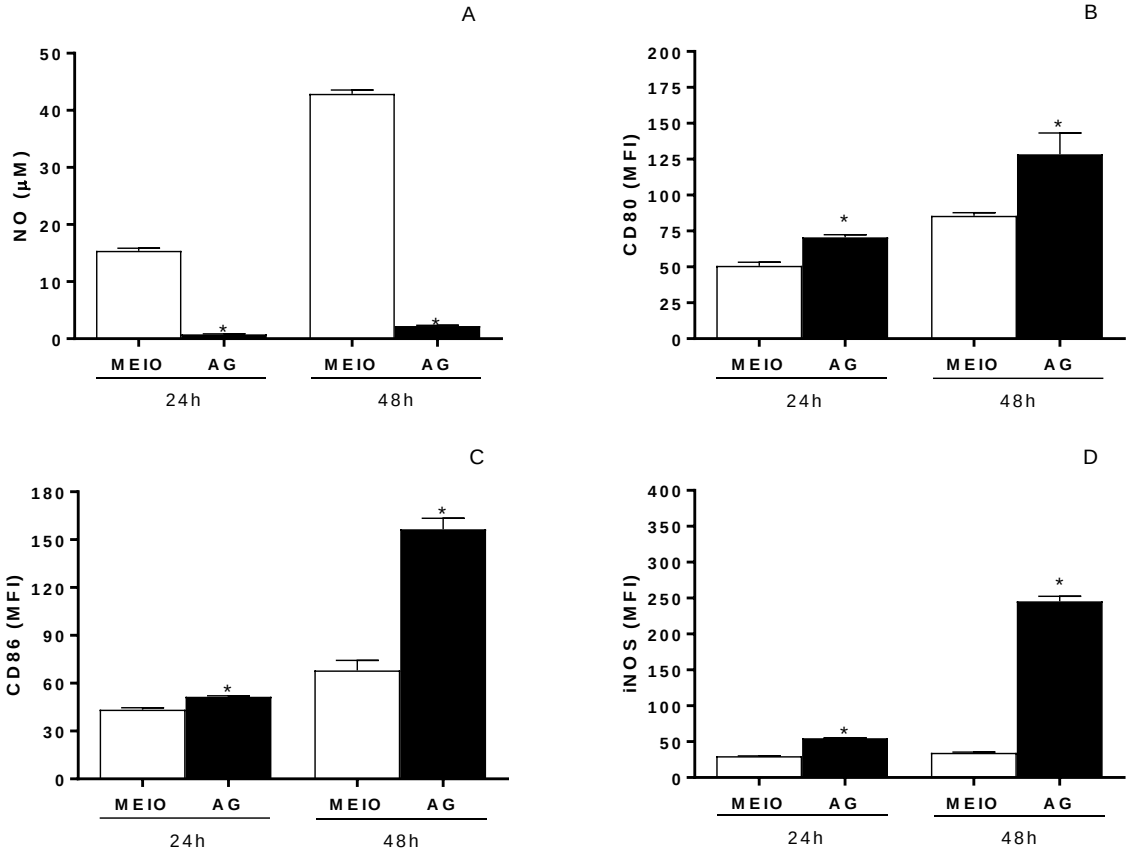



**Figura 22. Efeito da inibição da iNOS na produção de NO e na expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos M1.** Produção de NO (A) e média de intensidade de fluorescência da expressão de CD80 (B), CD86 (C) e iNOS (D) em macrófagos cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de $1x10^6$/mL, em triplicata, incubados a 37°C e 5% de $CO_2$ estimulados ou não para o perfil M1 (LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL), tratados ou não com Aminoguanidina (1 mM) concomitante por 24 e 48 horas. A concentração de NO foi analisada indiretamente por meio da mensuração das concentrações de nitrito pelo método colorimétrico de Griess. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias. * para p<0,05. Teste One Way Anova.

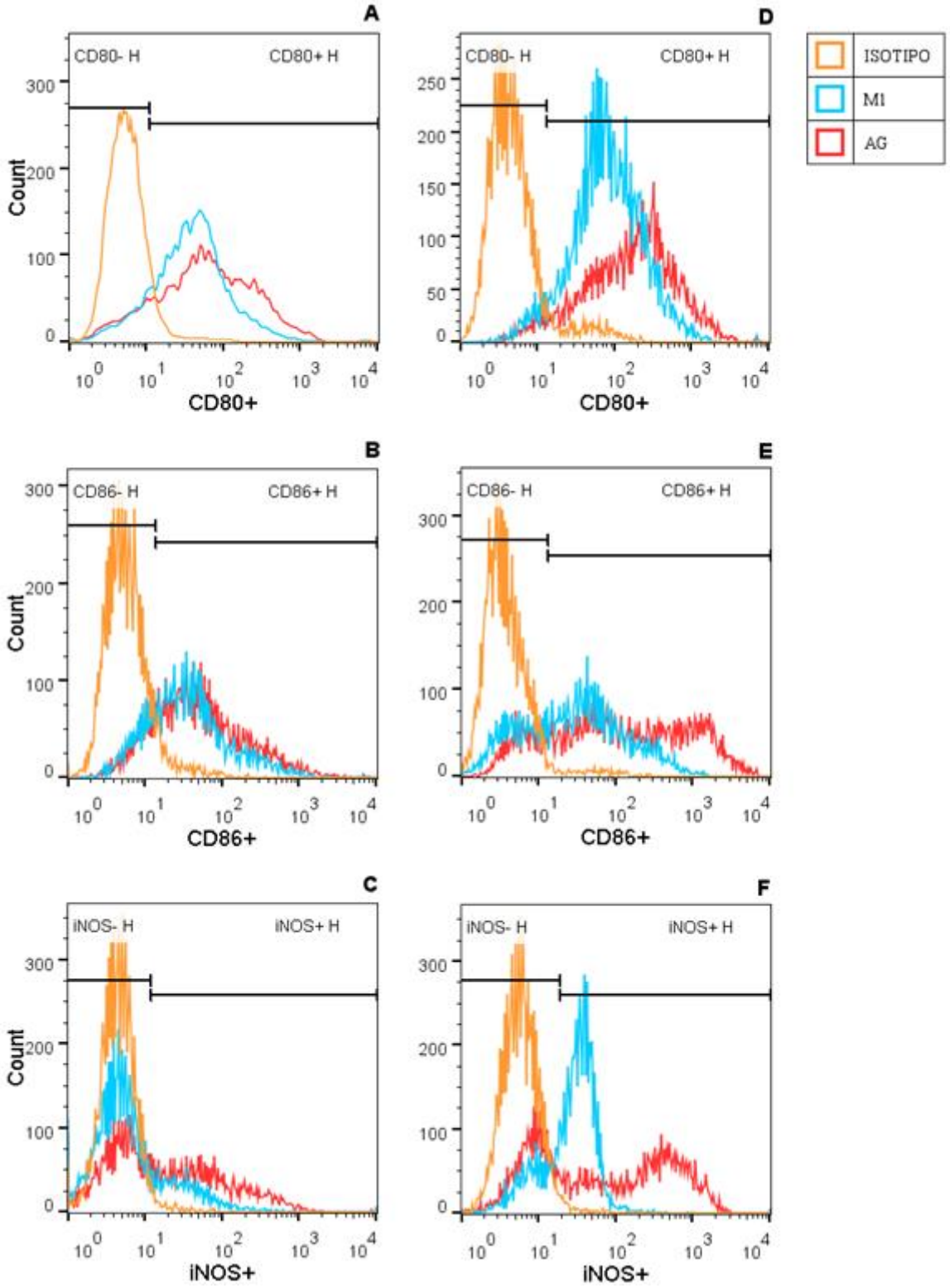



**Figura 23. Histograma da expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos Raw 264.7 polarizados para o perfil M1 e tratados com Aminoguanidina.** Histograma da expressão de CD80, CD86 e iNOS em macrófagos cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de $1x10^6$/mL, em triplicata, incubados a 37°C e 5% de CO2 estimulados ou não para o perfil M1 (LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL), tratados ou não com Aminoguanidina (1 mM) da seguinte maneira: tratamento e polarização concomitante por 24 (A, B e C) e 48 horas (D, E e F).

O valor absoluto de macrófagos positivos para CD80, CD86 e iNOS não foi alterado tanto quando o tratamento foi concomitante com os estímulos de polarização (FIGURA 24A, B e C).

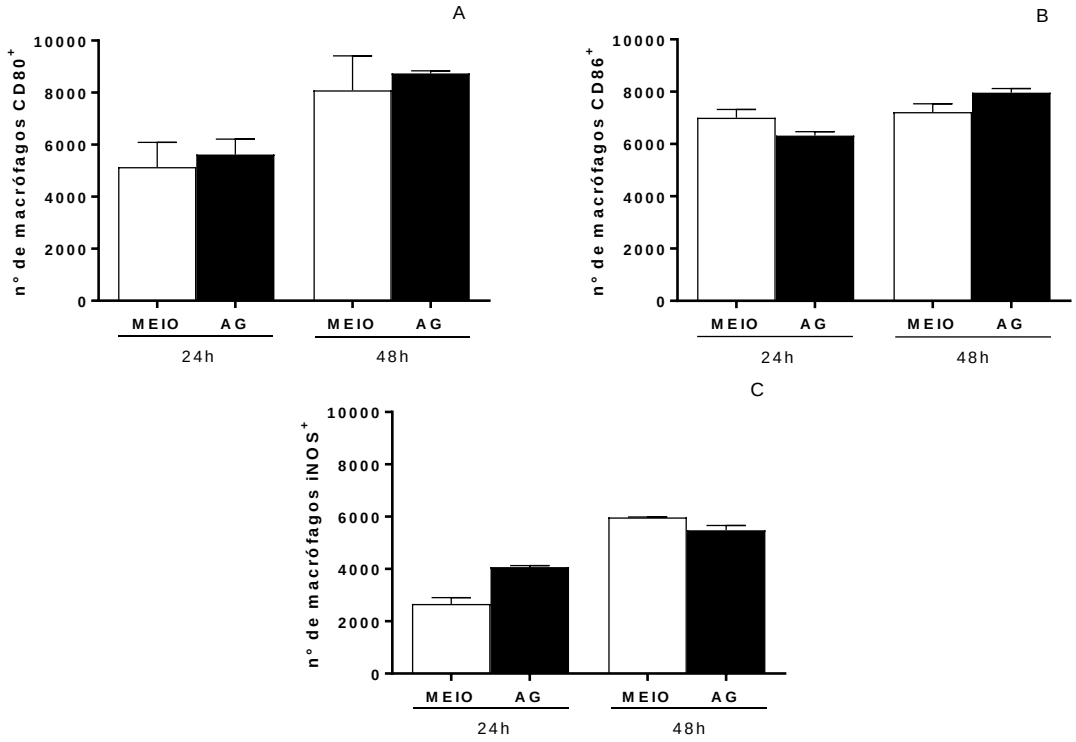



**Figura 24. Valor absoluto de macrófagos M1 e tratados com Aminoguanidina positivos para marcadores CD80, CD86 e iNOS.** Valos absoluto de macrófagos Raw 264.7 positivos para os marcadores CD80 (A), CD86 (B) e iNOS (C) cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de $1x10^6$/mL, em triplicata, incubados a 37°C e 5% de CO2 estimulados ou não para o perfil M1 (LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL), tratados ou não com Aminoguanidina (1 mM) da seguinte maneira: tratamento e polarização concomitante por 24 e 48 horas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias. * para p<0,05. Teste One Way Anova.

Em relação ao efeito da AG na polarização do perfil M2, o tratamento não foi capaz de alterar a expressão dos marcadores CD80 e CD86, nem induzir a expressão da enzima iNOS.

Em relação ao perfil funcional dos macrófagos estimulados para os perfis M1 e tratados com AG, podemos observar que a inibição da iNOS nos macrófagos M1 promoveu o aumento da produção das citocinas inflamatórias MCP-1, IL-6 e IL-12p70, o aumento da citocina reguladora IL-10, diminuição do TNF e nenhuma alteração no IFN-γ em 24 horas. No entanto em 48 horas, foram observados a diminuição de IL-6 e MCP-1, aumento de TNF e não foi detectado IL-12p70 e IL-10 (Figura 25).

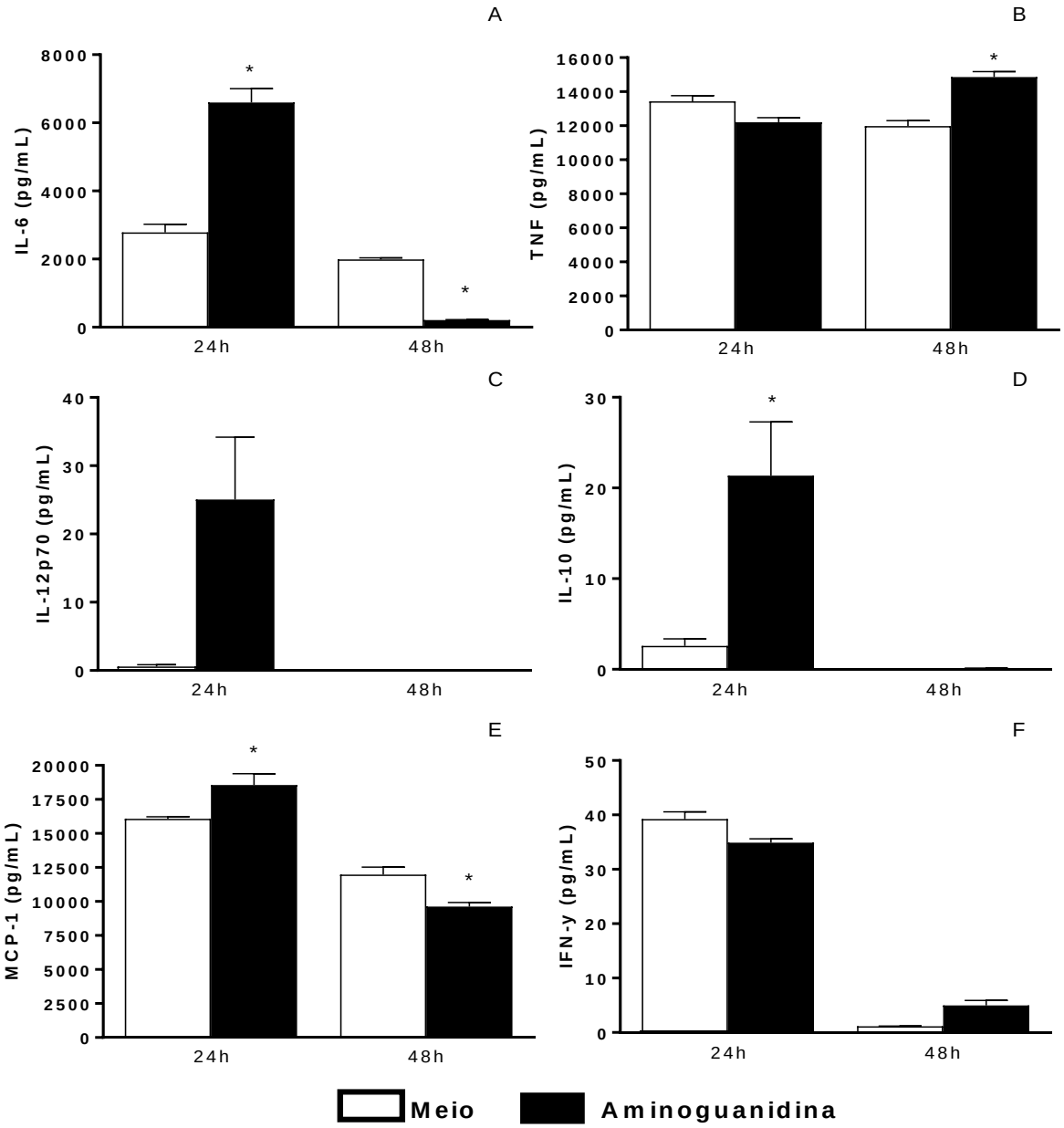



**Figura 25. Efeito da inibição da iNOS na produção de citocinas em macrófagos polarizados.** Concentração das citocinas IL-6 (A), TNF(B), IL-12p70(C), IL-10 (D), MCP-1(E) e IFN-γ (F) em macrófagos cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de $1x10^6$/mL, em triplicata, incubados a 37°C e 5% de CO2 estimulados ou não para os perfis M1 e M2 (LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL), tratados ou não com Aminoguanidina (1 mM) da seguinte maneira: tratamento e estimulo concomitante por 24 e 48 horas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias. * para p<0,05. Teste t de Student.

### 5.1.5 Efeito transitório da Aminoguanidina na inibição da iNOS

Na presença do inibidor, houve a intensificação da polarização para o perfil M1 sem produção de NO. No entanto, após a suspensão do tratamento, os macrófagos M1, previamente inibidos pela presença da AG, retomam a produção de NO, sendo

que esta produção se iguala aos macrófagos M1 não tratados após em 24 horas e superior após 48 horas (Figura 26A).

Em relação a expressão dos receptores co-estimuladores, houve diminuição na expressão do CD80 em 24 e 48 horas, ao passo que o CD86 se manteve maior em relação aos macrófagos M1 não inibidos em ambos os tempos. À medida que os macrófagos M1, previamente com a iNOS inibida, retomam a produção de NO, a expressão de iNOS que se manteve maior 24 horas após a suspensão do tratamento se igualou em 48 horas (FIGURA 26B, C e D).

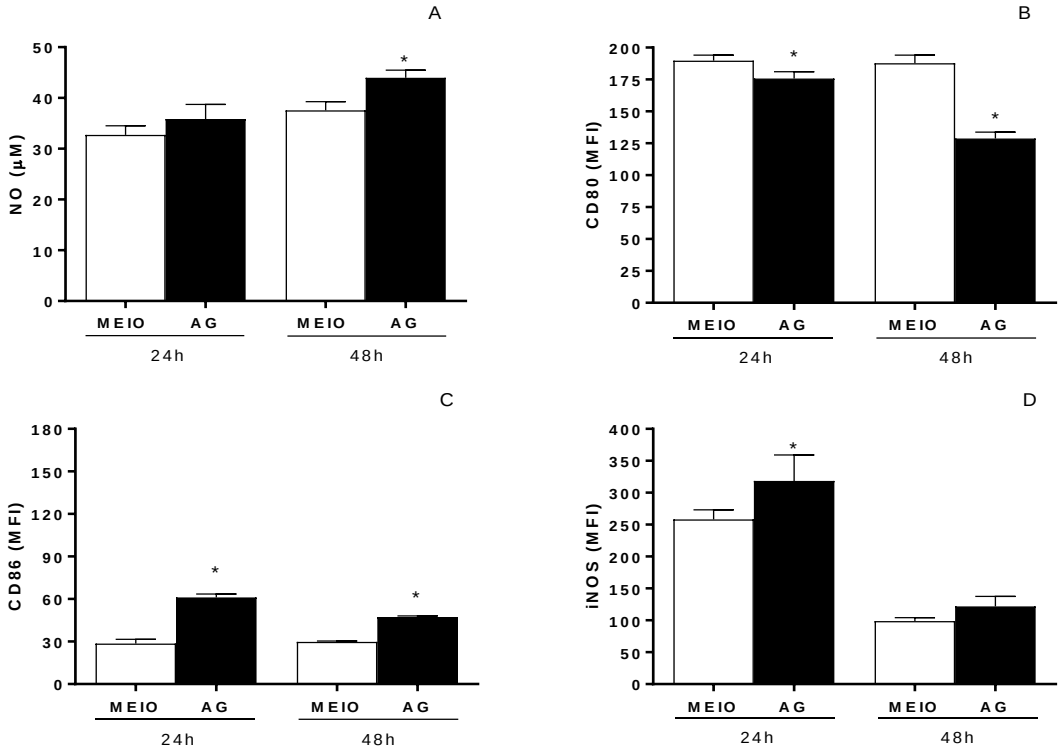



**Figura 26. Efeito transitório da inibição da iNOS na produção de no e expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS de macrófagos M1 após retirada dos estímulos e tratamento.** Concentração de NO e média de intensidade de fluorescência da expressão de CD80 (A), CD86 (B) e iNOS (C) em macrófagos cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de $1x10^6$/mL, em triplicata, incubados a 37°C e 5% de $CO_2$ estimulados ou não para o perfil M1 (LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL), tratados ou não com Aminoguanidina (1 mM) e polarizado concomitante por 24 horas após a troca do sobrenadante por meio novo por mais 24 e 48 horas. A concentração de NO foi analisada indiretamente por meio da mensuração das concentrações de nitrito pelo método colorimétrico de Griess.Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias. * para $p<0,05$. Teste One Way Anova.

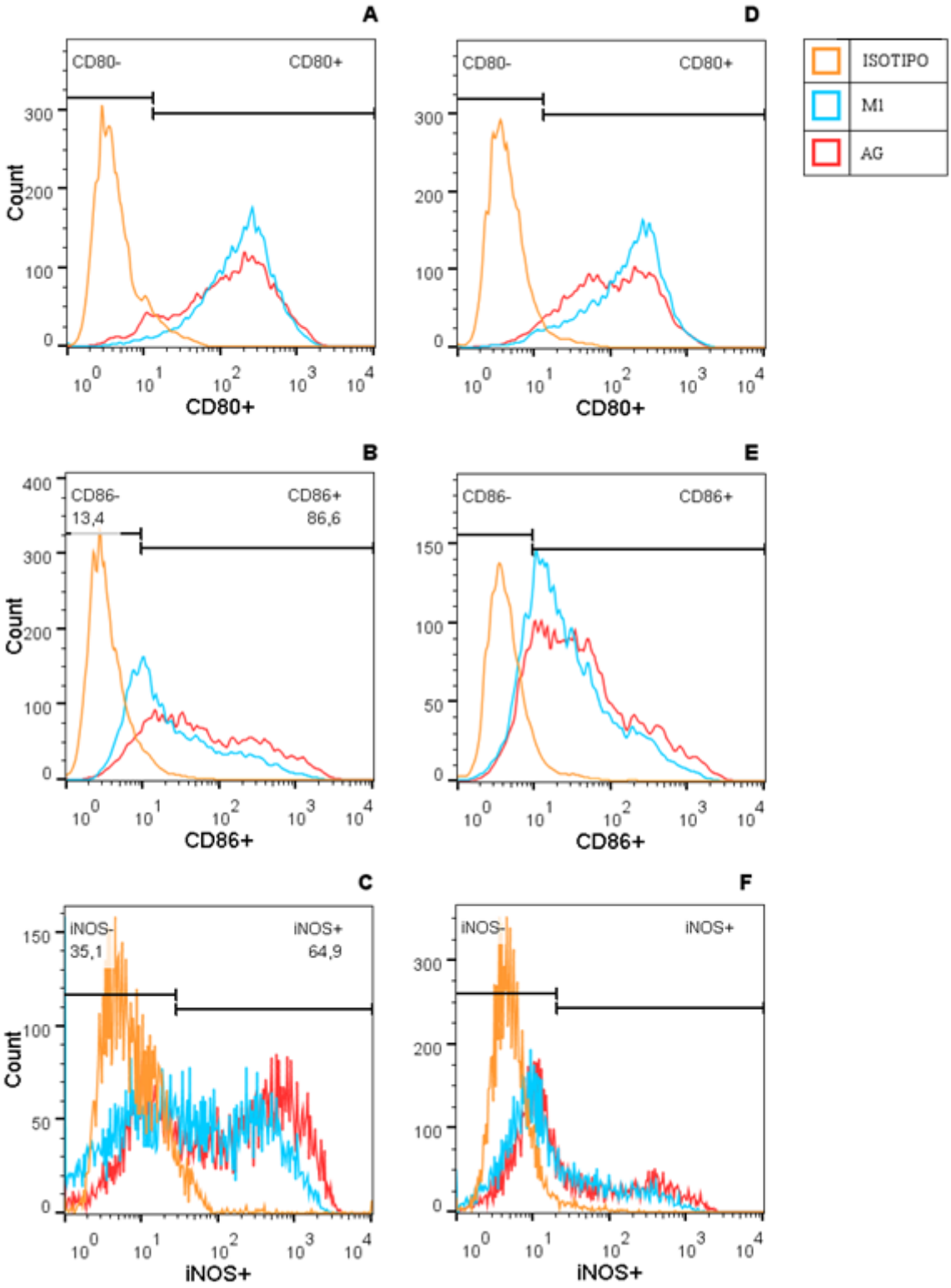



**Figura 27. Histograma da expressão dos marcadores CD80, CD86 e iNOS em macrófagos Raw 264.7 polarizados para o perfil M1 e tratados com Aminoguanidina.** Histograma da expressão de CD80, CD86 e iNOS em macrófagos cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de 1x10$^6$/mL, em triplicata, incubados a 37°C e 5% de CO2 estimulados ou não para o perfil M1 (LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL), tratados ou não com Aminoguanidina (1 mM) da seguinte maneira: tratamento com AG e polarização concomitante por 24 horas da troca do sobrenadante por meio novo por mais 24 (A, B e C) e 48 horas (D, E e F).

O valor absoluto de macrófagos positivos para CD80, CD86 e iNOS não foi alterado, após 24 e 48 horas da suspensão do tratamento e dos estímulos de polarização (FIGURA 28A, B e C).

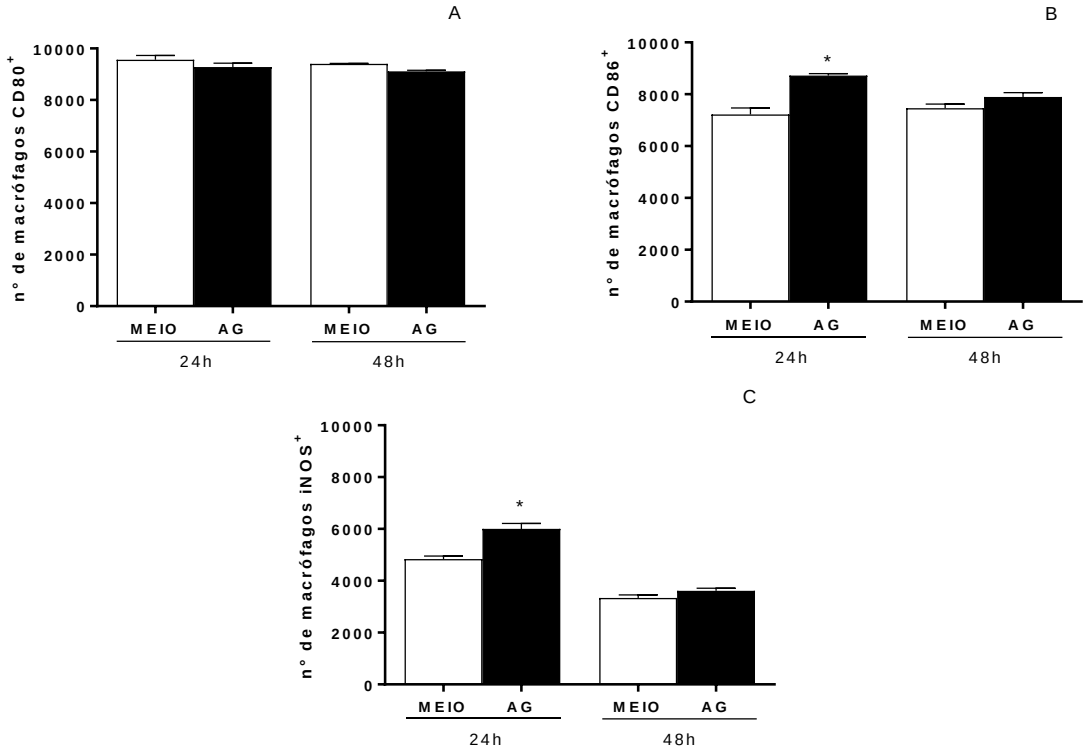



**Figura 28. Valor absoluto de macrófagos M1 tratados com Aminoguanidina positivos para marcadores CD80, CD86 e iNOS após retirada dos estímulos e tratamento.** Valos absoluto de macrófagos Raw 264.7 positivos para os marcadores CD80 (A), CD86 (B) e iNOS (C) cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de $1x10^6$/mL, em triplicata, incubados a 37°C e 5% de CO2 estimulados ou não para o perfil M1 (LPS de *E.Coli* (0111.B4) (200ng/mL) e IFNγ (10ng/mL), tratados ou não com Aminoguanidina (1 mM) e polarizados concomitante por 24 horas após troca do sobrenadante por meio novo por mais 24 e 48 horas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias. * para $p<0,05$. Teste One Way Anova.

5.2 Citotoxicidade da AG em células do tumor de Ehrlich

Após avaliarmos seus efeitos na polarização de macrófagos Raw 264.7, verificamos se a AG, por só si, seria capaz de matar as células do tumor de Ehrlich nas concentrações previamente utilizadas com os macrófagos *in vitro*. Assim como observado anteriormente, as concentrações de 0,01; 0,1 e 1mM da AG não foram tóxicas, sendo apenas a de 10mm capaz de diminuir a viabilidade das células tumorais (Figura 29).

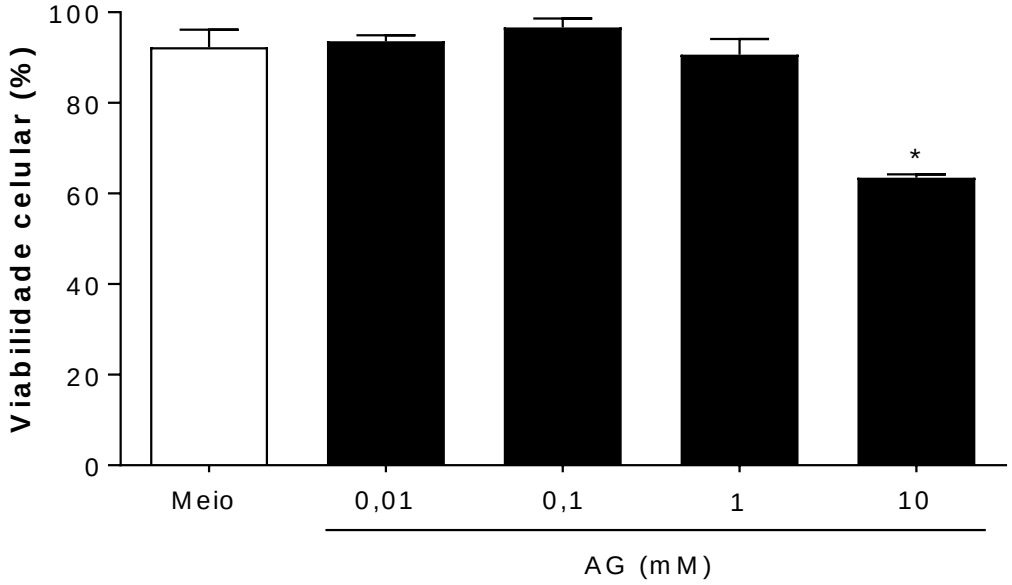



**Figura 29. Viabilidade das células do tumor de Ehrlich após tratamento com Aminoguanidina.** As células foram cultivadas por 48 horas em estufa a 37°C, 5% de CO2, com diferentes concentrações de AG, (0,01; 0,1; 1 e 10mM). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias de dois experimentos realizados em triplicata. * ($p<0,05$) em comparação ao grupo controle. Teste Mann Whitney.

5.3 Efeito do inibidor da iNOS sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich

Nos animais onde o tumor foi inoculado na pata houve o retardo no crescimento do tumor a partir do D8 no grupo AGI em relação ao grupo Controle. Esse retardo não foi observado no grupo AGF (FIGURA 30).

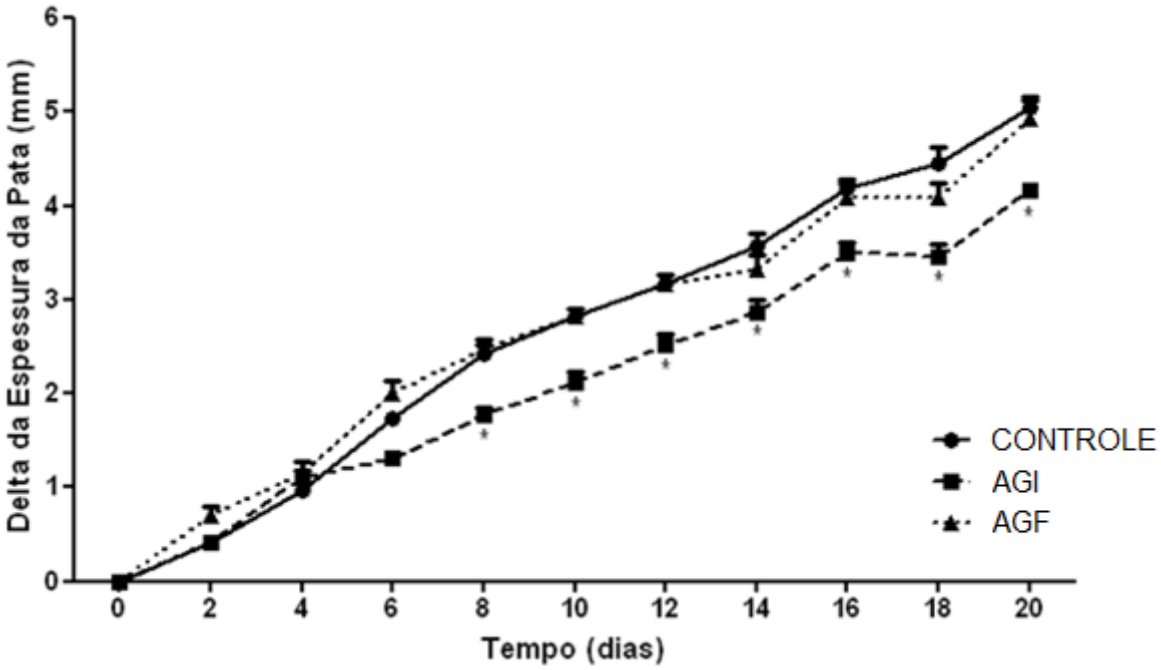



**Figura 30. Avaliação do desenvolvimento TES em camundongos tratados ou não com AG.** As patas dos camundongos foram medidas a cada 2 dias durante 20 dias. Os dados foram expressos com média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.* p< 0,05 quando comparados aos grupos controle e AGF.

Em relação aos animais onde o tumor foi inoculado na orelha, foi observado o retardo do crescimento do tumor na orelha dos camundongos dos grupos AG inicial e AG contínuo a partir do D8 quando comparados aos grupos Controle e AG final, no entanto permanecendo maiores que a área dos tumores do grupo Ciclo. Não foi observada alteração da área do tumor no grupo AG final em relação ao grupo Controle, ambos maiores que o grupo Ciclo (Figura 31).

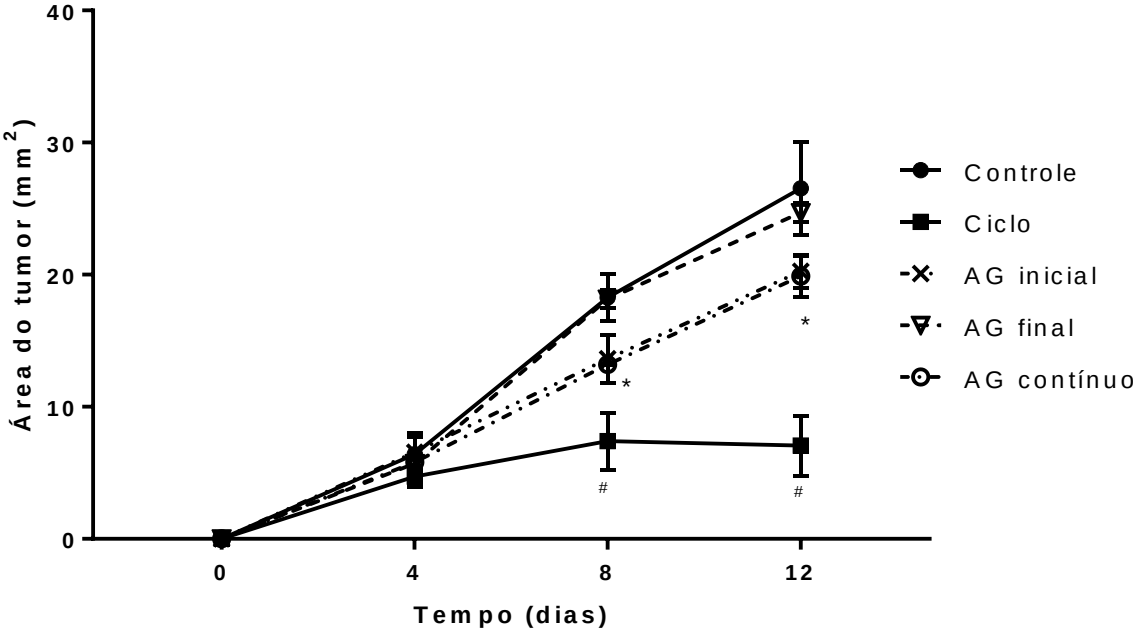



**Figura 31. Avaliação do desenvolvimento TES em camundongos tratados ou não com AG.** As orelhas dos camundongos foram fotografadas a cada 4 dias durante 12 dias. A área do tumor foi calculada através do programa ImageJ. Os dados foram expressos com média ± desvio padrão de 5 animais por grupo. * p< 0,05 quando comparados ao grupo Controle, Ciclo e AG final. # p< 0,05 quando comparados ao grupo Controle, AG inicial, final e contínuo. Two-way ANOVA.

As análises subsequentes foram realizadas nos animais com o tumor sólido na orelha, visto que obtivemos o mesmo resultado observado nos animais com o tumor na pata e a localização do tumor na orelha facilita a manipulação e as análises.

5.3.1 Análise histopatológica das orelhas com tumor de Ehrlich.

Em todos os grupos foi observada a presença de células tumorais volumosas, pouco diferenciadas e que mostram cromatina irregularmente distribuída, bem como figuras de mitose (Figura 32). Em todos os grupos há um predomínio de infiltrado de células polimorfonucleares, necrose e edema (Figura33). A presença de vasos sanguíneos, independentemente do calibre, foi mais expressiva no grupo Controle e Ciclo (Figura 34A e B) que nos grupos AG inicial (Figura 34C), AG final (Figura 34D) e AG Contínuo (Figura 34E)(Tabela 5).

**Tabela 5. Escore clínico da orelha de camundongos com Tumor sólido de Ehrlich ou não e tratados com Aminoguanidina.**

| ESCORE | Limpo | Controle | Ciclo | AG Inicial | AG final | AG contínuo |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Presença de células tumorais | 0 | 1,7±0,5 | 2±0,9 | 1,8±0,8 | 2±0 | 2±0,6 |
| Infiltrado | 0 | 2,7±0,6 | 2±0 | 2,6±0,5 | 2,8±0,4 | 2,4±0,9 |
| Necrose | 0 | 1±0 | 1±0 | 1,2±0,4 | 1,6±0,5 | 1,2±0,4 |
| Angiogenese | 0 | 1±0 | 1±0 | 0*# | 0*# | 0*# |
| Edema | 0 | 2±0,9 | 2,3±0,5 | 1,8±1 | 2,2±1,2 | 1,6±1,4 |

Análise histopatológica da orelha direita de camundongos eutanasiados 12 dias após a inoculação do tumor de Ehrlich tratados com Aminoguanidina na dose de 100mg/kg, v.o. durante cinco primeiros dias a partir do segundo dia de inoculo (AG inicial), por cinco dias a partir do sétimo dia após o inoculo (AG final) ou por dez dias após o inóculo (AG contínuo). O Grupo limpo não foi inoculado com o tumor de Ehrlich. O grupo Controle foi inoculado o tumor e não recebeu tratamento e o grupo Ciclo foi inoculado o tumor tratado com ciclofosfamida na dose de 25mg/kg, i.p. corados por hematoxilina-eosina e analisados em aumento de 400x.

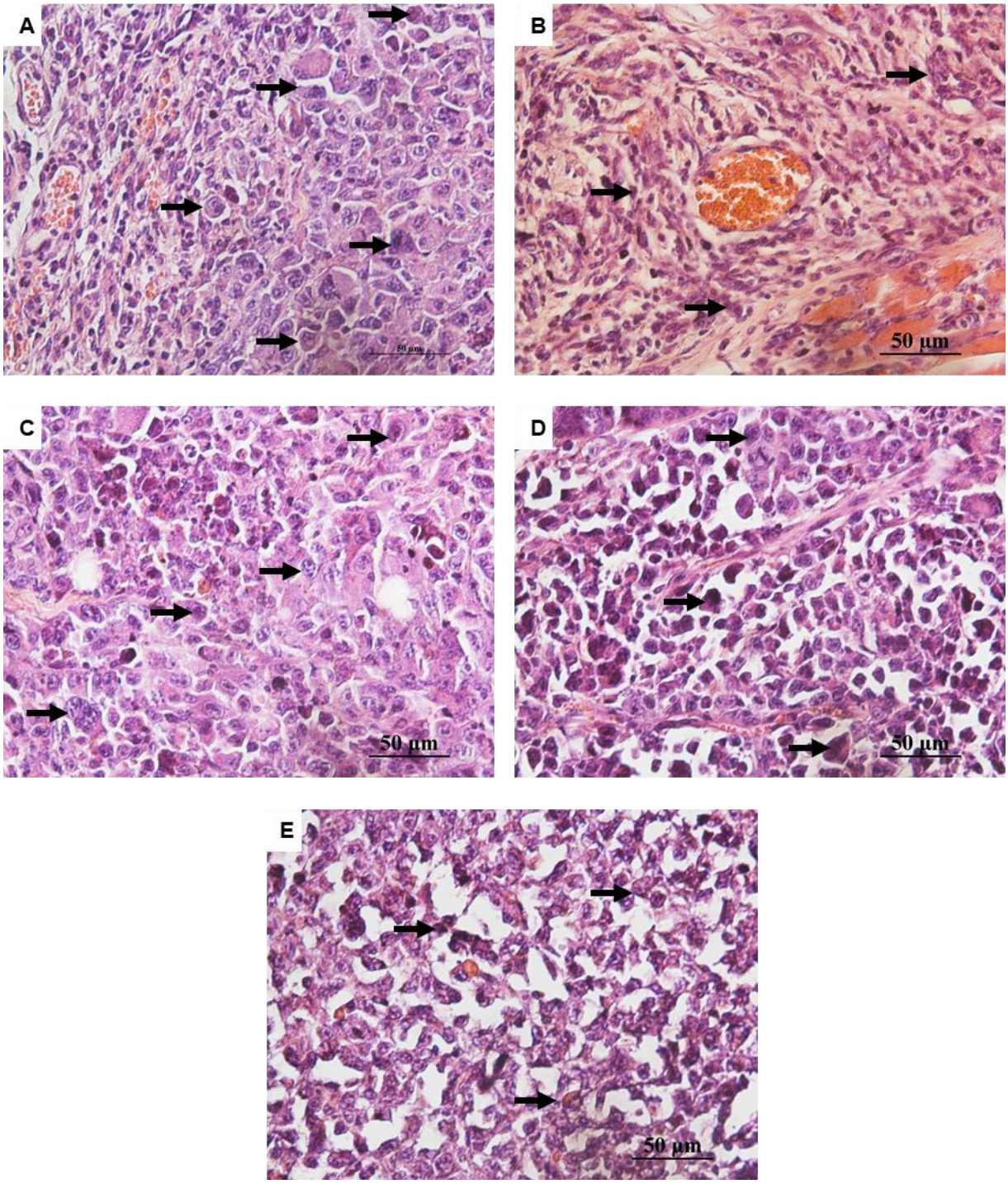



**Figura 32. Fotomicrografia da orelha direita de camundongos com tumor de Ehrlich ou não e tratados ou não com AG.** As imagens, com ênfase nas células tumorais, representam cortes histológicos da orelha direita 12 dias após a inoculação do tumor de Ehrlich, corados por hematoxilina-eosina e analisados em aumento de 400x. A: Grupo Controle; B: Grupo Ciclo; C: Grupo AG inicial; D: Grupo AG final e E: Grupo AG contínuo.

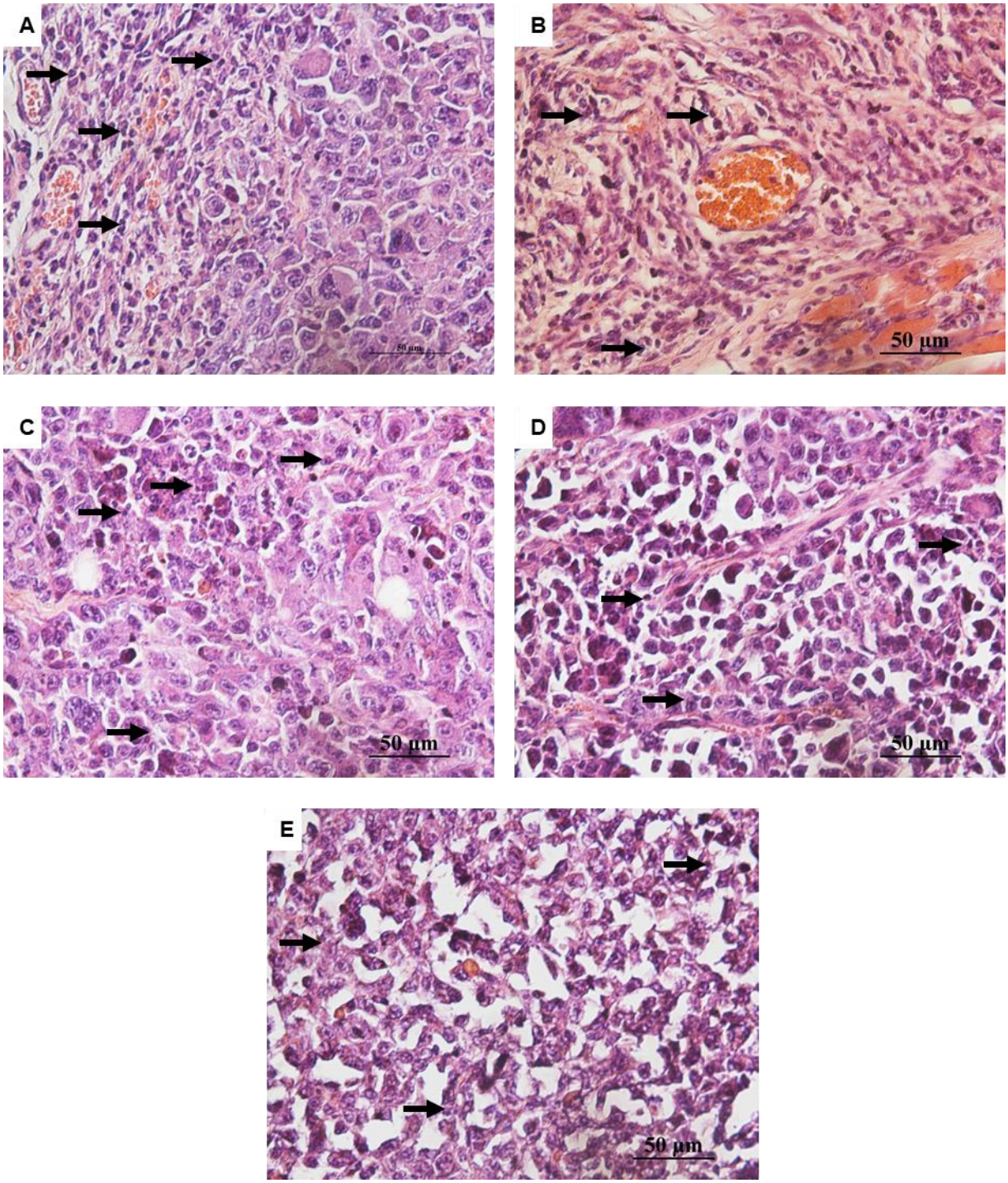



**Figura 33. Fotomicrografia da orelha direita de camundongos com tumor de Ehrlich ou não e tratados ou não com AG.** As imagens, com ênfase no infiltrado celuar, representam cortes histológicos da orelha direita 12 dias após a inoculação do tumor de Ehrlich, corados por hematoxilina-eosina e analisados em aumento de 400x. A: Grupo Controle; B: Grupo Ciclo; C: Grupo AG inicial; D: Grupo AG final e E: Grupo AG contínuo.

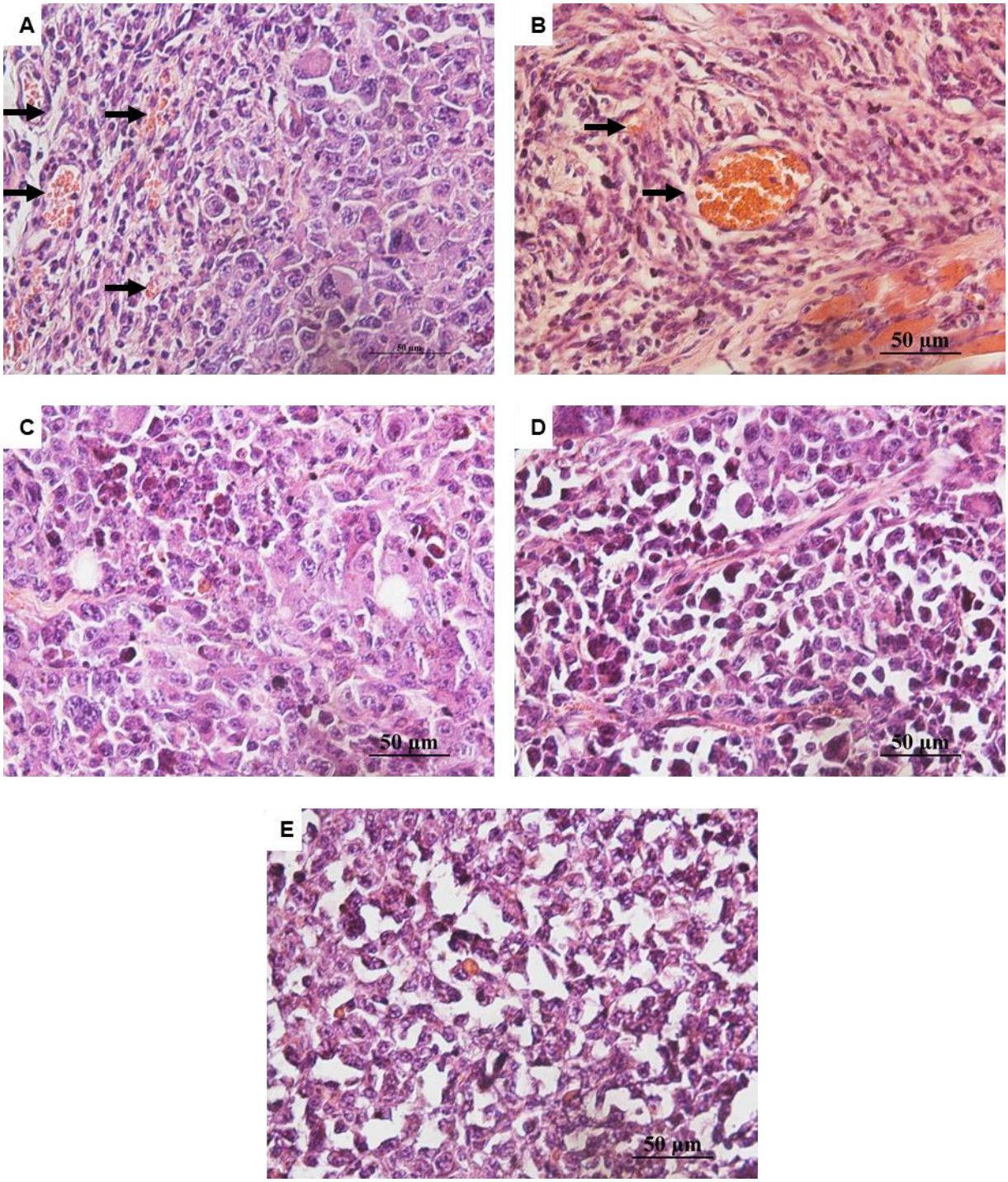



**Figura 34. Fotomicrografia da orelha direita de camundongos com tumor de Ehrlich ou não e tratados ou não com AG.** As imagens, com ênfase nos vasos sanguíneos, representam cortes histológicos da orelha direita 12 dias após a inoculação do tumor de Ehrlich de animais tratados com corados por hematoxilina-eosina e analisados em aumento de 400x. A: Grupo Controle; B: Grupo Ciclo; C: Grupo AG inicial; D: Grupo AG final e E: Grupo AG contínuo.

5.3.2 Efeito da AG sobre peso e o consumo de ração dos animais.

Não foram observadas alterações no peso e nem no consumo de ração dos animais tratados com Aminoguanidina nos três grupos em relação ao grupo Controle (Figura 35), no entanto o grupo Ciclo apresentou a maior diminuição de peso e o do consumo de ração.

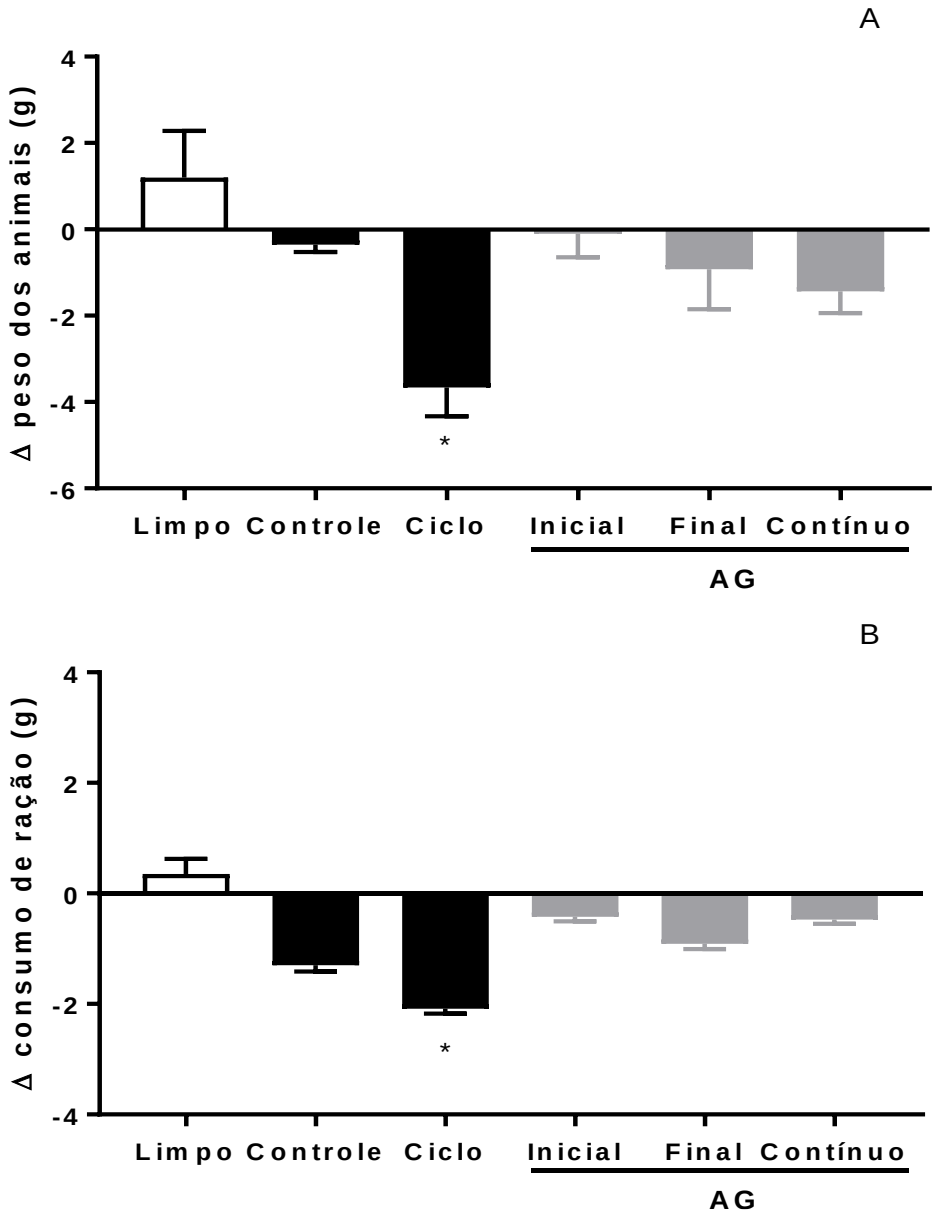



**Figura 35. Peso corporal e consumo de ração de animais portadores do tumor sólido de Ehrlich e tratados com Aminoguanidina.** Peso corporal (A) e do consumo de animais (B) de animais tratados com Aminoguanidina na dose de 100mg/kg, v.o. durante cinco primeiros dias a partir do segundo dia de inoculo (AG inicial), por cinco dias a partir do sétimo dia após o inoculo (AG final) ou por dez dias após o inóculo (AG contínuo). O Grupo limpo não foi inoculado com o tumor de ehrlich. O grupo controle foi inoculado o tumor e não recebeu tratamento e o grupo Ciclo foi inoculado o tumor tratado com ciclofosfamida na dose de 25mg/kg, i.p. * ($p<0,05$) em comparação ao grupo LIMPO. # ($p<0,05$) em comparação ao grupo CICLO.

5.3.3 O tratamento com aminoguanidina não altera parâmetros leucométricos dos animais portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida

O tumor de Ehrlich induziu leucocitose, sendo às custas do aumento do número de linfócitos, o que não foi revertido nas diferentes formas de tratamento com a aminoguanidina. A ciclofosfamida induziu leucopenia (Tabela 6).

**Tabela 6. Contagem global e diferencial de leucócitos no sangue de animais com TES tratados ou não com aminoguanidina.**

| Células ($x10^3/mm^3$) | GRUPOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Limpo | Controle | Ciclo | AG inicial | AG final | AG contínuo |
| **Leucócitos** | 3,2±0,6 | 6,9±1,9* | 0,9±0,4*# | 5,7±1,1* | 5,4±1* | 7,0±1,4* |
| **Neutrófilos** | 1,9±0,3 | 2,3±0,9 | 0,2±0,1* | 2,2±0,7 | 2,2±0,7 | 3,0±1 |
| **Linfócitos** | 1,3±0,2 | 3,9±1,4* | 0,6±0,3*# | 3,3±1* | 3,1±0,2* | 4,3±1* |
| **Monócitos** | 0,04±0,2 | 0,13±0,1 | 0,01±0,01 | 0,1±0,1 | 0,06±0,06 | 0,19±0,2 |

Os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia, sangue coletado para contagem de leucócitos totais e para o esfregaço sanguíneo que foram corados utilizando o kit Panótico e para feita contagem diferencial. Os valores representam média ± desvio padrão. *($p<0,05$) em comparação ao grupo Limpo. #($p<0,05$) em comparação ao grupo Ciclo.

5.3.4 O tratamento AG não altera a celularidade dos órgãos linfoides, no entanto o tratamento contínuo diminui o número de células do linfonodo

Não houve alteração do número de células da medula no grupo Controle e nos grupos tratados com AG entre si e nem relação ao grupo Limpo, sem tumor. A presença do tumor de Ehrlich aumentou o número de células do baço, sendo que os diferentes tratamentos com a AG não foram capazes de alterar este aumento. O tumor aumentou a celularidade do linfonodo drenante, havendo uma redução apenas nos grupos AG inicial e AG contínuo, sendo o AG contínuo ainda menor que o grupo AG final. O tratamento com a ciclofosfamida induziu aplasia medular e diminuição das células do baço e do linfonodo (Tabela 7).

**Tabela 7. Celularidade dos órgãos linfóides dos camundongos portadores de Tumor de Erhlich na forma sólida.**

| Órgãos linfoides (células) | GRUPOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Limpo | Controle | Ciclo | AG inicial | AG final | AG contínuo |
| **Medula óssea (x10$^6$/mL)** | 5,7±0,7 | 5,8±1,3***** | 1,9±0,7* | 6,4±1,2 $^{\#}$ | 7,6±0,7 $^{\#}$ | 7,6±0,8 $^{\#}$ |
| **Baço (x10$^8$ células)** | 1,4±0,3 | 2,6±0.5* | 0,4±0.18* | 3,1±0.4* | 3,1±0.2* | 2,4±0,3* |
| **Linfonodo (x10$^6$ células)** | 0,7±0,7 | 18,8±3,7*$^{\#}$ | 0 | 8,2±6,8* | 11,4±8,7* | 4.7±3.9 $^{@\#\&}$ |

Os camundongos foram eutanasiados no decimo segundo dia após o inóculo do tumor e feita a contagem das células do baço, linfonodo drenante e medula. Os dados foram expressos com média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. * p< 0,05 quando comparado ao grupo LIMPO. $^{\#}$ p< 0,05 quando comparado ao grupo Ciclo. @ p<0,05 quando comparado ao grupo Controle. & p< 0,05 quando comparado ao grupo AG final.

### 5.3.5 Perfil fenotípico das células do baço

#### 5.3.5.1 Efeito do tratamento da AG nos linfócitos T e suas subpopulações do baço

O tumor, bem como o tratamento com AG, não foi capaz de alterar a frequência relativa os linfócitos T, ao passo que o tratamento com a ciclofosfamida aumentou. Em contraste, o número absoluto de linfócitos T foi maior no grupo Controle, se mantendo com o tratamento com AG. O tratamento com ciclofosfamida diminuiu o número absoluto dos linfócitos T em relação a todos os grupos (Figura 36A).

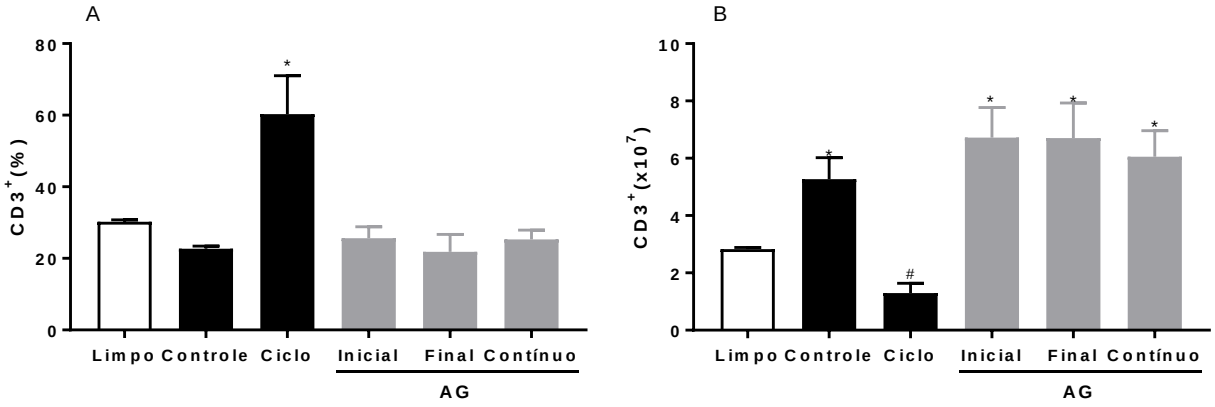



**Figura 36. Caracterização fenotípica dos linfócitos T do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG.** As células do baço foram obtidas dos animais com tumor de Ehrlich na orelha direita, tratados ou não com Aminoguanidina. Os esplenócitos foram obtidos após eutanásia e marcados com anticorpos anti-CD3 e foram analisadas as frequências relativas (A), frequências absolutas (B). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

A frequência da população de linfócitos T auxiliares nos animais com tumor foi menor em relação ao grupo Limpo, os tratamentos com AG mantiveram esses valores reduzidos (Figura A). Em contrapartida, o número absoluto destas células no grupo

Controle foi maior e o tratamento com AG manteve este aumento (Figura 37A e B). Nos animais tratados com ciclofosfamida a frequência relativa foi maior em relação aos demais, ao passo que o valor absoluto foi menor. Em relação a expressão do receptor co-estimulador CD28, apenas o grupo Ciclo apresentou a frequência relativa maior, ao passo que os números absolutos dos linfócitos T auxiliares que expressaram CD28 foi maior no grupo Controle, mantendo-se equivalente nos grupos tratados com AG (Figura 37C e D). Não houve diferença na expressão do CD28 entre os grupos (Figura 37E).

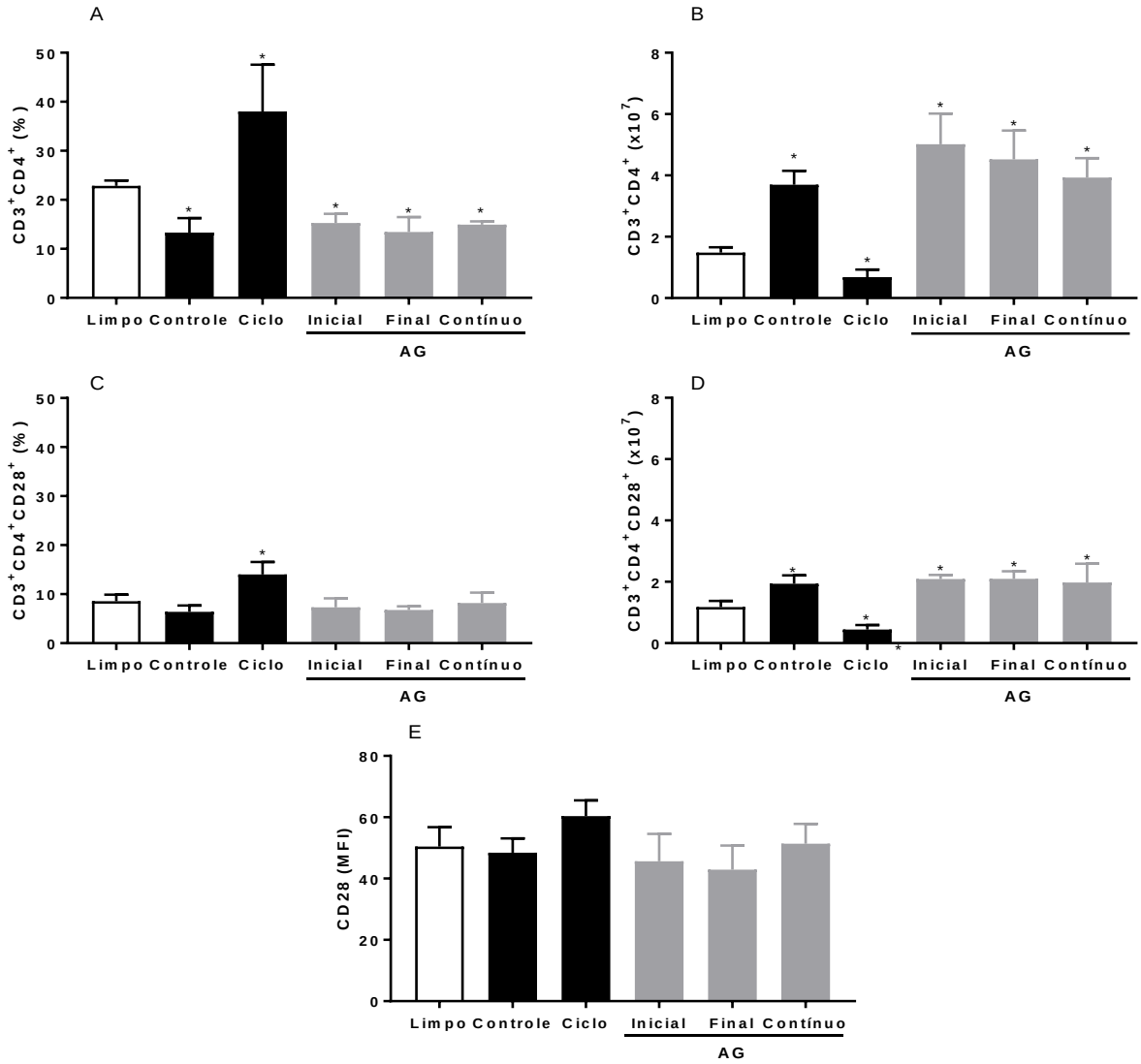



**Figura 37. Caracterização fenotípica dos linfócitos T auxiliares do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG.** As células do baço foram obtidas dos animais com tumor de Ehrlich na orelha direita, tratados ou não com Aminoguanidina. Os esplenócitos foram obtidos após eutanásia e marcados com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD28 e foram analisadas as frequências relativas (A e C), frequências absolutas (B e D) e a média da intensidade de fluorescência do CD28 (E). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

A frequência relativa dos linfócitos T citotóxicos no grupo Controle foi menor que no grupo Limpo, bem como os grupos tratados com AG. Por outro lado, a frequência relativa do grupo Ciclo foi maior (Figura 38A). Apenas o grupo Ciclo possuiu menor número absoluto dos linfócitos T citotóxicos (Figura B). Em relação a expressão do receptor co-estimulador CD69 por estas células, não foi observada alteração na frequência relativa, no entanto o número absoluto das células que a expressaram foi maior nos grupos Controle e tratados com AG (Figura 38C e D). Não houve diferença na expressão média do CD69 entre os grupos (Figura 38E)

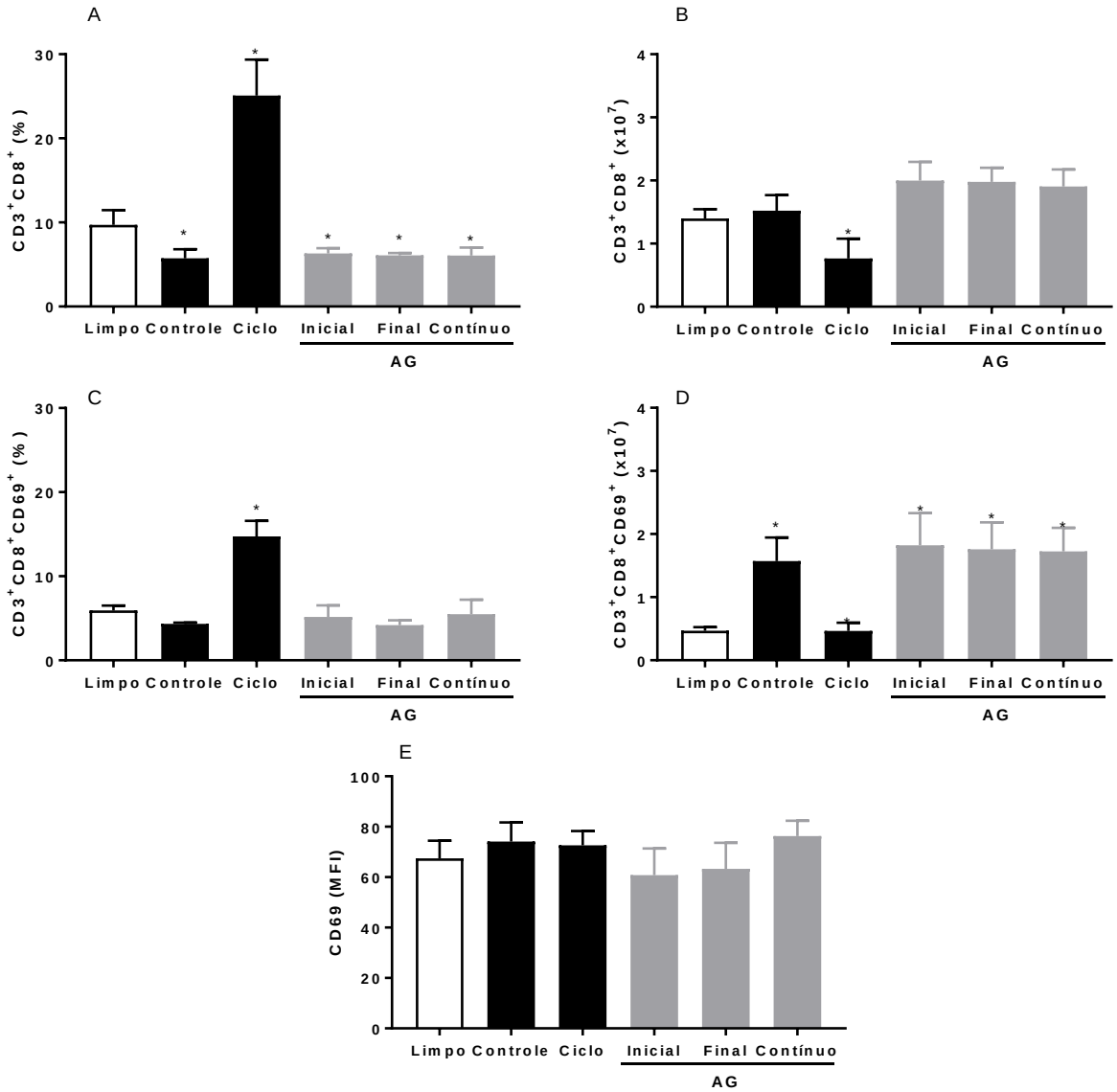



**Figura 38. Caracterização fenotípica dos linfócitos T citotóxicos do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG.** As células do baço foram obtidas dos animais com tumor de Ehrlich na orelha direita, tratados ou não com Aminoguanidina. Os esplenócitos foram obtidos após eutanásia e marcados com anticorpos anti-CD3, anti-CD8 e anti-CD69 e foram analisadas as frequências relativas (A e C), frequências absolutas (B e D) e a média da intensidade de fluorescência do CD28 (E). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

5.3.5.2 Efeito do tratamento da AG nos linfócitos B do baço

A presença do tumor, bem como o tratamento com AG, não alterou a frequência relativa e nem absoluta dos linfócitos B Iale positivos do baço em relação ao grupo Limpo, ao passo que o tratamento diminuiu ambos parâmetros. Em relação à média de expressão do Iale pelos linfócitos B, não houve diferença entre os grupos (Figura 39).

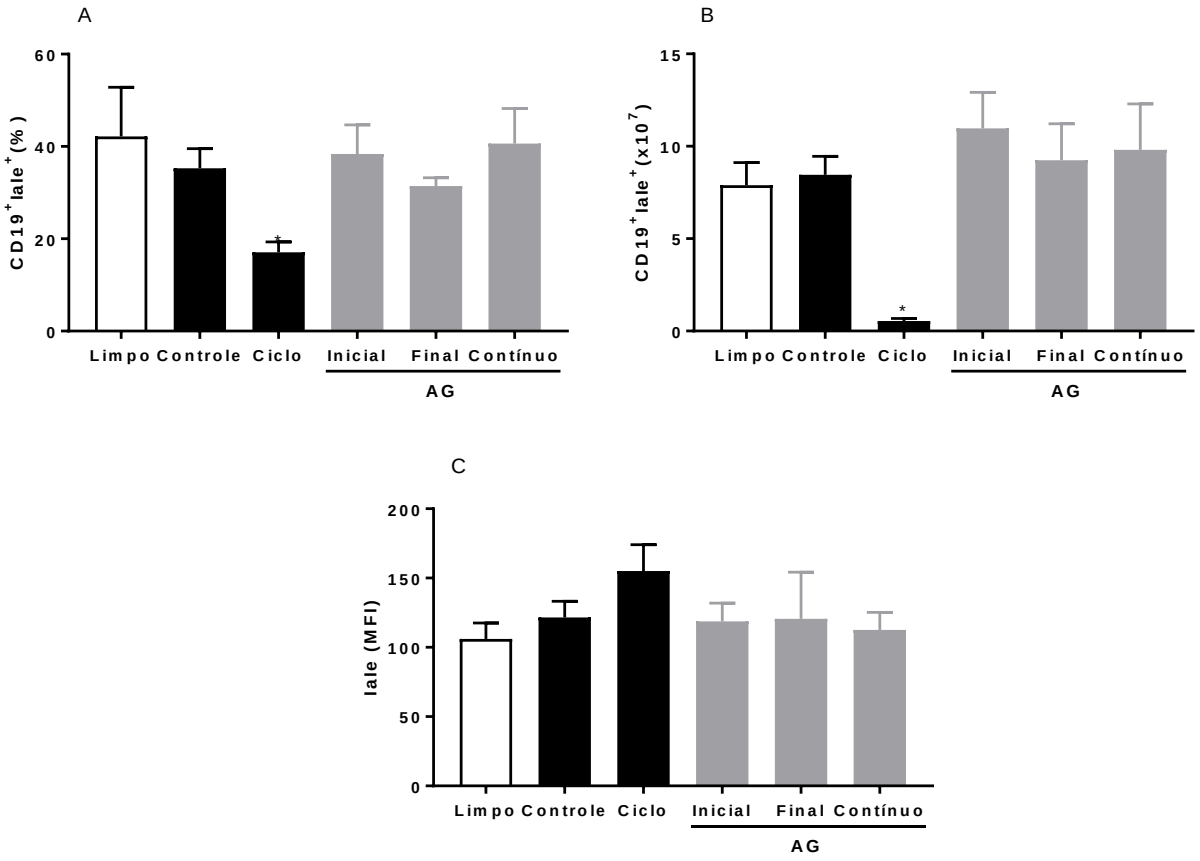



**Figura 39. Caracterização fenotípica dos linfócitos B do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG.** As células do baço foram obtidas dos animais com tumor de Ehrlich na orelha direita, tratados ou não com Aminoguanidina. Os esplenócitos foram obtidos após eutanásia e marcados com anticorpos anti-CD19 e anti-Iale e foram analisadas as frequências relativas (A), frequências absolutas (B) e a média da intensidade de fluorescência do Iale (C). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

5.3.5.3 O tratamento com AG aumenta o número de macrófagos do baço dos animais portadores do tumor sólido de Ehrlich

A frequência relativa de macrófagos F4/80$^{+}$IaIe$^{+}$ não foi alterada pela presença do tumor e nem com o tratamento com AG (Figura 40A). Por outro lado, o tumor promoveu o aumento do número absoluto destes macrófagos em relação ao grupo Limpo, sendo este aumento intensificado pelas três formas tratamento com AG, não sendo diferentes entre si. O tratamento com a ciclofosfamida diminuiu o número absoluto dos macrófagos do baço em comparação aos demais grupos (Figura 40B). Não foi observado diferença na média de expressão do IaIe (Figura 40C).

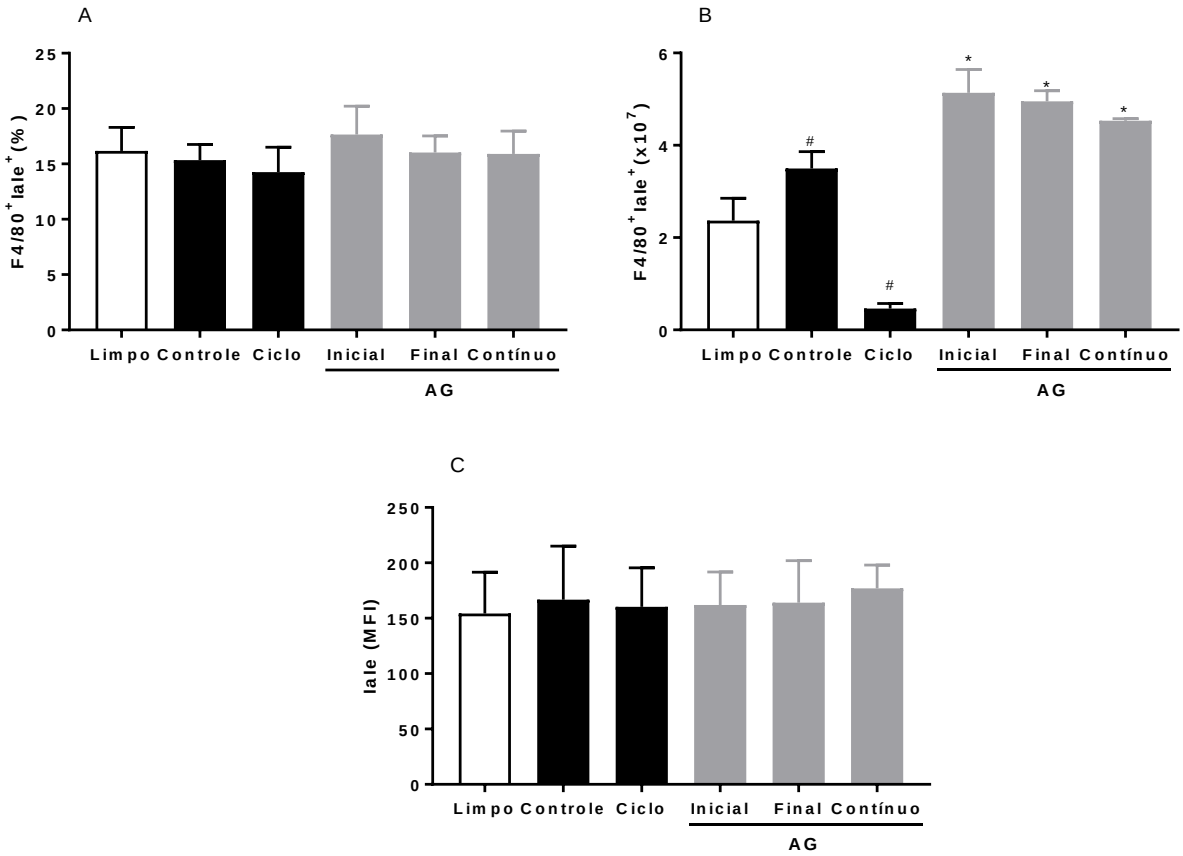



**Figura 40. Caracterização fenotípica dos macrófagos do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG.** As células do baço foram obtidas dos animais com tumor de Ehrlich na orelha direita, tratados ou não com Aminoguanidina. Os esplenócitos foram obtidos após eutanásia e marcados com anticorpos anti-F4/80 e anti-IaIe e foram analisadas as frequências relativas (A), frequências absolutas (B) e a média da intensidade de fluorescência do IaIe (C). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

5.3.5.4 Efeito do tratamento com AG em células NK do baço de animais portadores de tumor sólido de Ehrlich

O tumor promoveu o aumento da frequência relativa das células NK do baço. Os tratamentos com AG não apresentaram diferença entre si e nem em relação ao grupo Controle (Figura 41A). O mesmo padrão foi observado em relação ao número absoluto destas células, com o aumento no grupo Controle em relação ao grupo Limpo e os grupos de tratamento com AG sem diferença ao grupo Controle (Figura 41B). O grupo Ciclo apresentou aumento na frequência relativa, no entanto não foi diferente no número absoluto em comparação ao grupo Limpo e menor comparação aos demais grupos. Em relação a expressão média dos marcadores CD49b e NK1.1, apenas o grupo Ciclo apresentou menor expressão de ambos os marcadores em relação aos outros grupos (Figura 41C e D).

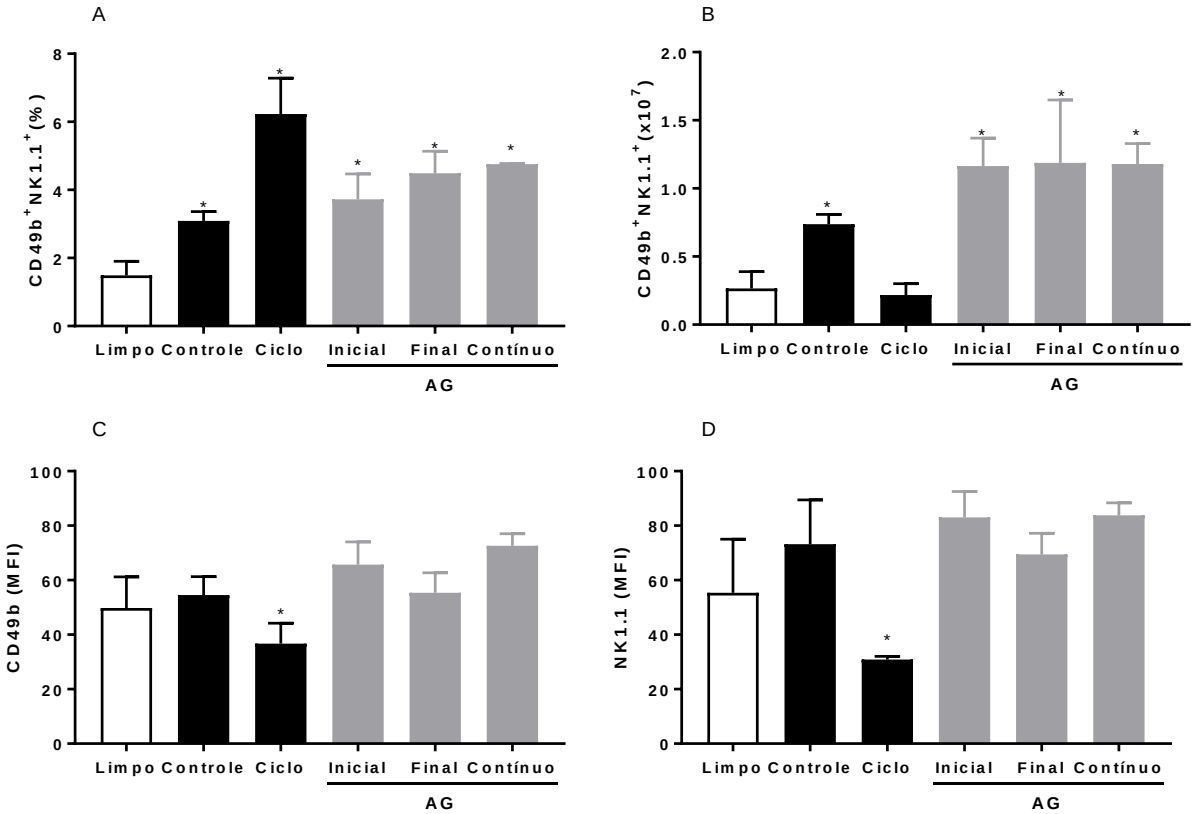



**Figura 41. Caracterização fenotípica das células NK do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG.** As células do baço foram obtidas dos animais com tumor de Ehrlich na orelha direita, tratados ou não com Aminoguanidina. Os esplenócitos foram obtidos após eutanásia e marcados com anticorpos anti-CD3, anti-CD49b e anti-NK1.1 e foram analisadas as frequências relativas (A), frequências absolutas (B) e a média da intensidade de fluorescência do CD49b (C) e NK1.1 (D). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

5.3.5.5 Efeito do tratamento com AG em células NKT do baço de animais portadores de tumor sólido de Ehrlich

A presença do tumor não promoveu alteração na frequência relativa e nem no número absoluto das células NKT, bem como as três formas de tratamento com a AG. O tratamento com a ciclofosfamida aumentou a frequência relativa das células NKT, ao passo que o número absoluto destas células foi menor em comparação ao demais grupos. Não foi observada alteração na média de expressão dos marcadores CD49b e NK1.1 nas células NKT (Figura 42).

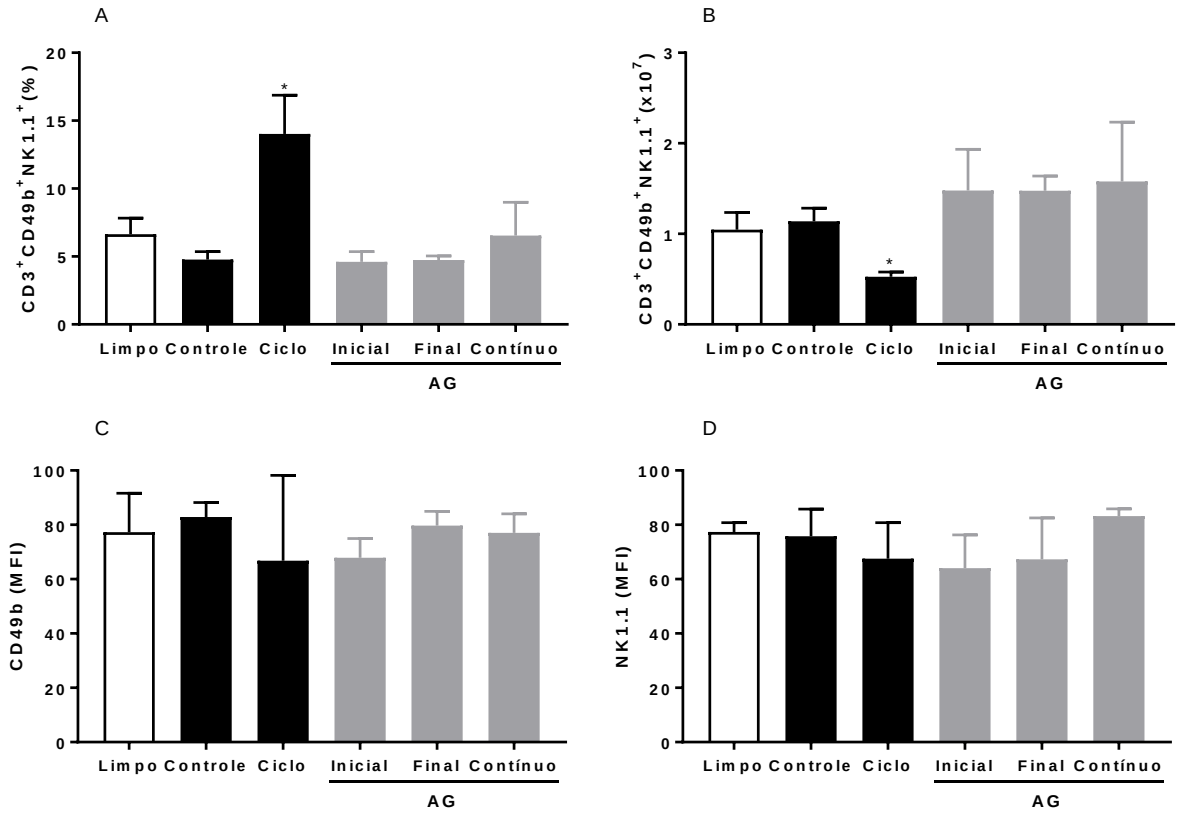



**Figura 42. Caracterização fenotípica das células NKT do baço de camundongos portadores ou não de TES e tratados ou com AG.** As células do baço foram obtidas dos animais com tumor de Ehrlich na orelha direita, tratados ou não com Aminoguanidina. Os esplenócitos foram obtidos após eutanásia e marcados com anticorpos anti-CD3, anti-CD49b e anti-NK1.1 e foram analisadas as frequências relativas (A), frequências absolutas (B) e a média da intensidade de fluorescência do CD49b (C) e NK1.1 (D). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

5.3.6 Efeito do tratamento com AG na concentração de citocinas no soro e no sobrenadante da cultura de células do baço

Não houve diferença na concentração de IL-6 no soro e nem no sobrenadante da cultura das células do baço (Figura 43A e B). A presença do tumor promoveu o

aumento da concentração de MCP-1 tanto no soro quanto no sobrenadante das células esplênicas, não sendo alterado pelo tratamento com ciclofosfamida e pelas três formas de tratamento com AG (Figura 43C e D). Em relação a concentração de TNF, a presença do tumor promoveu o aumento de TNF tanto no soro como no sobrenadante, sendo que os tratamentos com AG não promoveram alterações, ao passo que o tratamento com ciclofosfamida diminuiu (Figura 43E e F). Não foram detectas as citocinas IL-10, IL-12p70 e IFN-γ.

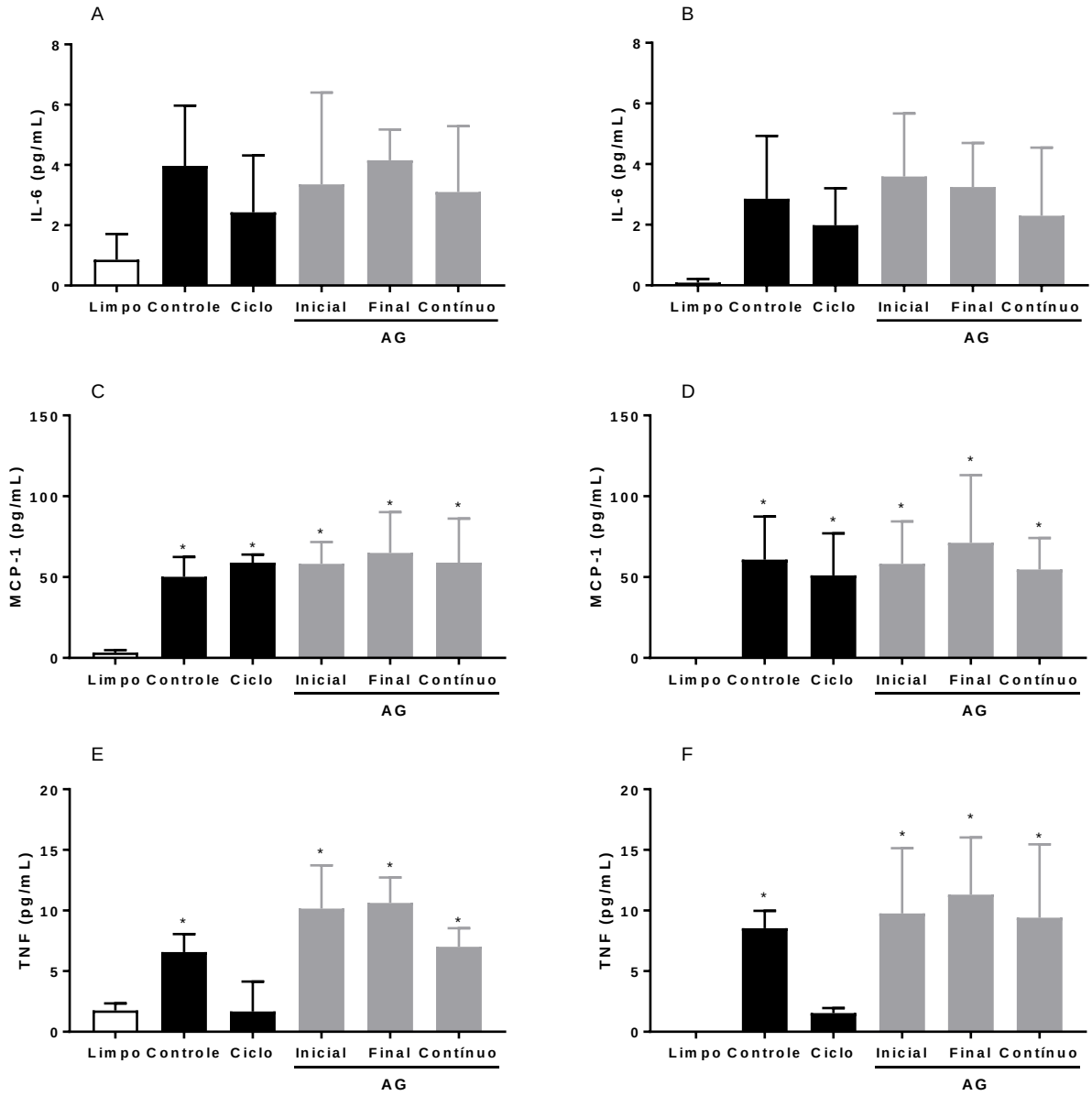



**Figura 43. Efeito do tratamento com AG na concentração de citocinas no soro e no sobrenadante da cultura de células do baço de animais com tumor sólido de Ehrlich.** Concentração das citocinas IL-6, MCP-1 e TNF no soro (A, C e E) e no sobrenadante da cultura das células do baço (B, D e F) de animais portadores do tumor sólido de ehrlich. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das médias. * para p<0,05. Teste t de Student.

5.3.7 O tratamento com AG não altera a celularidade do peritônio dos animais

O tumor de Ehrlich na orelha não foi capaz de alterar o número das células peritoneais nem o tratamento com AG. O tratamento com ciclofosfamida diminuiu o número de células do peritônio (Figura 44A). O tumor promoveu o aumento da produção de peróxido de hidrogênio pelas células peritoneais, no entanto não houve alteração quando estimuladas com PMA. Os diferentes tempos de tratamento com AG e o tratamento com a ciclofosfamida não foram capazes de alterar a produção de peróxido em comparação ao grupo Controle e nem quando estimuladas pelo PMA (Figura 44B).

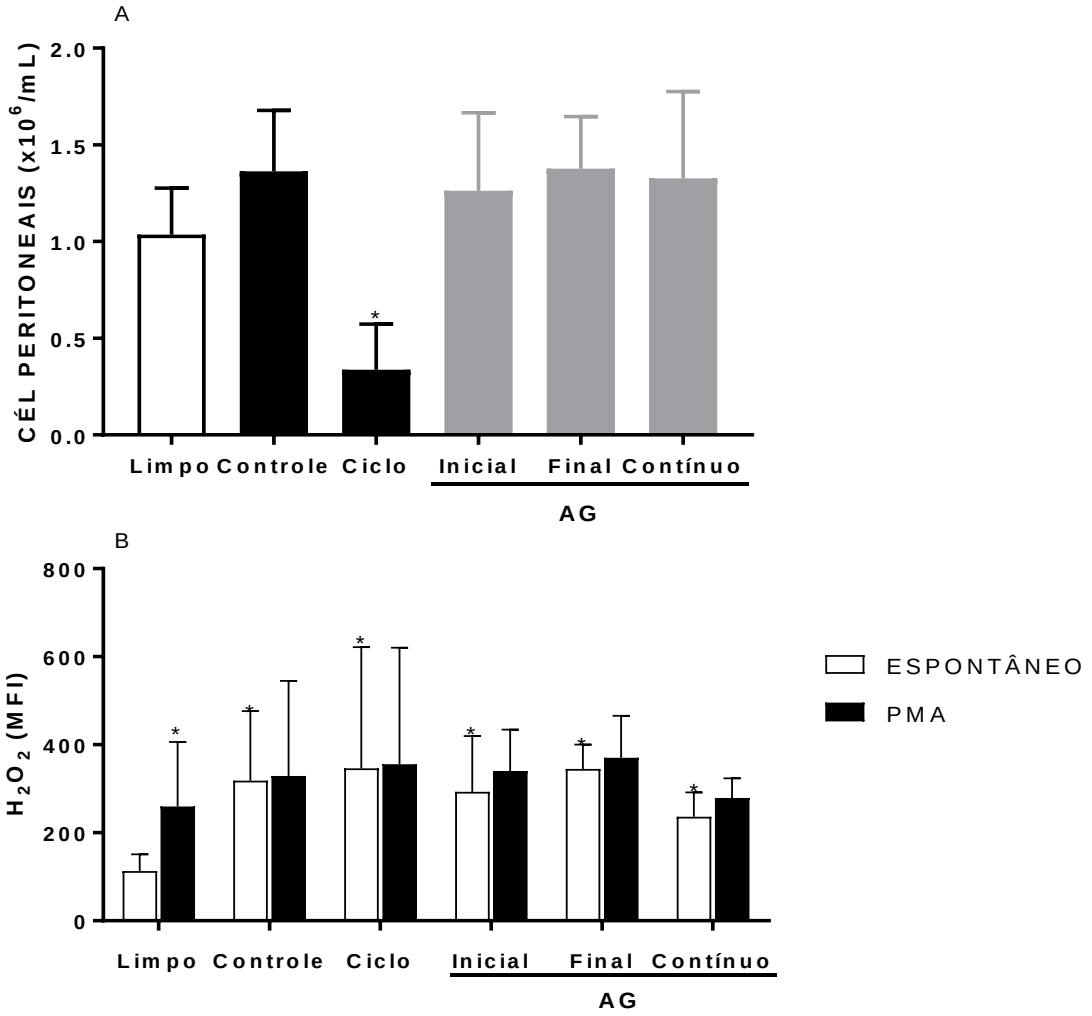



**Figura 44. Efeito do tratamento com AG sobre o número de células do peritônio e produção de peróxido em animais com tumor de Ehrlich**. Os camundongos foram eutanasiados no decimo segundo dia após o inóculo do tumor, feita a coleta das células peritoneais. Os dados foram expressos com média ± desvio padrão. A* p< 0,05 quando comparado aos demais grupos. B* p< 0,05 quando comparado ao grupo LIMPO espontaneo.

5.4 Efeito do inibidor da iNOS sobre a sobrevida de animais portadores do TAE

Não foram observadas alterações no peso e nem na circunferência dos animais tratados com Aminoguanidina nos três grupos em relação ao grupo Controle (Figura 45). Os animais do grupo Ciclo diminuíram o peso a partir do dia 6 de observação em relação aos outros grupos. A circunferência abdominal do grupo Ciclo não aumentou em relação aos outros grupos.

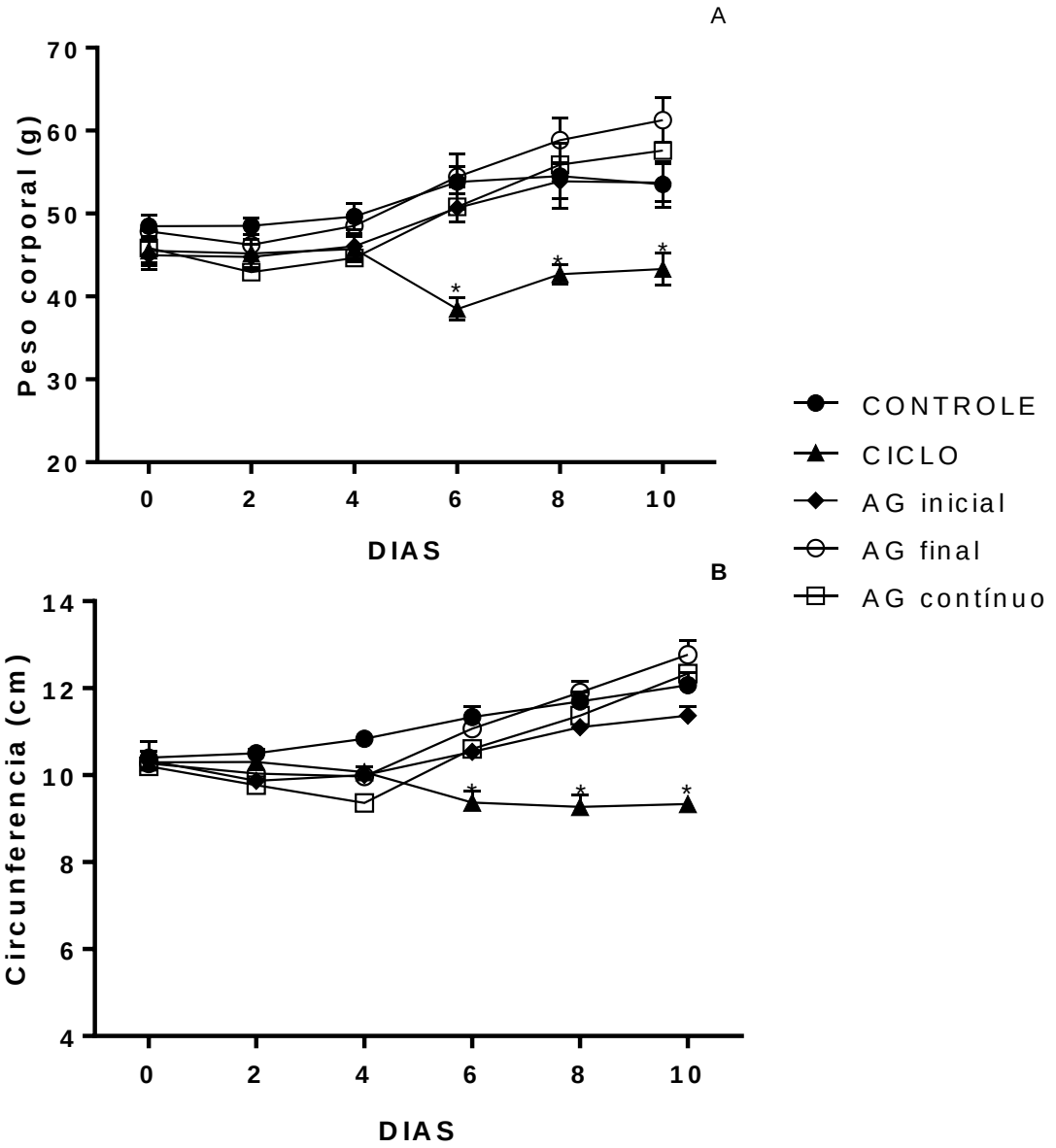
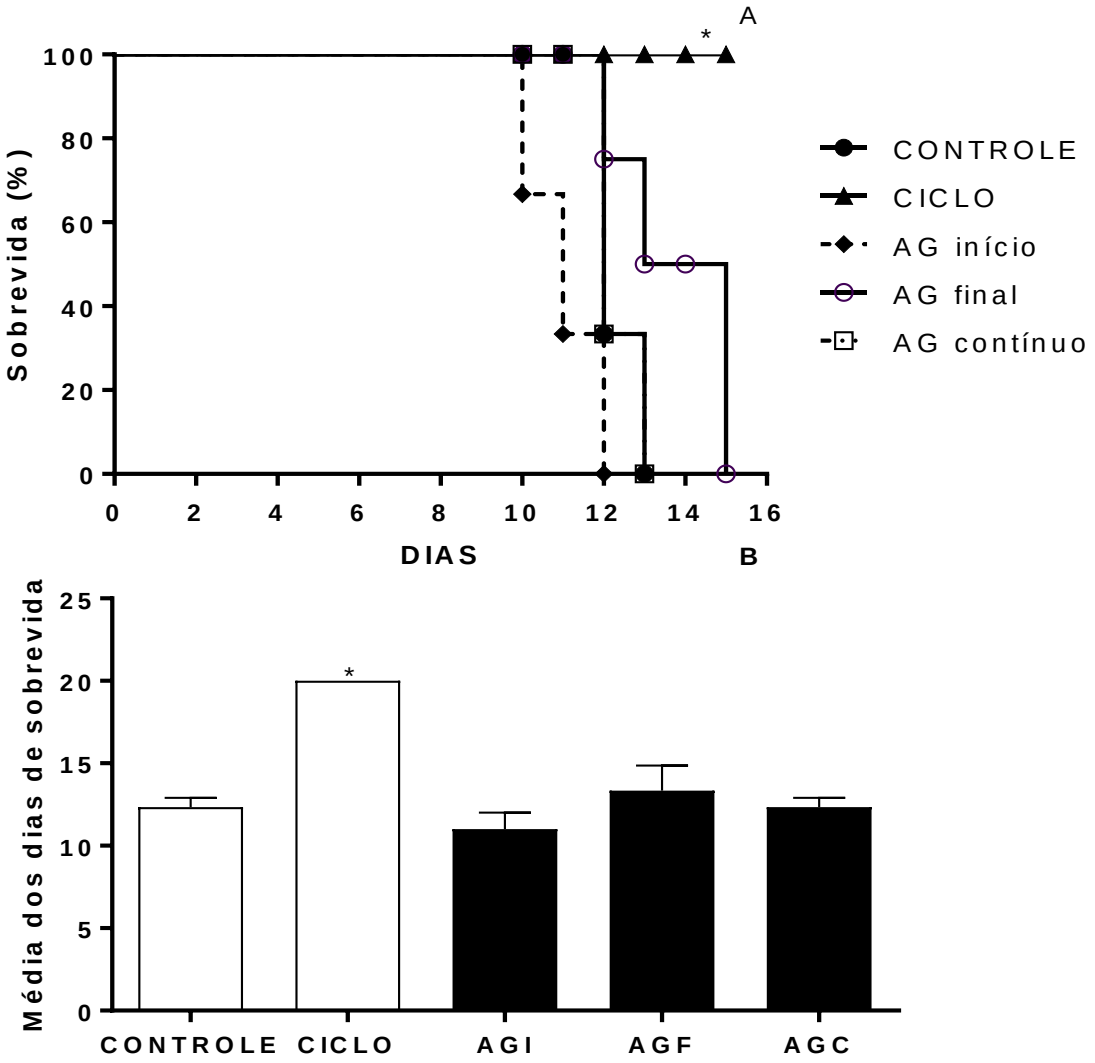



**Figura 45. Peso corporal e circunferencia abdominal de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com Aminoguanidina.** Peso corporal (A) e medida da circunferência abdominal (B) de animais tratados com Aminoguanidina na dose de 100mg/kg, v.o. durante cinco primeiros dias a partir do inoculo (AGI), por cinco dias a partir do 5º dia após o inoculo (AGF) ou por dez dias após o inóculo (AGC). O grupo CONTROLE não recebeu tratamento e o grupo CICLO foi tratado com ciclofosfamida na dose de 25mg/kg, i.p. * ($p<0,05$) em comparação ao grupo CICLO.

Todos os animais do Grupo Controle morreram até o 12º dia após inóculo do tumor, ao passo que, no Grupo Ciclo não houve morte até o 20° dia de acompanhamento. O tratamento com a aminoguanidina na dose de 100 mg/kg, nos três diferentes períodos, não foi capaz de alterar a sobrevida (FIGURA 46A e B), porém o tratamento final aumentou a sobrevida em 8% o percentual da expectativa de vida (FIGURA 46C) dos animais com tumor ascítico de Ehrlich.




**C**

| **PARÂMETRO** | CONTROLE | CICLO | AGI | AGF | AGC |
|---|---|---|---|---|---|
| %ILS | - | 62,2 | -10,8 | 8,1 | 0,0 |

**Figura 46. Curva de sobrevida (*Kaplan-Maier*) (A), media de sobrevida (B) e expectativa de vida (% ILS) (C) de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com aminoguanidina.** Os animais foram tratados com Aminoguanidina na dose de 100mg/kg, v.o. durante cinco primeiros dias a partir do inoculo (AGI), por cinco dias a partir do 5º dia após o inoculo (AGF) ou por dez dias após o inóculo (AGC). O grupo CONTROLE não recebeu tratamento e o grupo CICLO foi tratado com ciclofosfamida na dose de 25mg/kg, i.p. * ($p<0,05$) em comparação ao grupo CICLO.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a inibição *in vitro*, pela Aminoguanidina (AG), da síntese de NO pela iNOS de macrófagos induzidos para o perfil M1 promoveu a acentuação da polarização, associadas ao aumento da expressão dos receptores co-estimuladores CD80 e CD86, da produção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-6, MCP-1 e TNF, acompanhadas curiosamente com aumento da expressão da própria enzima alvo, iNOS, e o aumento da produção da citocina reguladora IL-10. Tal fenômeno se mostrou reversível com a diminuição da expressão dos receptores co-estimuladores, da própria enzima alvo e das citocinas inflamatórias, após a retirada do inibidor e a retomada da produção de NO.

Tendo em vista o efeito da inibição da iNOS em macrófagos M1 e papel desempenhado por estas células e pelo NO na fisiopatologia de tumores, realizamos o tratamento com inibidor em camundongos Swiss portadores da forma sólida e ascítica do tumor de Ehrlich, em diferentes tempos após a indução do tumor. Em relação a forma sólida, o tratamento se mostrou eficaz quando realizado logo após a inoculação do tumor, associado a redução da área de crescimento do tumor e ausência da angiogênese. Em contrapartida, a inibição não se mostrou eficaz em prolongar a sobrevida dos animais portadores do tumor na forma ascítica.

O estudo da polarização de macrófagos em processos inflamatórios e no microambiente tumoral é emergente frente ao crescente conhecimento sobre a plasticidade destas células (MANTOVANI; SICA, 2010; LABONTE, 2014) e sua interferência direta ou indireta na orquestração da resposta imunológica (MARTINEZ; GORDON, 2014).

Já é conhecido que o tratamento oral com AG em camundongos, inoculados com tumor sólido, inibe de forma sistêmica a iNOS, inibindo a produção de NO e retardando o crescimento do tumor (REIS, 2009; 24). Os resultados encontrados por Reis e Mohamad et al divergem do papel inibitório do NO contra células tumorais L929, encontrados por Nascimento et al (2015).

Destarte a ação direta do NO sobre as células tumorais e as funções anti-apoptóticas e anti-angiogênicas da AG (SALVUCCI et al.; 2001 NAM et al., 2005), relacionando de forma positiva ou negativa a ação do NO sobre o crescimento ou inibição de células tumorais (LECHNER et al., 2005), o presente estudo pretendeu

entender a ação da inibição da iNOS sobre a polarização dos macrófagos, fato que poderia alterar a relação destes com o microambiente tumoral, levando ao controle do crescimento do tumor, num mecanismo de modulação da resposta imune.

Em relação à produção de NO, sabe-se que macrófagos ativados com LPS ou IFN-γ (M1) produzem iNOS que agirá na conversão da L-arginina em NO e citrulina (RATH et al., 2014). Optou-se por utilizar a AG visto que é um inibidor seletivo da iNOS, estruturalmente semelhante a L-arginina, bem como por já ter sido utilizado em experimentos anteriores (WOLFF et al., 1997). Os resultados obtidos mostram que a concentração de 1mM é capaz de inibir a produção de NO, sem alterar a viabilidade dessas células, servindo então de norteamento para os experimentos seguintes.

Inicialmente, decidiu-se investigar a influência da inibição da iNOS sobre polarização de macrófagos não ativados (M0). Não houve diferença entre os grupos M0 que receberam ou não AG em relação à produção de citocinas inflamatórias e em relação à expressão de marcadores de superfície (CD80), ou seja, a inibição da atividade da iNOS pela AG não promove a polarização dessas células para um perfil inflamatório. Em relação a IL-10, as células tratadas somente com AG não produziram essa citocina, o que mostra que essas não têm uma característica funcional que justifique uma polarização para M2. Em relação aos marcadores de superfície, a não identificação do receptor de manose, encontrado em macrófagos M2, poderia dar um resultado mais fidedigno, apesar de não ser encontrado na literatura estudos que demonstrem a polarização para um perfil M2 apenas com a inibição da iNOS.

Tendo-se caracterizado as citocinas produzidas pelas células e a concentração ideal de AG, investigou-se o papel da inibição da iNOS em células estimuladas para os perfis M1 e M2 separadamente. Em relação ao grupo M1, nossos resultados corroboram com os achados de outros estudos (LU et al., 2015), onde observamos que a inibição da iNOS nessas células promoveu a intensificação na diferenciação das mesmas, tanto na produção de citocinas inflamatórias (IL-6) como na média de intensidade de fluorescência dos marcadores de superfície (CD80). Estímulos como LPS e IFN-γ aumentam a expressão do CD80, uma glicoproteína de membrana que funciona como coestimuladora para a ativação de células T. A expressão dessas proteínas tem sido relacionada com a redução de alguns tumores como o de mama

(LI et al., 2010; BOZEMAN et al., 2016; SI et al., 2017). Os resultados encontrados mostraram aumento da expressão desses marcadores, após cultura de células M1 com a AG, apresentando assim células mais efetivas na estimulação de células T e na prevenção da progressão tumoral.

Curiosamente, as células estimuladas para o perfil M1 e cultivadas com AG passaram a produzir também IL-10. Esse é um fato interessante, uma vez que as células continuam produzindo citocinas inflamatórias e expressando marcadores como o CD80, ou seja, a inibição da iNOS não polarizou esta célula para um perfil anti-inflamatório, apesar da produção isolada de IL-10. Em relação ao papel dessa citocina sobre o realce na ativação dessas células, já foi constatado que a expressão do mRNA de IL-10 não varia em macrófagos nocauteados ou não para a iNOS e estimulados para o perfil M1 (LU et al., 2015), indicando que a exacerbação na diferenciação de macrófagos M1 que sofreram a inibição da iNOS independe dos efeitos da IL-10.

Apesar de ser produzida classicamente por células do tipo M2, a literatura mostra que a síntese de IL-10 pode ser regulada pelo NFκB, em macrófagos M1, onde reguladores de transcrição mantém um alto limiar de indução da produção de IL-10 por essa via. A inibição desses reguladores e a ativação de TLRs, irrompe a produção dessa interleucina, sem, no entanto, alterar a produção de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF-α (SØNDERGAARD et al., 2015). Uma vez que as células estimuladas para M1 e tratadas com AG continuam produzindo citocinas inflamatórias, a produção de IL-10 encontrada nesse estudo pode estar relacionada com a via do NFκB.

Ademais, Lopes et al demonstraram que macrófagos cultivados com LPS podem cursar com a produção de IL-10, tendo o TNFα como importante indutor da expressão gênica e produção desta citocina (LOPES et al., 2010). Uma das formas da IL-10 inibir a síntese de citocinas inflamatórias é através da inibição da STAT1 pela STAT3, proteína produzida após a fosforilação de janus quinase, induzida pela IL-10 (DENNIS et al., 2013; DALLAGI et al., 2014).

Nesse sentido, a produção de NO pode estar relacionada com o bloqueio da produção de IL-10. Associado à inibição da produção de NO, a liberação exacerbada de citocinas inflamatórias induziu a produção desta citocina anti-inflamatória a fim de

controlar a superativação dessas células. Esse achado corrobora com os resultados de Gerard et al que observaram o papel protetor da IL-10 em processos inflamatórios exacerbados, demonstrando a capacidade da mesma em controlar a produção exacerbada de TNF-α em choque tóxico induzido em camundongos (GERARD et al., 1993).

Em relação à resposta anti-tumoral da IL-10, é importante frisar que apesar de encontrada em alguns tumores, pode ser um indicador de uma resposta inflamatória potente ao invés de imunossupressão. Mumm et AL. estudaram as propriedades antitumorais da IL-10 em modelos tumorais de camundongos, constatando a indução de mecanismos antitumorais como infiltração e ativação de células T citotóxicas, expressão de IFN-γ e apresentação de antígenos tumorais. Já a deficiência de IL-10 levou à vigilância imune tumoral enfraquecida, enquanto que a sobreexpressão de IL-10 protegeu os camundongos da carcinogênese (MUMM et al., 2011).

Posto isso, nossos resultados demonstraram que a iNOS é capaz de inibir a ativação de macrófagos M1 num mecanismo dependente de NO. Sugere-se então que a produção de NO pode controlar a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos classicamente ativados, revelando um curioso mecanismo para a modulação da diferenciação de macrófagos M1. Em conformidade com esses resultados, Giordano et al. (2010) mostraram a expressão amplificada de citocinas inflamatórias como TNF-α, IL-6 e IL-12p70 em células dendríticas não produtoras de iNOS, indicando a capacidade da iNOS em modular a produção de citocinas em células do sistema imune inato.

Após ter observado o realce na ativação de macrófagos M1 posterior à inibição da produção de NO, investigou-se a ação do mesmo sobre a síntese de iNOS, que em células Raw 264.7 ocorre, intracelularmente, em duas formas como um monómero e como um dímero. A forma monomérica possui atividade da redutase do citocromo c, mas não consegue reduzir o oxigênio (atividade da NADPH oxidase) ou sintetizar citrulina e NO. A forma dimérica da enzima exibe as três atividades (FORSTERMANN; MUNZEL, 2006; RAFIKOV et al., 2011).

Foi observado que a AG não inibe na síntese da enzima e curiosamente, a síntese de iNOS é amplificada em macrófagos M1 que receberam a droga. Wolff et al. (1997) observaram que macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS e IFN-γ tratados

com 1mM de AG perderam cerca de 99% da sua capacidade de produção de citrulina, no entanto a atividade redutase do citrocomo c permaneceu inalterada e que retomam a produção de citrulina e NO após a retirada da AG do sistema.

A retomada na produção de NO, também observada em nossos experimentos após da retirada do inibidor, se dá pelo fato de que o mecanismo de inibição da AG ocorre através sua conversão intracelular pelos dímeros de iNOS, mas não pelos monômeros da enzima, em intermediários que inativam a enzima. Na ausência da AG e na presença da L-arginina os monômeros de iNOS podem formar novos dímeros funcionais de iNOS iniciando a produção de NO, no qual pode ser limitada pela concentração de monômeros disponíveis no citoplasma (CHEN et al., 2002). Dessa forma, apesar da inibição da iNOS pela AG ter inibido a produção de NO, as células continuam produzindo a enzima, inclusive em maior quantidade que as células que não tiveram a produção de NO cessada. Isso demonstra o papel supressor do NO também na síntese da iNOS.

Heinecke et al (2014) observaram resultado diferente utilizando AG 1mM em células de tumor de mama MDA-MB-231, relatando a relação positiva da produção de NO com a expressão de iNOS. Apesar de não ter sido utilizada imunofenotipagem em seus experimentos, a relação da síntese de iNOS com o NO em células tumorais pode ter mecanismos distintos das células Raw 264.7.

Durante a resposta imune, os macrófagos são a principal fonte de NO sintetizado. Os macrófagos podem limitar o crescimento tumoral, não só devido à produção de NO, mas também através de outros mecanismos, como o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, a atividade dos radicais livres ou a apresentação do antígeno tumoral e a ativação de linfócitos auxiliares e citotóxicos. (LUM et al., 2006; GRIVENNIKOV et al., 2010).

Ao avaliar os animais portadores da forma sólida do tumor de Ehrlich tratados com AG, foi observado logo após o inóculo tumoral, o retardamento do crescimento do tumor inoculados tanto na pata quanto na orelha a partir do 8º dia. Porém, o crescimento do tumor dos animais, em ambos locais de inoculação, tratados tardiamente foi semelhante ao dos animais não tratados. Esse retardo no desenvolvimento do tumor sólido pode estar relacionado à ação inibitória da AG sobre a iNOS, uma vez que esta droga não apresentou citotoxicidade *in vitro* sobre as

células do tumor de Ehrlich nas mesmas concentrações utilizadas nos macrófagos Raw 264.7.

Deryagina et al. (2015) evidenciaram o crescimento contínuo das concentrações de NO e de seus produtos nas três primeiras semanas do desenvolvimento do TSE e Nishikawa et al (2004) verificaram que o TES não consegue crescer em camundongos deficiente de iNOS, demonstrando que esta enzima tem uma relação importante no desenvolvimento desse tumor.

O NO catalisado por essa isoenzima tem um papel chave durante o processo de angiogênese tumoral, principalmente, hiper-regulando a expressão de VEGF (COOKE; LOSORDO, 2002; GHOSH et al., 2004; PINTO et al., 2009). Interessantemente, ocorreu a redução dos vasos sanguíneos tanto nos grupos tratados com AG no início do desenvolvimento tumoral, com redução da espessura da pata com tumor e da área do tumor na orelha, como os grupos tratados tardiamente, que não apresentou alteração significativa, indicando que, ambos os tratamentos tenham inibido a síntese de NO e consequentemente o processo de angiogênese.

É sabido que durante o desenvolvimento tumoral a iNOS é expressa tanto nas células malignas como em células normais (FUKUMURA et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2015). À medida que essas células malignas proliferam, também aumenta a expressão dessa enzima (XU et al., 2002). Logo, a diminuição na formação de novos vasos ocasionada pelo bloqueio da iNOS no início do processo de instalação do tumor pode ser mais eficiente que quando feita tardiamente, visto muitos vasos já terem sido formados antes do tratamento.

Pela análise histopatológica, não foi observada alterações no influxo de infiltrado inflamatório entre os grupos tratados nos diferentes tempos de tratamento com o inibidor. Tal fenômeno pode estar relacionado com a produção de iL-10 pelos super macrófagos M1, apesar da alta produção de citocinas pro-inflamatória no local do tumor, uma vez que não se observou alterações sistêmicas das concentrações de IL-6, TNF-α e MCP-1 no soro. Ao passo que Patrício et al (2008) observaram que o aumento da espessura da pata de camundongos infectados com *Leishmania amazonenzis* após tratamento com extrato de *Chenopodium ambrosiodes* era uma associação entre a infecção e a atividade pró-inflamatória do extrato.

Também foram observadas extensas áreas de necrose nos cortes histológicos, principalmente quando o tratamento foi feito precocemente. De fato, sabendo que a taxa de crescimento tumoral é muito alta; a hipóxia e a redução de nutrientes, devido à inibição indireta da angiogênese tumoral pela AG, deve ter induzido a morte das células tumorais por necrose (DE ASSIS, 2007).

Apesar de não ter sido observada alteração na celularidade da medula, já foi demonstrado que durante o desenvolvimento do tumor de Ehrlich ocorre drástica redução no número de Unidades Formadoras de Colônicas de Granulócitos e Monócitos (CFU-GM) e na celularidade da medula óssea, efeitos estes que concorrem para a falência do sistema imune do hospedeiro (JUSTO et al., 2000; VALADARES et al, 2002).

Já foi observado que essa hipoplasia está, geralmente, associada com uma intensa esplenomegalia, que entre outros fatores, está associada a uma hematopoiese extramedular (DE ASSIS, 2007; VALADARES et al., 2002).

Tanto a diminuição no número de CFU-GM da medula óssea quanto o progressivo aumento desses precursores no baço tem sido atribuída, entre outros fatores, o aumento da angiogênese tumoral promovida pelo VEGF e ocasionando um desequilíbrio hematopoiético (GABRILOVICH et al., 1998). Interessantemente, nesse trabalho, apesar de que não foi observada alterações na celularidade da medula, o tumor promoveu esplenomegalia, não sendo alterado pelo tratamento com AG.

Numa análise mais minuciosa das células do baço, não observamos alterações pelo tratamento com a AG no número de linfócitos T e suas subpopulações, de linfócitos B, de células NK e NKT em comparação ao grupo com tumor sem tratamento. Ao passo que houve o aumento no número de macrófagos $F480^{+}Ia^{+}$, o que não levou ao aumento da produção de citocinas inflamatórias na cultura das células do baço, podendo este aumento ser reflexo dos produtos quimiotaticos induzidos pelo tumor.

Foi observado o aumento da celularidade do linfonodo drenante, além da migração de células para o microambiente tumoral e proliferação celular, outro fator que contribui para o aumento das células é a alta capacidade que o tumor de Ehrlich tem de produzir metástase para esse órgão (SOUZA, 2009). Entretanto, com os tratamentos com AG iniciados após a inoculação do tumor houve uma redução na

celularidade do linfonodo drenante. Como já dito anteriormente, o crescimento de tumores sólidos, assim como sua habilidade de produzir metástases é dependente do processo angiogênico (KIRSCH et al., 2000; FOLKMAN, 2002). Nesse sentido é plausível pensar que o tratamento com AG possua uma ação anti-metastática sobre o tumor de Ehrlich.

Os resultados obtidos aqui indicam que a inibição da NOS2 é uma ferramenta importante para o controle do desenvolvimento tumoral, mas que os efeitos dependem da fase do desenvolvimento tumoral, pois só retardou o desenvolvimento tumoral quando a tratamento com AG foi realizado no início; e de um conjunto de fatores associados que não, simplesmente, a diminuição desse metabólito.

Em relação a forma ascítica do tumor de Ehrlich, os diferentes tempos de tratamento não foram capazes de alterar o peso e nem a circunferência abdominal em relação ao grupo não tratado, assim como não foi capaz de aumentar a sobrevida e nem o percentual da expectativa de vida dos animais, quando comparado ao grupo Controle.

Durante a resposta imune, os macrófagos são a principal fonte de NO sintetizado. Os macrófagos podem limitar o crescimento tumoral, não só devido à produção de NO, mas também através de outros mecanismos, como o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, a atividade dos radicais livres ou a apresentação do antígeno tumoral e a ativação de linfócitos auxiliares e citotóxicos. (LUM et al., 2006; GRIVENNIKOV et al., 2010).

Nishikawa et al. (2004) demonstrou que animais deficientes de iNOS com TSA, apesar de apresentarem maior sobrevida, tiveram um aumento constante no número de células tumorais, sem alteração na produção de NO no soro e no líquido ascítico. Em contrapartida nos animais que expressavam a iNOS, observou-se o aumento contínuo da produção de NO no soro e na ascite ao longo desenvolvimento tumoral, no entanto o crescimento no número de células tumorais foi interrompido em torno de uma semana e meia após o inóculo com a morte dos mesmos na segunda semana.

Kalish et al. (2015) demonstrou tanto o quelante de NO ((2-4-carboxifenil) -4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido) quanto o inibidor de iNOS (S-(2-aminoethil isotioureia) diminuíram a sobrevida de camundongos C57BL/6J e C57BL/6N com TSA, enquanto a administração do doador de NO (nitroprussiato de

sódio) prolongou a sobrevida dos camundongos. Bem como a inoculação de macrófagos reprogramados in vitro para o perfil M1 e ativados pelo LPS prolongaram a sobrevida dos camundongos com TAS.

Com base nos nossos achados, que o efeito antitumoral da inibição da iNOS pela AG foi eficaz apenas na forma sólida apenas no início do processo de instalação do tumor, pelo fato da não disponibilidade de NO, produzidos pelos de macrófagos recrutados e ativados para o perfil M1, necessária para promoção da angiogênese devido a hipóxia causada pelo crescimento tumoral e consequentemente recrutamento, e assim restringindo o aporte nutricional essencial para o desenvolvimento tumoral. No entanto, com a interrupção do tratamento observou-se retomada do crescimento do tumor.

Como consequência da inibição da iNOS em macrófagos M1, observou-se in vitro, que há uma amplificação da ativação do perfil M1, com o aumento da expressão dos marcadores de superfície CD80 e CD86, bem como da própria enzima produtora de NO iNOS, acompanhado do aumento da produção de citocinas inflamatórias. Este quadro de ativação se mostrou reversível atreves da retomada da produção de NO pelos macrófagos M1 com a retirada da AG, sendo uma possível explicação para retomada do desenvolvimento do TSE no grupo de AGI. Experimentos serão realizados com a finalidade de se compreender os mecanismos da ativação dos macrófagos para o perfil M1 com a iNOS inibida e verificar se a atividade citotóxica destes macrófagos frente a células tumorais está aumentada.

## 7 CONCLUSÃO

- ✓ A AG não é capaz de polarizar por si só macrófagos Raw 264.7.
- ✓ A AG não é capaz de alterar a repolarizar de macrófagos Raw 264.7 estimulados para os perfis M1 e M2.
- ✓ A AG não possui efeitos na polarização de macrófagos Raw 264.7 estimulados para o perfil M2.
- ✓ A inibição da iNOS pela AG intensifica a ativação de macrófagos Raw 264.7 estimulados para o perfil M1, no entanto é reversível.
- ✓ A inibição da iNOS foi eficaz de retardar o crescimento TSE apenas com o tratamento logo após a inoculação do tumor.
- ✓ A inibição da iNOS não alterou a sobrevida de camundongos portadores de TAE.

REFERENCIAS

ARAUJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. Antropologia e Saúde collection. 368;ISBN 85- 85676-75-2, 2000.

AHN, B.; OHSHIMA, H. Suppression of intestinal polyposis in ApcMin/+ mice by inhibiting nitric oxide production. **Cancer Research**. 61: 8357–8360, 2001.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal.** 357: 593–615, 2001.

ANDO, A.; YANG, A.; MORI, K.; YAMADA, H.; YAMADA, E.; TAKAHASHI, K.; SAIKIA, J.; KIM, M.; MELIA, M.; FISHMAN, M.; HUANG, P.; CAMPOCHIARO, P. A. Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. **Journal of Cellular Physiology**. 191: 116–124, 2002.

ANDREWS, A. M.; JARON, D.; BUERK, D. G.; KIRBY, P. L.; BARBEE, K. A. Direct, real-time measurement of shear stress-induced nitric oxide produced from endothelial cells in vitro. **Nitric Oxide**. 23: 335-342, 2010.

ASSUNÇÃO, A. K. M. **Efeito antitumoral do tratamento com extrato Bhidroalcoólico 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.

BACHMANN, S.; BOSSE, H. M.; MUNDEL, P. Topography of nitric oxide synthesis bylocalizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. **American Journal Physiology-Renal Physiology**.268: 885-898,1995.

BAE, S. W.; KIM, H. S.; CHA, Y. N.; PARK, Y. S.; JO, S. A.; JO, I. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. **Journal Biochemical and Biophysical Research Communications**. 306: 981-987, 2003.

BALA, A.; KAR, B.; HALDAR, P. K.; MAZUMDER, U. K.; BERA, S. Evaluation of anticancer activity of Cleome gynandra on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 129: 131-134, 2010.

BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C. Nitric oxide induced necrosis and apoptosi s in PC12 cells mediated by mitochondria. **Journal of Neurochemistry**. 75: 1455–1464. 2000.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, 7(3): 211–217, 2005.

BANULS, C.; ROCHA, M.; ROVIRA-LLOPIS, S.; HERANCE, J. R.; BAÑULS, C.; POLO, M.; BLAS-GARCIA, A.; HERNANDEZ-MIJARES, A.; VICTOR, V. M. The Pivotal Role of Nitric Oxide: Effects on the Nervous and Immune Systems. ***Current Pharmaceutical* Design**. v. 20, n. 29, p. 4679-89, 2014.

BARREIRO ARCOS, M. L. GORELIK, G.; KLECHA, A.; GOREN, N.; CERQUETTI, C.; CREMASCHI, G. A. Inducible nitric oxide synthase-mediated proliferation of a T lymphoma cell line. **Nitric Oxide.** 8: 111–118, 2003.

BAUER, G. Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells. **Anticancer Research**. 34: 1467-1482, 2014.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**. 40(4): 405-412, 1991.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxinitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**., 271: 1424-37, 1996.

BERGAMI-SANTOS, P. C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J. A. M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences.** 75: 245– 255, 2004.

BHAGAT, K., HINGORANI, A. D., PALACIOS, M., CHARLES, I. G.; VALLANCE P. Cytokine-induced venodilatation in humans in vivo: eNOS masquerading as iNOS. **Cardiovascular Research**. 41: 754–764, 1999.

BLASKO, E.; GLASER, C. B.; DEVLIN, J. J.; XIA, W.; FELDMAN, R. I.; POLOKOFF, M. A.; PHILLIPS, G. B.; WHITLOW, M.; AULD, D. S.; MCMILLAN, K.; GHOSH, S.; STUEHR, D. J.; PARKINSON, J. F. Mechanistic studies with potent and selective inducible nitric oxide synthase dimerization inhibitors. **Journal of biological chemistry**. 277: 295–302, 2002.

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunology**. 25(6): 280–288, 2004.

BORUTAITE, V., MORKUNIENE, R.; BROWN, G. C. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms. **FEBS Letters**. 467: 155–159, 2000.

BOULANGER, C. M.; HEYMES, C.; BENESSIANO, J.; GESKE, R. S.; LEVY, B. I.; VANHOUTTE, P. M. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells activation by angiotensin II in hypertension. **Circulation Research**. 83: 1271-1278, 1998.

BOZEMAN, E.; HE, S.; SHAFIZADEH, Y.; SELVARAJ, P. Therapeutic efficacy of PD-L1 blockade in a breast cancer model is enhanced by cellular vaccines expressing B7-1 and glycolipid-anchored IL-12. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. 12: 421-430, 2016.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**. 347: 768-770, 1990.

BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. **IUBMB Life**. 52: 189–195, 2001.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; KOONEY, A.; ULRICH, P.; CERAMI, A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. **Science**. 27; 232(4758):1629-32. 1986

BRÜNE, B.; MOHR, S.; MESSMER, U.K. Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. 127: 1–30, 1996.

BURNEY, S.; CAULFIELD, J.; NILES, J.; WISHNOK, J.; ANNENBAUM, S. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutation Research**. 424, 37–49. 1998.

BURNETT, A. L.; LOWENSTEIN, C. J.; BREDT, D. S.; CHANG, T.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. **Science**. 257: 401-403, 1992.

CALLAGHAN, B. C.; CHENG, H. T.; STABLES, C. L.; SMITH, A. L.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **Lancet Neurology**. 11: 521-534, 2012.

CASSOL, E.; CASSETTA, L.; ALFANO, M.; POLI, G. Macrophage polarization and HIV-1 infection. **Journal of Leukocyte Biology**. 87(4): 599–608, 2010.

CHATTOPADHYAY, S.; DAS, T.; SA, G.; RAY, P. K. Protein A-activated macrophages induce apoptosis in Ehrlich's ascites carcinoma through a nitric oxide-dependent pathway. **Apoptosis**. 7(1): 49-57, 2002.

CHE, N. J.; YANG, R.; BUZANOWSKI, M.; CICHANOWICZ, J. Cold selective catalytic reduction of nitric oxide for flue gas applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. 29: 1431-1435, 1990.

CHENG, H.; WANG, L.; MOLLICA, M.; RE, A. T.; WU, S.; ZUO, L. Nitric oxide in cancer metastasis. **Cancer Letters**. 10(353-1): 1-7, 2014.

CHEN, H. I.; CHIANG, I. P.; JEN, C. J. Exercise training increases acetylcholine-estimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Biomedical Science**. 3: 454-460, 1996.

CHEN, Y.; PANDA, K.; STUEHR, D. J. Control of nitric oxide synthase dimer assembly by a heme-NO-dependent mechanism. Biochemistry. 41(14): 4618-25, 2002.

COOKE, J. P.; LOSORDO, D. W. Nitric oxide and angiogenesis. **Circulation**. 105: 2133-2135, 2002.

CORBETT, J. A.; TILTON, R. G.; CHANG, K.; HASAN, K. S.; IDO, Y.; WANG, J. L.; SWEETLAND, M. A.; LANCASTER JR, J. R.; WILLIAMSON, J. R.; MCDANIEL, M.L. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes**. 41(4): 552-556, 1992.

CRUZ, G. V.; PEREIRA, P.V.; PATRÍCIO, F. J.; COSTA, G. C.; SOUSA, S. M.; FRAZÃO, J. B.; ARAGÃO-FILHO, W. C.; MACIEL, M. C.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M.; BARROQUEIRO, E. S.; GUERRA, R. N.; NASCIMENTO, F. R. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. 20;111(1): 148-54, 2007.

DALLAGI, A.; GIROUARD, J.; HAMELIN-MORRISSETTE, J.; DADZIE, R.; LAURENT, L.; VAILLANCOURT, C. et al. The activating effect of IFN-γ on monocytes/ macrophages is regulated by the LIF–trophoblast–IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. **Cellular & Molecular Immunology**. 12:326-341, 2014.

DAWSON, T. M.; BREDT, D. S.; FOTUHI, M.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 88: 7797-7801, 1991.

DE ASSIS, F. A. **Efeito do selênio orgânico e da vitamina E no crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor experimental de Ehrlich**. [Dissertação de Mestrado] Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação Patologia da UFMG; 2007

DE OLIVEIRA, S. I.; ANDRADE, L. N.; ONUCHIC, A. C.; NONOGAKI, S.; FERNANDES, P. D.; PINHEIRO, M. C.; ROHDE, C. B.; CHAMMAS, R.; JANCAR, S. Platelet-activating factor receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. **BMC Cancer**. 13;10: 200, 2010.

DENNIS, K.; BLATNER, N.; GOUNARI, F.; KHAZAIE, K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. **Current Opinion in Oncology**. 25: 637-645, 2013.

DERYAGINA, V. P.; RYZHOVA, N. I.; KRIVOSHEEVA, L. V.; GOLUBEVA, I. S. Formation of nitric oxide metabolites during growth of transplanted tumors with different metastatic potential. **Biochemistry.** (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 9(2): 130-136, 2015.

DHAR, A.; BRINDLEY, J. M.; STARK, C.; CITRO, M. L.; KEEFER, L. K.; COLBURN, N. H. Nitric oxide does not mediate but inhibits transformation and tumor phenotype. **Molecular Cancer Therapeutics**. 2: 1285–1293, 2003.

DONENKO, F. V.; KABIEVA, A. O.; EFFERTH, T. Tumor-specific blood serum factors as determinants of tumor growth. **Kliniceskaja Laboratornaja Diagnostika**. 10: 50-52, 13-5. 2013.

DUMONT, P.; BERTON, A.; NAGY, N.; SANDRAS, F.; TINTON, S.; DEMETTER, P.; MASCART, F.; ALLAOUI, A.; DECAESTECKER, C.; SALMON, I. Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer. **Laboratory Investigation**, 88(8): 896–906, 2008.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 39: 343 – 350, 2003.

EKMEKCIOGLU, S.; TANG. C. H.; GRIMM, E. A. NO news is not necessarily good news in cancer. **Current Cancer Drug Targets** 5: 103–115, 2005.

ELLIES, L. G.; FISHMAN, M.; HARDISON, J.; KLEEMAN, J.; MAGLIONE, J. E.; MANNER, C. K.; CARDIFF, R. D.; MACLEOD, C. L. Mammary tumor latency is increased in mice lacking the inducible nitric oxide synthase. **International Journal of Cancer.** 106: 1–7, 2003.

EHRLICH P. Experimentelle carcinom studien na Mausen. **Exp. Ther. Frankfurt**; 1: 78- 80, 1906.

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

FAIZ, A.; WEAVER, C. S.; WALSH, M. P. Air Pollution from Motor Vehicles: Standards and Technologies for Controlling Emissions. **World Bank Publications**; 1996.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**. 14(1): 125-32, 1990.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**. 29: 15-18, 2002.

FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**. 113:1708-1714, 2006.

FORTES, T. S. **Imunomodulação pelo extrato aquoso do mesocarpo de O*rbignya phalerata* mart. em modelo experimental de Ehrlich.** 2011. 72f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA, 2011.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**. 6(7):521-34, 2006.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 288:373–6, 1980.

GABRILOVICH, D.; ISHIDA, T.; OYAMA, T.; RAN, S.; KRAVTSOV, V.; NADAF, S. CARBONE, D. P. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages *in vitro***. Blood**. 11: 4150-66, 1998

GARVEY, E. P.; OPLINGER, J. A.; TANOURY, G. J.; SHERMAN, P. A.; FOWLER, M.; et al. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Inhibition of non-amino acid isothioureas. **Journal of biological Chemistry**. 269: 26669–26676, 1994.

GERARD, C.; BRUYNS, C.; MARCHANT, A.; ABRAMOWICZ, D.; VANDENABEELE, P.; DELVAUX, A.; et al. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. **Journal Experimental Medicine**.177:547, 1993.

GHATAN, S.; LARNER, S.; KINOSHITA, Y.; HETMAN, M.; PATEL, L.; XIA, Z.; YOULE, R. J.; MORRISON, R. S. p38 MAP kinase mediates Bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. **Journal of Cell Biology**. 150: 335–347, 2000.

GHOSH, S.; DAS SARMA, M.; PATRA, A.; HAZRA, B. Anti-inflammatory and anticancer compounds isolated from *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 62(9): 1158-66. 2010

GHOSH, S.; ROY, S.; BANERJEE, M.; MAITY, P. Modulation of Tumor Induced Angiogenesis in Ehrlich Ascites Tumor. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.** 23: 681-690, 2004.

GIORDANO, D.; LI, C.; SUTHAR, M.; DRAVES, K.; MA, D.; GALE, M. et al. Nitric oxide controls an inflammatory-like Ly6ChiPDCA1+ DC subset that regulates Th1 immune responses. **Journal of Leukocyte Biology.** 89: 443-455, 2010.

GOLDENBAUM, G.; DICKERSON, R. Nitric oxide production by lightning discharges. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres** (1984e2012) 98: 18333-18338, 1993.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, 5(12):953–964, 2005.

GRATTON, J. P.; LIN, M. I.; YU, J.; WEISS, E. D.; JIANG, Z. L.; FAIRCHILD, T. A.; IWAKIRI, Y.; GROSZMANN, R.; CLAFFEY, K. P.; CHENG, Y. C.; SESSA, W. C. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. **Cancer Cell**. 4: 31–39, 2003.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**. 140(6): 883–99, 2010.

IANNACONE, M.; MOSEMAN, E. A.; TONTI, E.; BOSURGI, L.; JUNT, T.; HENRICKSON, S. E.; WHELAN, S. P.; GUIDOTTI, L. G.; VON ANDRIAN, U. H. Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. **Nature.** 465: 1079–1083, 2010.

IGNARRO L. Nitric Oxide Biology and Pathobiology. New York: **Academic Press** 2000.

IRAVANI, M. M.; KASHEFI, K.; MANDER, P.; ROSE, S.; JENNER, P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. **Neuroscience.** 110: 49–58, 2002.

IZUMI, Y.; BENZ, A. M.; CLIFFORD, D. B.; ZORUMSKI, C. F. Nitric oxide inhibitors attenuate N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. **Neuroscience Letters.** 135: 227–230, 1992.

HAGEMANN, T.; LAWRENCE, T.; MCNEISH, I.; CHARLES, K. A.; KULBE, H.; THOMPSON, R. G.; ROBINSON, S. C.; BALKWILL, F. R. “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. **Journal of Experimental Medicine**. 205(6):1261–1268, 2008.

HARTVEIT, F. The growth of Ehrlich’s ascites carcinoma in C3H mice and in mice of an unrelated closed colony. Splenomegaly following intraperitoneal transplantation. **British Journal of Cancer.** 20(4): 825-830, 1966.

HAMSA, T. P.; KUTTAN, G. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-tumor effect of Ipomoea obscura (L) and its mode of action through the inhibition of proinflammatory cytokines, nitric oxide and COX-2. **Inflammation**. 34(3): 171-83, 2011.

HEALES, J. R., BOLANOS, J. P., STEWART, V. C., BROOKES, P. S., LAND, J. M., AND CLARK, J. B. NO, mitochondri a and neurological disease. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1410: 215–228, 1999.

HEINECKE, J.; RIDNOUR, L.; CHENG, R.; SWITZER, C.; LIZARDO, M.; KHANNA, C.; et al. Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 111: 6323-6328, 2014.

HUANG, Z.; HUANG, P. L.; PANAHIAN, N.; DALKARA, T.; FISHMAN, M. C.; MOSKOWITZ, M. A. Effects of cerebral ischaemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Science.** 26: 1883–1885, 1994.

HUSSAIN, S. P.; TRIVERS, G. E.; HOFSETH, L. J.; HE, P.; SHAIKH, I.; MECHANIC, L. E.; DOJA, S.; JIANG, W.; SUBLESKI, J.; SHORTS, L.; HAINES, D.; LAUBACH, V. E.; WILTROUT, R. H.; DJURICKOVIC, D.; HARRIS, C. C. Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. **Cancer Research**. 64: 6849–6853, 2004.

JADESKI, L. C.; CHAKRABORTY, C.; LALA, P. K. Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen activated protein kinase. **International Journal of Cancer** 106: 496–504, 2003.

JENKINS, D. C.; CHARLES, I. G.; THOMSEN, L. L.; MOSS, D. W.; HOLMES, L. S.; BAYLIS, S. A.; RHODES, P.; WESTMORE, K.; EMSON, P. C.; MONCADA, S. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 92: 4392–4396, 1995.

JINUSHI, M.; KOMOHARA, Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1855(2):123-30, 2015.

JOSEPHS, D. H.; BAX, H. J.; KARAGIANNIS, S. N. Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy. **Frontiers Bioscience** (Elite Ed). 1(7): 293-308, 2015.

JUNT, T.; MOSEMAN, E. A.; IANNACONE, M.; MASSBERG, S.; LANG, P. A.; BOES, M.; FINK, K.; HENRICKSON, S. E.; SHAYAKHMETOV, D. M.; DI PAOLO, N. C.; VAN ROOIJEN, N.; MEMPEL, T. R.; WHELAN, S. P.; VON ANDRIAN, U. H. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. **Nature.** 450: 110–114, 2007.

JUNTTILA, I. S., MIZUKAMI, K.; DICKENSHEETS, H.; MEIER-SCHELLERSHEIM, M.; YAMANE, H.; DONNELLY, R. P.; PAUl, W.E. Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4Ralpha, IL-13Ralpha1, and gammac regulates relative cytokine sensitivity. **Journal of Experimental Medicine**.205(11): 2595–2608, 2008.

JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Myelopoietic response in tumor-bearing mice by an aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **European Journal of Pharmacology**. 388: 219. 2000.

KALISH, S. V.; LYAMINA, S. V.; CHAUSOVA, S.; KOCHETOVA, L.; MALYSHEV, Y. MANUKHINA, E.; MALYSHEV, I. C57BL/6N Mice Are More Resistant to Ehrlich Ascites Tumors Than C57BL/6J Mice: The Role of Macrophage Nitric Oxide. **Medical Science Monitor Basic Research**. 20;21: 235-40, 2015.

KALISH, S. V.; LYAMINA, S. V.; USANOVA, E. A.; MANUKHINA, E. B.; LARIONOV, N. P.; MALYSHEV, I. Y. Macrophages Reprogrammed In Vitro Towards the M1 Phenotype and Activated with LPS Extend Lifespan of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. **Medical Science Monitor Basic Research**. 16;21: 226-34, 2015b.

KIM, M.Y. Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated with capsaicin and resveratrol. **Molecular Medicine Reports**. 5: 585-591, 2012.

KIRSCH, M.; SCHACKERT, G.; BLACK, P. M. Angiogenesis, metastasis, and endogenous inhibition. **Journal of Neuro-Oncology**. 50: 173–180, 2000.

KISLEY, L. R.; BARRETT, B. S.; BAUER, A. K.; DWYER-NIELD, L. D.; BARTHEL, B.; MEYER, A. M.; THOMPSON, D. C.; MALKINSON, A. M. Genetic ablation of inducible nitric oxide synthase decreases mouse lung tumorigenesis. **Cancer Research**. 62: 6850–6856, 2002.

KLEEB, S. R.; DOS, S.; RIZZO, M.; DAGLI, M. L.; FRUSSA-FILHO, R. Haloperidol increases spreading and nitric oxide production in macrophages from tumor-bearing mice: a possible mechanism for its antitumoral effect. **Internacional Journal of Immunopharmacology**. 21(9): 575-80, 1999.

KOBZIK, L.; REID, M. B.; BREDT, D. S.; STAMLER, J. S. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature.** 372: 546-548, 1994.

MIOSSEC. P.; KOLLS J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery.** 11: 763–776, 2012.

KONO, Y.; KAWAKAMI, S.; HIGUCHI, Y.; MARUYAMA, K.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Antitumor effect of nuclear factor-κB decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. **Cancer Sciences**. 105(8): 1049-55, 2014.

KRAUSGRUBER, T.; BLAZEK, K.; SMALLIE, T.; ALZABIN, S.; LOCKSTONE, H.; SAHGAL, N.; HUSSELL, T.; FELDMANN, M.; UDALOVA, I. A. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. **Nature Immunology**.12(3): 231–238, 2011.

KRONCKE, K.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clinical & Experimental Immunology**. 113: 147-156, 1998.

KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. **Gut.** 47: 6–9, 2000.

KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. M. Nitric oxide and intestinal inflammation. **American Journal of Medicine**. 109: 150–158, 2000.

KUMARAPPAN, C. T.; MANDAL, S. C. Antitumor activity of polyphenolic extract of Ichnocarpus frutescens. **Experimental Oncology Journal**. 29(2): 94-101, 2007.

LABONTE, A.; TOSELLO-TRAMPONT, A.; HAHN, Y. The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases. **Molecules and Cells**. 37: 275-285, 2014.

LANG, R.; PATEL, D.; MORRIS, J. J.; RUTSCHMAN, R. L.; MURRAY, P. J. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. **Journal of Immunology**. 169(5): 2253–2263, 2002.

LALA, P. K.; CHAKRABORTY, C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **Lancet Oncology**. 2: 149–156, 2001.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**. 88(2): 85–94, 2007.

LECHNER, M.; LIRK, P.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. **Seminars in Cancer Biology.**;15:277-289, 2005.

LEIST, M., SINGLE, B., NAUMANN, H., FAVA, E., SIMON, B., KUHNLE, S., NICOTERA, P. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. **Experimental Cell Research**. 249: 396–403, 1999.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF-κB regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**. 2(10): 725–734, 2002.

LI, H.; BURKHARDT, C.; HEINRICH, U-R.; BRAUSCH, I.; XIA, N.; FORSTERMANN, U. Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. **Circulation.** 107: 2348-2354, 2003.

LI, G.; WU, X.; ZHANG, F.; LI, X.; SUN, B.; YU, Y. et al. Triple expression of B7-1, B7-2 and 4-1BBL enhanced antitumor immune response against mouse H22 hepatocellular carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**.137: 695-703, 2010.

LIN, E. Y.; LI, J. F.; GNATOVSKIY, L.; DENG, Y.; ZHU, L.; GRZESIK, D. A.; QIAN, H.; XUE, X. N.; POLLARD, J. W. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. **Cancer Research**. 66: 11238–11246, 2006.

LIU, Y. C.; ZOU, X. B.; CHAI, Y. F.; YAO, Y. M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. **International Journal of Biological Sciences**. 1;10(5): 520-9, 2014.

LOPES; R. D.; BATISTA, J. M. L.; ROSA, J. C.; LIRA, F. S.; MARTINS, R.; SHIMURA, A. Y. et al . Alterações na produção de IL-10 e TNF-α no músculo esquelético em ratos com insuficiência cardíaca secundária ao infarto do miocárdio. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**. 94: 313-320, 2010.

LU, G.; ZHANG, R.; GENG, S.; PENG, L.; JAYARAMAN, P. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. **Nature Communications**. 27;6: 6676, 2015.

LUM, H. D.; BUHTOIAROV, I. N.; SCHMIDT, B. E.; BERKE. G.; PAULNOCK, D. M.; SONDEL, P. M.; RAKHMILEVICH, A. L. Tumoristatic effects of anti-CD40 mAb-activated macrophages involve nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. **Immunology.** 118(2): 261–70, 2006.

LUO, Z. D.; CIZKOVA, D. The role of nitric oxide in nociception. **Current Review of Pain.** 4: 459–466, 2000.

MAEJIMA, Y.; ADACHI, S.; MORIKAWA, K.; ITO, H.; ISOBE, M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. 38(1): 163–74, 2005.

MAHABELESHWAR, G. H.; KAWANAMI, D.; SHARMA, N.; TAKAMI, Y.; ZHOU, G.; SHI, H.; NAYAK, L.; JEYARAJ, D.; GREALY, R.; WHITE, M.; MCMANUS, R.; RYAN, T.; LEAHY, P.; LIN, Z.; HALDAR, S. M.; ATKINS, G. B.; WONG, H. R.; LINGREL, J. B.; JAIN, M. K.The myeloid transcription factor KLF2 regulates the host response to polymicrobial infection and endotoxic shock. **Immunity**.34(5): 715–728, 2011.

MAJUMDER, B.; BISWAS, R.; CHATTOPADHYAY, U. Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. **International Journal of Cancer**. 1;97(4): 493-500, 2002.

MALYSHEV, I. Yu.; MALUGIN, A. V.; GOLUBEVA, L. Yu.; ZENINA, T. A.; MANUKHINA, E. B.; MIKOYAN, V. D.; VANIN, A. F. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. **FEBS Letters**. 391(1–2): 21–23, 1996.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunology**. 25(12): 677–686, 2004.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity.** 23(4):344–346, 2005.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; LOCATI, M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. **Human Immunology.** 70(5): 325–330, 2009.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Current Opinion Immunology**, 22: 231–237, 2010.

MARIE, B. BENOT, D.; JEAN-LOUIS, M. Macrophage polarization in bacterial infections. **Journal of Immunology,** 15(6): 3733–3739, 2008.

MARTIN, E.; NATHAN, C.; XIE, Q. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Experimental Medicine.** 180: 977-984,1994.

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Biosciences**. 13: 453–461, 2008.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology.** 27: 451–483, 2009.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000 Prime Reports.** 6: 13, 2014.

MASER, R. E.; LENHARD, M. J. Cardiovascular autonomic neuropathy due to diabetes mellitus: clinical manifestations, consequences, and treatment. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 90: 5896-5903, 2005.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. **Frontiers in Immunology**. 5: 478, 2014.

MAYER, K. D. The pathogenicity of the Ehrlich ascites tumour. **British Journal of Experimental Pathology.** 47(5): 537-544, 1966.

MAZZIERI, R.; PUCCI, F.; MOI, D.; ZONARI, E.; RANGHETTI, A.; BERTI, A.; POLITI, L. S.; GENTNER, B.; BROWN, J. L.; NALDINI, L.; DE PALMA, M. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. **Cancer Cell**.19, 512–526 (2011).

MESSMER, U. K.; BRUNE, B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependen t and p53-independen t signalling pathways. **Biochemical Journal.** 319: 299–305, 1996.

MCGAHA, T. L.; CHEN, Y.; RAVISHANKAR, B.; VAN ROOIJEN, N.; KARLSSON, M. C. Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. **Blood.** 117: 5403–5412, 2011.

MOHAMAD, N. A.; CRICCO, G. P.; SAMBUCO, L. A.; CROCI, M.; MEDINA, V. A.; GUTIÉRREZ, A. S. Aminoguanidine impedes human pancreatic tumor growth and metastasis development in nude mice. **World Journal of Gastroenterology**. 15: 1065-1071, 2009.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. 43: 109-42, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation.** 21(4): 361-74, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. 65: 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology.** 8(12): 958–969, 2008.

MUKHTAR, R. A.; NSEYO, O.; CAMPBELL, M. J.; ESSERMAN L. J. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. 11(1): 91–100, 2011.

MUMM, J. B.; EMMERICH, J.; ZHANG, X.; CHAN, I.; WU, L.; MAUZE, S, et al. IL-10 elicits IFN gamma-dependent tumor immune surveillance. **Cancer Cell.** 20:781–796. 2011.

MURAD F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling (Nobel lecture). **Angewandte Chemie International Edition**. 38: 1856-1868, 1999.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**. 4;11(11): 723-37, 2011.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. **Journal of Leukocyte Biology**. 89(4): 557–563, 2011.

NAM, K. T.; OH, S. Y.; AHN, B.; KIM, Y. B.; JANG, D. D.; YANG, K. H.; HAHM, K. B.; KIM, D. Decreased *Helicobacter pylori* associated gastric carcinogenesis in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Gut.** 53: 1250–1255, 2004.

NAM, K. T.; KIM, D. Y.; PARK, M. S.; JANG, D. D.; YANG, K. H.; HAN JH, et al. Suppression of cholangiocarcinoma development by aminoguanidine in the liver fluke-infested hamster. **Journal Toxicology Pathology.** 18: 65-68, 2005.

NARDIN, A.; ABASTADO, J. P. Macrophages and cancer. **Frontiers in Bioscience**. 13: 3494–3505, 2008.

NASCIMENTO, F. R. F.; CALICH, V. L.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **Journal of Immunology.**168: 4593–4600, 2002.

NASCIMENTO, F. R. F.; CRUZ, G. V.; PEREIRA, P. V.; MACIEL, M. C.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P.; BARROQUEIRO, E. S.; GUERRA, R. N. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Science.** 78: 2650-2653, 2006.

NASCIMENTO, F. R. F.; GOMES, E. A.; RUSSO, M.; LEPIQUE, A. P. Interferon Regulatory Factor (IRF)-1 Is a Master Regulator of the Cross Talk between Macrophages and L929 Fibrosarcoma Cells for Nitric Oxide Dependent Tumoricidal Activity. **PLoS ONE**. 10: e0117782, 2015.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB Journal**. 6: 3051–3064, 1992.

NATHAN, C. Metchnikoff's legacy in 2008. **Nature Immunology**. 9(7): 695–698, 2008.

NISHIKAWA, M.; CHANG, B.; INOUE, M. Inducible NO synthase inhibits the growth of free tumor cells but enhances the growth of solid tumors. **Carcinogenesis**. 25(11): 2101-5, 2004

ODEGAARD, J. I.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; GOFORTH, M. H.; MOREL, C. R.; SUBRAMANIAN, V.; MUKUNDAN, L.; RED EAGLE, A.; VATS, D.; BROMBACHER, F.; FERRANTE, A. W.; CHAWLA, A. Macrophage-specific PPAR gamma controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**. 447(7148):1116–1120, 2007.

ODEGAARD, J. I.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; RED EAGLE, A.; VATS, D.; MOREL, C. R.; GOFORTH, M. H.; SUBRAMANIAN, V.; MUKUNDAN, L.; FERRANTE, A. W.; CHAWLA, A. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. **Cell Metabolites**. 7(6): 496–507, 2008.

OLISHEVSKY, S.; BURLAKA, A.; SIDORIK, E.; SHLYAKHOVENKO, V.; GARPENKO, Y.; KOZAK, V. Modulation of ROS/NO production by murine peritoneal macrophages in response to bacterial CpG DNA stimulation. **Experimental Oncology Journal**. 28(2): 114-20, 2006.

ONG, S.-M.; TAN, Y.-C.; BERETTA, O.; JIANG, D.; YEAP, W. H.; TAI, J. J.; WONG, W. C.; YANG, H.; SCHWARZ, H.; LIM, K., H.; KOH, P. K.; LING, K. L.; WONG, S. C. Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. **European Journal of Immunology.** 42(1): 89–100, 2012.

PAULEAU, A. L.; RUTSCHMAN, R.; LANG, R.; PERNIS, A.; WATOWICH, S. S.; MURRAY, P. J. Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. **Journal of Immunology**. 172(12): 7565–7573, 2004.

PATRÍCIO, F. J.; COSTA, G. C.; PEREIRA, P. V. S.; ARAGÃO-FILHO, W. C.; SOUSA, S. M.; FRAZÃO, J. B,; PEREIRA, W. S.; MACIEL, M. C.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M.; REBÊLO, J. M.; GUERRA, R. N.; RIBEIRO, M. N.; NASCIMENTO, F. R. Efficacy of the intralesional treatment with Chenopodium ambrosioides in the murine infection by Leishmania amazonensis. **Journal of Ethnopharmacology.** 115: 313–319, 2008.

PELLO, O. M.; DE PIZZOL, M.; MIROLO, M.; SOUCEK, L.; ZAMMATARO, L.; AMABILE, A.; DONI, A.; NEBULONI, M.; SWIGART, L. B.; EVAN, G. I.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Role of c-Myc in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. **Blood**. 119(2): 411–421, 2012.

PINTO, A. V. F. S.; MARTINS, P. R.; ROMAGNOLI, G. G.; CAMPANELLI, A. P.; TEREZAN, A. P.; FILHO, E. R.; FERREIRA DA EIRA, A.; KANENO, R. Polysaccharide fraction of *Agaricus brasiliensis* avoids tumor-induced IL-10 production and changes the microenvironment of subcutaneous Ehrlich adenocarcinoma. **Cellular Immunology.** 256: 27–38, 2009.

PORTA, C.; RIMOLDI, M.; RAES, G.; BRYS, L.; GHEZZI, P.; DI LIBERTO, D.; DIELI, F.; GHISLETTI, S.; NATOLI, G.; DE BAETSELIER, P.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. 106(35): 14978–14983, 2009.

PYASKOVSKAYA, O. N.; BOYCHUK, I. V.; FEDORCHUK, A. G.; KOLESNIK, D. L.; DASYUKEVICH, O. I.; SOLYANIK, G. I. Aconitine-containing agent enhances antitumor activity of dichloroacetate against Ehrlich carcinoma. **Experimental Oncology Journal**. 37(3): 192-6, 2015.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**.141: 39–51, 2010.

RAFIKOV, R.; FONSECA, F. V.; KUMAR, S.; PARDO, D.; DARRAGH, C.; ELMS, S.; FULTON, D.; BLACK, S. M. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. **Journal of Endocrinology**. 210: 271-284, 2011.

RAMAN, C. S.; LI, H.; MARTÁSEK, P.; BABU, B. R.; GRIFFITH, O. W.; MASTERS, B. S.; POULOS, T. L. Implications for isoform-selective inhibitor design derived from the binding mode of bulky isothioureas to the heme domain of endothelial nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**. 276: 26486–26491, 2001.

RAO, C. V.; INDRANIE, C.; SIMI, B.; MANNING, P. T.; CONNOR, J. R.; REDDY, B. S. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor. **Cancer Research**. 62: 165–170, 2002.

RATH, M.; MULLER, I.; KROPF, P.; CLOSS, E. I.; MUNDER, M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in Immunology**. 5:532, 2014.

REES, D. D., PALMER, R. M., SCHULZ, R., HODSON, H. F. & MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British Journal of Pharmacology**. 101: 746–752, 1990.

SABAN, M. R.; NGUYEN, N. B.; HAMMOND, T. G.; SABAN, R. Gene expression profiling of mouse bladder inflammatory responses to LPS, substance P, and antigen-stimulation. **American Journal of Pathology**. 160: 2095–2110, 2002.

SAKAI, M.; FONSECA, E. S.; DAGLI, M. L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Life Science**. 13;78(16): 1777-83, 2006.

SALVUCCI, O.; CARSANA, M.; BERSANI, I.; TRAGNI, G.; ANICHINI, A. Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells. **Cancer Research.** 61: 318-326. 2001.

SANDERS, S. P. Nitric oxide in asthma: pathogenic, therapeutic or diagnostic? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.** 21: 147–149, 1999.

SCOTT, D.; HULL, M. A.; CARTWRIGHT, E. J.; LAM, W. K.; TISBURY, A.; POULSOM, R.; MARKHAM, A. F.; BONIFER, C.; COLETTA, P. L. Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc(Min/+) mouse. **Gastroenterology** 121: 889–899, 2001.

SELLES, J.; POLINI, N.; ALVAREZ, C.; MASSHEIMER, V. Progesterone and 17 b-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. **Life Science**. 69: 815-827, 2001.

SERRA, I. C. P. B. ***Croton triqueter*** **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.

SESSA, W. C. eNOS at a glance. **Journal of Cell Science**. 117: 2427-2429, 2004.

SICA, A.; BRONTE, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. **Journal of Clinical Investigation**. 117(5): 1155–1166, 2007.

SI, S.; LIU, J.; LIU, J.; XU, B.; LI, J.; QIN, Y.; et al. Recombinant adenovirus of SEA and CD80 genes driven by MMRE and mouse TERT promoter induce effective antitumor immune responses against different types of tumor cells in vitro and in vivo. **Oncology Reports**. 37: 3037-3045, 2017.

SINDRILARU, A.; PETERS, T.; WIESCHALKA S.; BAICAN, C.; BAICAN, A.; PETER, H.; HAINZL, A.; SCHATZ, S.; QI, Y.; SCHLECHT, A.; WEISS, J. M.; WLASCHEK, M.; SUNDERKÖTTER, C.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **Journal of Clinical Investigation.** 121(3): 985–997, 2011.

SØNDERGAARD, J.; POGHOSYAN, S.; HONTELEZ, S.; LOUCHE, P.; LOOMAN, M.; ANSEMS, M, et al. DC-SCRIPT Regulates IL-10 Production in Human Dendritic Cells by Modulating NF-κBp65 Activation. **The Journal of Immunology**. 195:1498-1505, 2015.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry: The principle and practice of statistics. **Biological Research**, 2.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1996.

STEEVELS, T. A.; MEYAARD, L. Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. **European Journal Immunology**. 41(3):575–587, 2011.

STOCKMANN, C.; DOEDENS, A.; WEIDEMANN, A.; ZHANG, N.; TAKEDA, N.; GREENBERG, J. I.; CHERESH, D. A.; JOHNSON, R. S. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. **Nature**. 456: 814–818, 2008.

STRAUB, V. A.; GRANT, J.; O'SHEA, M.; BENJAMIN, P. R. Modulation of serotonergic neurotransmission by nitric oxide. **Journal of Neurophysiology**. 97: 1088-1099, 2007.

SZANTO, A.; BALINT, B. L.; NAGY, Z. S.; BARTA, E.; DEZSO, B.; PAP, A.; SZELES, L.; POLISKA, S.; OROS, M.; EVANS, R. M.; BARAK, Y.; SCHWABE, J.; NAGY, L. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR gamma regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. **Immunity**. 33(5): 699–712, 2010.

TAMURA, T.; YANAI, H.; SAVITSKY, D.; TANIGUCHI, T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. **Annual Review of Immunology**. 26: 535–584, 2008.

TANG, X.; MO, C.; WANG, Y.; WEI, D.; XIAO, H. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. **Immunology**. 138(2): 93-104, 2013.

TAKEDA, N.; O'DEA, E. L.; DOEDENS, A.; KIM, J. W.; WEIDEMANN, A.; STOCKMANN, C.; ASAGIRI, M.; SIMON, M. C.; HOFFMANN, A.; JOHNSON, R. S.

Differential activation and antagonistic function of HIF-{alpha} isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. **Genes & Development**. 24(5): 491–501, 2010.

THOMSEN, L. L.; SCOTT, J. M.; TOPLEY, P.; KNOWLES, R. G.; KEERIE, A. J.; FREND, A. J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a novel inhibitor. **Cancer Research**. 57: 3300–3304, 1997.

TOUSOULIS, D.; KAMPOLI, A. M.; TENTOLOURIS, C.; PAPAGEORGIOU, N.; STEFANADIS, C. The role of nitric oxide on endothelial function. **Current Vascular Pharmacology**. 10(1): 4-18, 2012.

TSUTSUI, M.; TANIMOTO, A.; TAMURA, M.; MUKAE, H.; YANAGIHARA, N.; SHIMOKAWA, H.; OTSUJI, Y. Significance of nitric oxide synthases: lessons from triple nitric oxide synthases null mice. **Journal of Pharmacological Science**. 127: 42-52, 2015.

VALADARES, M. C**. Avaliação de alguns aspectos da resposta imune tipo celular em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com titanocenos**. [Tese de Doutorado]. Campinas: Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP; 2002.

VALLANCE, P. & CHARLES, I. Nitric oxide in sepsis: of mice and men. **Sepsis**. 1: 93–100, 1998.

VALLANCE, P.; LEIPER, J. Blocking NO synthesis: how, where and why? **Nature Reviews Drug Discovery.** 1(12): 939-50, 2002.

VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **Immunology.** 103: 255–261, 2001.

VERRECK, F. A. W. de BOER, T. LANGENBERG D. M. L.; HOEVE, M. A.; KRAMER, M.; VAISBERG, E.; KASTELEIN, R.; KOLK, A.; DE WAAL-MALEFYT, R.; OTTENHOFF, T. H. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to mycobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 101(13): 4560–4565, 2004.

VINIK, A. I.; ZIEGLER, D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. **Circulation**. 115: 387-397, 2007.

WALCH, L.; BRINK, C.; NOREL, X. The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. **Therapie**. 56: 223-226, 2000.

WHYTE, C. S.; BISHOP, E. T.; RÜCKERL, D.; GASPAR-PEREIRA, S.; BARKER, R. N.; ALLEN, J. E.; REES, A. J.; WILSON, H. M. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. **Journal of Leukocyte Biology**. 90(5): 845–854, 2011.

WILLIS, R. A.: Teratomas; **Atlas of Tumor Pathology**, sect. 3, fasc. 9. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology. 1951

WOLFF, D. J.; DATTO, G. A.; SAMATOVICZ, R. A. The dual mode of inhibition of calmodulin-dependent nitric oxide synthase by antifungal imidazole agents. **Journal of Biological Chemistry**. 268: 9430–9436, 1993.

WOLFF, D. J.; LUBESKIE, A.; LI, C. Inactivation and recovery of nitric oxide synthetic capability in cytokine-induced RAW 264.7 cells treated with "irreversible" NO synthase inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 1;338(1): 73-82, 1997.

XIE, Q.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**. 269: 4705-4708, 1994.

XING, Y.; ZHAO, S.; ZHOU, B. P.; MI, J. Metabolic reprogramming of the tumour microenvironment. **FEBS Journal**. 282(20): 3892-8, 2015.

XU, K. Y.; HUSO, D. L.; DAWSON, T. M.; BREDT, D. S.; BECKER, L. C. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 96: 657-662, 1999.,

XU, W.; LIU, L. Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I. G. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Research.** 12: 311-320, 2002.

YABUKI, M., TSUSUI, K., HORTON, A. A., YOSHIOKA, T., AND UTSUMI, K. Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor. **Free Radical Research Journal**. 32: 507–514, 2000.

ZANG, L.; HE, H.; YE, Y.; LIU, W.; FAN, S.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA T. Nitric oxide augments oridonin-induced efferocytosis by human histocytic lymphoma U937 cells via autophagy and the NF-kappaB-COX-2-IL-1beta pathway. **Free Radical Research Journal**. 46: 207-1219, 2012.

ZEINI, M.; TRAVÉS, P. G.; LÓPEZ-FONTAL, R.; PANTOJA, C.; MATHEU, A.; SERRANO, M.; BOSCÁ, L.; HORTELANO, S. Specific contribution of p19 (ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. **Journal of Immunology**.177(5): 3327–36, 2006.

ZHANG, X. M.; XU, Q. Metastatic melanoma cells escape from immunosurveillance through the novel mechanism of releasing nitric oxide to induce dysfunction of immunocytes. **Melanoma Research**. 11: 559–567, 2001.

ZHUANG, S.; DEMIRS, J. T.; KOCHEVAR, I. E. p38 mitogenactivated protein kinase mediates hid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**. 275: 25939–25948, 2000.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; CHOUDHURI, R.; ZHANG, H. T.; DONNINI, S.; GRANGER, H. J.; BICKNELL, R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation.** 1;99(11): 2625-34, 1997.

# 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 ( ) EXTENSAO |
| Vigência da autorização | 01/05/2016 à 31/04/2018 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongos(*Mus musculus*) 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

# PRODUÇÕES DURANTE O CURSO DE DOUTORADO

ORAL DISEASES

Oral Diseases (2014) 23, 75–76 doi: 10.1111/odi.12373
© 2013 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd
All rights reserved
www.wiley.com

## LETTER TO THE EDITOR

# Chronic periodontitis and serum levels of hepcidin and hemoglobin

Dear Editor,

We have read that the impact of periodontal treatment in improving circulating hemoglobin levels was confirmed by Vilela *et al* (2011) when they investigated the main inflammatory markers such as IL-6, C-reactive Protein (CRP), and prohepcidin. This study is considered a pioneering research on the association between periodontitis and hepcidin pro-hormone. However, there is lack of studies evaluating the relationship between periodontal disease and serum hepcidin. Given the high prevalence of periodontitis in the population and as it is considered a local inflammatory/infectious process with systemic response, manifested by an increase of CRP, IL-6, and possibly hepcidin, the latter involved in iron homeostasis, it is hypothesized that individuals without systemic diseases, only with chronic periodontitis, present lower hemoglobin levels than those with periodontal health (Holtfreter *et al*, 2010).

Increased circulating hepcidin, due to inflammatory stimulation, induces internalization and degradation of ferroportin which loss from cell surface prevents the exit of iron from inside of the cells into the plasma, resulting in low transferrin saturation which leads to the decrease of erythropoiesis, contributing to the development of anemia of chronic disease (Domenico *et al*, 2007; Nemeth and Ganz, 2009).

We recently investigated the possible association between periodontitis and serum hepcidin and hemoglobin in systemically healthy individuals, as well as the association between IL-6 and hepcidin with complete blood count variables, inflammatory markers, and iron stores in individuals with chronic periodontitis. Two groups were formed in accordance with the presence ($n = 36$) or the absence of periodontal infection ($n = 31$). In the group with periodontitis, there were included at least two teeth with clinical attachment level ≥6 mm and probing depth ≥5 mm in one or more sites (Machtei *et al*, 1992), associated with the presence of bleeding on probing at the same site 30 s after the first penetration of the probe. The following laboratory tests were performed: complete blood count, total cholesterol, fasting glucose, triglycerides, albumin, oxaloacetic transaminase, creatinine, uric acid, erythrocyte sedimentation rate (ESR), CRP, IL-6, hepcidin, serum iron, ferritin, Transferrin Saturation Index, and urine test for abnormal elements and sediment analysis (EAS). IL-6 and hepcidin were evaluated by immunoassay technique ELISA.

The results showed that the clinical periodontal parameters were statistically different between the groups, with high means for the group of individuals with periodontitis ($P = 0.0001$).

**Table 1** Distribution of complete blood count, and inflammatory and iron stores markers in accordance with groups with and without periodontitis

| | *Group with periodontitis (n = 33)* | | *Group without periodontitis (n = 30)* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Variables* | *Mean ± s.d.* | *Median (IQR)* | *Mean ± s.d.* | *Median (IQR)* | *Reference range* | P |
| Complete Blood Count | | | | | | |
| Hemoglobin (g dl$^{-1}$) | 13.5 ± 2.2 | 13.6 (6.4–16.3) | 14.2 ± 1.4 | 14 (10.3–16.8) | 12.0–16.0 | 0.18 |
| Hematocrit (%) | 41.0 ± 5.8 | 41.3 (24.3–49.2) | 43.4 ± 4.1 | 42.8 (32.6–50.5) | 36.0–48.0 | 0.07 |
| Erythrocytes (millions/mm$^3$) | 4.62 ± 0.48 | 4.6 (3.55–5.64) | 4.78 ± 0.45 | 4.73 (3.84–5.69) | 3.9–5.3 | 0.28 |
| Mean Corpuscular Volume (fl) | 87.1 ± 12.1 | 89 (38.5–103.9) | 90.8 ± 4.3 | 91.6 (80.1–97.8) | 80.0–100.0 | 0.29 |
| Mean Corpuscular Hemoglobin (pg) | 29.0 ± 3.4 | 29.7 (14.7–34.3) | 29.7 ± 1.5 | 29.9 (25.2–31.8) | 27.0–33.0 | 0.66 |
| Inflammatory Markers | | | | | | |
| Ultrasensitive C-reactive Protein (mg dl$^{-1}$) | 0.28 ± 0.34 | 0.12 (0.01–1.29) | 0.25 ± 0.39 | 0.08 (0.01–1.90) | < 0.50[a] | 0.41 |
| Interleukin 6 (pg ml$^{-1}$)[b] | 16.0 ± 8.6 | 14.0 (8.6–68.7) | 14.6 ± 5.2 | 12.9 (11.3–39.4) | ≤ 13.0[a] | 0.28 |
| Hepcidin (ng ml$^{-1}$)[b] | 65.6 ± 14.3 | 64.2 (38.1–98.6) | 60.9 ± 13.0 | 62.7 (23.9–82.5) | | 0.19 |
| Hemosedimentation Speed (mm) | 6.64 ± 5.61 | 5 (3–23) | 5.47 ± 8.17 | 3 (3–45) | ≤ 10.0 | 0.09 |
| Iron Stores Markers | | | | | | |
| Serum Iron (µg dl$^{-1}$) | 88.8 ± 38.0 | 89 (10–199) | 104.6 ± 31.8 | 108.5 (18–155) | M: 65.0–175.0<br>F: 50.0–170.0 | 0.08 |
| Transferrin Saturation Index (%) | 34.5 ± 16.1 | 32.5 (3.4–70.3) | 39.4 ± 13.5 | 38 (4.7–64.3) | 20.0–55.0 | 0.19 |
| Ferritin (ng ml$^{-1}$) | 125.2 ± 130.6 | 77.8 (2.5–600.1) | 127.1 ± 127.6 | 73.3 (7.6–649.9) | M: 22.0–322.0<br>F: 10.0–291.0 | 0.96 |

[a]Lost of one information to the group with periodontitis.
[b]Lost of two information in both groups.
[c]Negative for inflammatory diseases in acute phase.
[d]There is no reference range for hepcidin.
± s.d. = standard deviation. IQR = interquartile range (1st quartile–3rd quartile). M = male values. F = female values.

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 01 February 2017
doi: 10.3389/fmicb.2017.00148

# *Chenopodium ambrosioides* L. Improves Phagocytic Activity and Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture

**Carlos E. P. Rios[†], Afonso G. Abreu[2,†], Jose A. F. Braga Filho[1], Johnny R. Nascimento[1,2], Rosane N. M. Guerra[1,2], Flávia M. M. Amaral[2], Márcia C. G. Maciel[1,2] and Flávia R. F. Nascimento[1,2]***

[1] Laboratory of Immunophysiology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, [2] Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, [3] Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, UNICEUMA, São Luís, Brazil

*Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae) is often used in different kinds of vegetal preparations for medicinal purposes in many clinical situations. Some studies have demonstrated its anti-inflammatory and immunomodulatory properties. The aim of this work was to investigate the effect of prophylactic treatment with the hydroalcoholic crude extract (HCE) of *C. ambrosioides* and its hexanic fraction (HEX) on the control of bacterial growth, the activation of phagocytes and the control of the systemic inflammatory response in a sepsis experimental model. Animals were divided into three groups ($n$ = 5/group): Control, which received only NaCl 0.9% solution; HCE, which received the crude extract; and HEX, which received the HEX of the extract. The animals received saline, HCE or HEX (5 mg/kg), subcutaneously (SC), 6 h before cecal ligation and puncture (CLP). Twelve hours after the CLP, the blood was collected to measure the serum cytokines and the animals were killed for the evaluation of colony-forming units (CFUs), cellular influx, and activation of phagocytes in the peritoneal cavity, measured by the secretion of hydrogen peroxide and nitric oxide production. The results showed that only HEX treatment inhibited bacterial growth in the peritoneum and inflammatory cellular influx, especially influx of macrophages and neutrophils. However, HCE and HEX treatments increased *ex vivo* hydrogen peroxide secretion and nitric oxide production by phagocytes and decreased the pro-inflammatory cytokines in the serum, indicating a systemic anti-inflammatory effect of both. In conclusion, *C. ambrosioides* treatment decreases bacterial growth likely by activation of phagocytes and, in parallel, ameliorates the general state of mice by reducing the systemic inflammatory response usually observed in sepsis.

**Keywords: *Chenopodium ambrosioides*, sepsis, cecal ligation and puncture, phagocytes, cytokines**

OPEN ACCESS

**Edited by:**
*Maria Teresa Dos Santos Correia, Federal University of Pernambuco, Brazil*

**Reviewed by:**
*Osmar Nascimento Silva, Universidade Católica Dom Bosco, Brazil*
*Rafael De Freitas E. Silva, University of Pernambuco and Oswaldo Cruz Foundation, Brazil*
*Marcelo Nicolás Muscará, University of Sao Paulo, Brazil*

***Correspondence:**
*Flávia R. F. Nascimento*
*nascimentofrf@yahoo.com.br*

[†]*These authors have contributed equally to this work.*

**Specialty section:**
*This article was submitted to Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, a section of the journal Frontiers in Microbiology*

**Received:** 11 November 2016
**Accepted:** 20 January 2017
**Published:** 01 February 2017

**Citation:**
*Rios CEP, Abreu AG, Braga Filho JAF, Nascimento JR, Guerra RNM, Amaral FMM, Maciel MCG and Nascimento FRF (2017) Chenopodium ambrosioides L. Improves Phagocytic Activity and Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. Front. Microbiol. 8:148. doi: 10.3389/fmicb.2017.00148*

Moura et al. BMC Res Notes (2018) 11:525
https://doi.org/10.1186/s13104-018-3655-4

BMC Research Notes

RESEARCH NOTE

Open Access

# Tumor growth activity of duloxetine in Ehrlich carcinoma in mice

Ed Carlos Rey Moura[1], Plinio da Cunha Leal[1], Izabel Cristina Portela Bogéa Serra[1], Bruno de Paulo Ribeiro[1], Johnny Ramos do Nascimento[1], Flavia Raquel Fernandes do Nascimento[1] and Rioko Kimiko Sakata[2*]

## Abstract

**Objective:** The objective of this study was to analyze whether duloxetine influences tumor growth in Ehrlich carcinoma. The mice were administered 5 or 30 mg/kg of duloxetine or saline solution. All animals were inoculated with tumor cells. The tumor progression was evaluated by body weight, abdominal circumference, ascites volume and tumor cell count. The effect of duloxetine on immune response was evaluated by lymphoid cells, nitric oxide (NO) production, arginase and superoxide dismutase (SOD) activity and the spleen immunophenotyping.

**Results:** There was no difference between the groups regarding weight, abdominal circumference, ascites volume and number of tumor cells. Duloxetine increased the cells of the inguinal lymph node. There was no difference in the number of cells in the bone marrow and spleen. Ascites SOD activity was greater in Duloxetine groups. There were no differences in the levels of NO, nitrite, and arginase. The number of antibody for CD3 (CD3+), CD4+, CD8+ and CD28+ cells was lower in the duloxetine groups. In conclusion, duloxetine has no direct effect on tumor growth and does not alter immunity. The drug increased the SOD that fights free radicals and led the migration of lymphocytes, suggesting that duloxetine could be used in tumor-bearing individuals.

**Keywords:** Cancer, Duloxetine, Tumor growth

## Introduction

Cancer pain is treated according to the analgesic ladder, with opioids on the second and third steps. Adjuvants, such as duloxetine, can be used in combination on all steps. The use of antidepressants is important to appropriately treat cancer pain. The study on the effect of adjuvants is important to select drugs that do not increase tumor growth.

In the Ehrlich's tumor, a mammary carcinoma of female mice in ascitic form, pain is caused by the inflammatory response, and pressure exerted by progressive tumor enlargement, hemorrhage, and neural compression [1].

Duloxetine would be an interesting analgesic drug for its anti-inflammatory effect [2]. Duloxetine is a reuptake inhibitor for serotonin (5-HT) and norepinephrine in the central nervous system that reduces pain transmission [3]. Duloxetine, in vitro, was able to decrease the viability of hepatocellular carcinoma cells [4].

There aren't any studies about the in vivo effect of duloxetine on the effect of duloxetine on the tumor progression and on the immune response.

The present study aimed to evaluate whether duloxetine directly influences tumor growth, in the Ehrlich's tumor model in mice.

## Main text

### Materials and methods

After approval from the Ethics Committee (CEUA 5923020415), 15 adult female Swiss mice, with 60 days and between 25 and 30 g were housed 5/cage on a 12-h-light/-dark cycle in a temperature-controlled room with food and water available ad libitum. Animal experiments were carried out in accordance with the International Association for the Study of Pain (IASP). Every effort was made to reduce the number of animals used and their discomfort.

*Correspondence: rsakata@unifesp.br
[2] Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de Maio 61/51, Vila Clementino, São Paulo, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

JPP JOURNAL OF Pharmacy and Pharmacology
ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY
JPP Journal of Pharmacy And Pharmacology
Research Paper

# Anti-arthritic properties of crude extract from *Chenopodium ambrosioides* L. leaves

Wanderson S. Pereira[a,b], Girlaine P. da Silva[a], Mariana V. Vigliano[a], Nathalia R. F. Leal[a], Fabiana A. Pinto[a], Daniele C. Fernandes[a], Shirley V. M. Santos[a], Thiago Martino[a], Johnny R. Nascimento[b], Ana Paula S. de Azevedo[b], Eduardo N. Fonseca[c], Leosvaldo S. M. Velozo[a], Lauro R. Souza Neto[d], Frederico F. Bastos[d], Elyzabeth A. Portari[e], Kátia C. Carvalho Sabino[a], Flávia Nascimento[b] and Marsen G. P. Coelho[a]

[a]Laboratory of Applied Immunology and Biochemistry of Proteins and Natural Products, Department of Biochemistry, Biomedical Center, Institute of Biology Roberto Alcantara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, [b]Laboratory of Immunophysiology, Department of Pathology, Center for Biological Sciences and Health, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, [c]Department of Plant Biology, Biomedical Center, Institute of Biology Roberto Alcantara Gomes, State University of Rio de Janeiro, [d]Laboratory of Biochemical Toxicology, Department of Biochemistry, Biomedical Center, Institute of Biology Roberto Alcantara Gomes, State University of Rio de Janeiro, and [e]Department of Pathology and Laboratories, Pathological Anatomy, Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Keywords**
arthritis; *Chenopodium ambrosioides*; cytokines; inflammation

**Correspondence**
Marsen G. P. Coelho, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Professor Manoel de Abreu, 444, 4° andar, CEP-20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail: marsengpc@yahoo.com.br

Received August 10, 2017
Accepted March 24, 2018

doi: 10.1111/jphp.12926

## Abstract

**Objectives** To evaluate the effect of hydroalcoholic crude extract (HCE) from *Chenopodium ambrosioides* leaves on the development of type II collagen-induced arthritis (CIA) and on pro-inflammatory cytokine balance.

**Methods** Collagen-induced arthritis was induced in DBA1/J mice. On the 21st day, the mice were treated orally with HCE or methotrexate, daily. Six weeks after beginning the treatment, the following measures were determined: lymphoid organs cell numbers, percentage of blood cells, IL-6, IFN-γ, TNF-α and IL-17 serum concentrations, activity of hepatic and kidney glutathione S-transferase, hepatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity, bone density and histopathology.

**Key findings** Treatment of CIA mice with HCE 5 mg/kg (HCE5) reduced the percentage of neutrophils and macrophages and the number of bone marrow cells and increased the lymphocyte numbers and the inguinal lymph node cellularity. This treatment inhibited the serum concentration of IL-6 and TNF-α, which may be related to the preservation of bone density and to the slight thickening of periarticular tissues, with minimal fibrosis and fibroblast proliferation in the joints. The CIA group presented advanced articular erosion and synovial hyperplasia. Phytochemical analysis showed mainly flavonols.

**Conclusions** HCE5 presented anti-arthritic potential and reduced IL-6 and TNF-α, which participate directly in the development and maintenance of the inflammatory process in rheumatoid arthritis.

## Introduction

*Chenopodium ambrosioides* L., popularly known as 'mastruz', is a herb of the Amaranthaceae family and is distributed widely throughout Brazil.[1,2] In Brazilian popular medicine, the plant is crushed and taken in the form of teas, infusions or poultices for various purposes: as a diuretic, an antihelminthic, for wounds, respiratory problems, inflammatory and painful conditions, bronchitis, tuberculosis and rheumatism.[3] The literature has reported on the following pharmacological properties: diuretic; anthelmintic[3]; antitumour[4]; antibacterial[5]; antifungal[6]; antiprotozoal[7]; antinociceptive[8]; anti-inflammatory[9]; and the reduction in synovial inflammation and pain on experimental osteoarthritis.[10]

However, there are no reports of the effect of *C. ambrosioides* on rheumatoid arthritis (RA), which is a chronic disease characterized by synovial inflammation and


© 2018 Royal Pharmaceutical Society, 

*Journal of Developmental Origins of Health and Disease*

**cambridge.org/doh**

## Original Article

**Cite this article:** Coelho CFF, França LM, Nascimento JR, dos Santos AM, Azevedo-Santos APS, Nascimento FRF, Paes AMA. (2018) Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium L-glutamate-induced obese mice. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* page 1 of 8. doi: 10.1017/S2040174418000284

Received: 16 December 2017
Revised: 14 March 2018
Accepted: 23 March 2018

**Key words:**
monosodium L-glutamate; non-alcoholic fatty liver disease; non-alcoholic steatohepatitis; obesity; metabolic syndrome

**Address for correspondence:**
A. M. de Andrade Paes, Avenida dos Portugueses, 1966 – Cidade Universitária Dom Delgado, 65080-850 São Luís, MA, Brazil.
E-mail: marcuspaes@ufma.br

© Cambridge University Press and the International Society for Developmental Origins of Health and Disease 2018.

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS

# Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium L-glutamate-induced obese mice

C. F. F. Coelho[1], L. M. França[1,4], J. R. Nascimento[2,4], A. M. dos Santos[3,4], A. P. S. Azevedo-Santos[2,4], F. R. F. Nascimento[2,4] and A. M. A. Paes[1,4]

[1]Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil, [2]Laboratory of Immunophysiology, Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil, [3]Department of Public Health, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil and [4]Health Sciences Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

**Abstract**

Monosodium L-glutamate (MSG)-induced obesity is a useful model for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) studies. However, there is limited data on its initiation and progression. Thus, this study aimed to characterize the onset of metabolic and histopathological features of NAFLD and its progression to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in this model. To perform this study, Swiss mice pups were neonatally injected with MSG (4 g/kg/day, s.c.) or equiosmolar saline and followed up to 60, 120 or 180 days old. At each age, blood, liver, as well as periepididymal and retroperitoneal fat pads were collected for morphometric, biochemical and histological analyses, the later according to NAFLD activity score. MSG mice presented hypertriglyceridemia and central obesity at all ages, but peripheral insulin-resistance was verified only in 120- and 180-day-old mice. Hepatic total fat and triglycerides content were higher in MSG mice at all ages. Accordingly, histopathological analysis showed that 60-day-old MSG mice had microvesicular steatosis with occasional ballooning, which evolved into NASH from 120 days old. Retroperitoneal fat accumulation was the only variable to independently correlate with NAFLD activity total score upon multivariate analysis ($R^2 = 71.45\%$). There were no differences in IL-6 and TNF-α serum levels among groups. Overall, this study shows that NAFLD is a precocious outcome in MSG-obese mice, whereas the period comprised between 60 and 120 days old seems to be a crucial metabolic window for comprehending pathophysiological events involved in NAFLD-to-NASH progression in this model.

## Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), defined as the cytoplasmic lipid accumulation inside hepatocytes in the absence of relevant alcohol intake,[1] has been considered the main hepatic manifestation of metabolic syndrome (MetS) and whose prevalence has reached epidemic levels worldwide.[2] Upon sustained injury, hepatocytes start releasing pro-inflammatory cytokines that lead to macrophage infiltration and disease progression to non-alcoholic steatohepatitis (NASH).[3] These histopathologic and biomolecular changes have been tentatively explained by the 'Two Hits Hypothesis' for NAFLD/NASH, according to which the first hit corresponds to steatosis and the second one to the joint factors oxidative stress and cytokines release.[3]

Histopathological criteria for NASH diagnosis include mandatory presence of steatosis, ballooning degeneration and lobular inflammation, with or without perisinusoidal fibrosis on hepatic lobule zone 3.[4] However, physiopathological mechanisms underlying this process are still barely understood, meanwhile available animal models not fully embrace human NAFLD/NASH features.[5] According to Kanuri and Bergheim,[6] an ideal animal model should meet two basic criteria: histopathological pattern similar to human NAFLD and steatohepatitis onset occurring under a dysfunctional metabolic milieu. More recently, it has been pointed out that most NAFLD/NASH models do not evolve to more severe stages of liver disease.[7]

Neonatal injection of monosodium L-glutamate (MSG) damages hypothalamic nuclei, for example, arcuate nucleus,[8,9] leading to deficient growth hormone (GH) secretion, as well as autonomic unbalance characterized by decreased sympathetic and increased parasympathetic toni.[10–12] Consequently, MSG-obese rodents show hyperinsulinemia and reduced serum levels of insulin-growth factor 1 (IGF-1) at ages as early as 4 weeks old,[13–15] which precede the development of dyslipidemia, glucose intolerance, hyperleptinemia insulin resistance, central obesity and type II diabetes mellitus (T2DM) at adulthood.[16–19] Noteworthy, early infant GH deficiency and hyperinsulinemia are thought to predispose to a range of late-in-life chronic conditions due to metabolic programming.[20] Thus, those gathered features support MSG

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. Universidade Federal do Maranhao, on 05 Dec 2018 at 18:21:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174418000284

frontiers in Immunology

ORIGINAL RESEARCH
published: 21 September 2018
doi: 10.3389/fimmu.2018.02137

# Prophylactic Treatment With Simvastatin Modulates the Immune Response and Increases Animal Survival Following Lethal Sepsis Infection

*Jose A. F. Braga Filho[1†], Afonso G. Abreu[2,3†], Carlos E. P. Rios[1], Liana O. Trovão[1], Dimitri Luz F. Silva[1], Dalila N. Cysne[1], Johnny R. Nascimento[1,2], Thiare S. Fortes[1,2], Lucilene A. Silva[1], Rosane N. M. Guerra[1,2], Márcia C. G. Maciel[2], Carlos H. Serezani[4] and Flávia R. F. Nascimento[1,2*]*

[1] Laboratory of Immunophysiology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, [2] Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, [3] CEUMA University, São Luís, Brazil, [4] Division of Infectious Diseases, Departments of Medicine, Pathology, Microbiology and Immunology, Institute for Infection, Immunology and Inflammation, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, United States

OPEN ACCESS

**Edited by:**
*Thierry Roger, Lausanne University Hospital (CHUV), Switzerland*

**Reviewed by:**
*Hridayesh Prakash, Amity University, India*
*Santosh Kumar Mishra, Indian Veterinary Research Institute (IVRI), India*

***Correspondence:**
*Flávia R. F. Nascimento*
*nascimentofrf@yahoo.com.br*

*† These authors have contributed equally to this work*

**Specialty section:**
*This article was submitted to Microbial Immunology, a section of the journal Frontiers in Immunology*

**Received:** *27 April 2018*
**Accepted:** *30 August 2018*
**Published:** *21 September 2018*

**Citation:**
*Braga Filho JAF, Abreu AG, Rios CEP, Trovão LO, Silva DLF, Cysne DN, Nascimento JR, Fortes TS, Silva LA, Guerra RNM, Maciel MCG, Serezani CH and Nascimento FRF (2018) Prophylactic Treatment With Simvastatin Modulates the Immune Response and Increases Animal Survival Following Lethal Sepsis Infection. Front. Immunol. 9:2137. doi: 10.3389/fimmu.2018.02137*

Chronic use of statins may have anti-inflammatory action, promoting immunomodulation and survival in patients with sepsis. This study aimed to analyze the effects of pretreatment with simvastatin in lethal sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). Male *Swiss* mice received prophylactic treatment with simvastatin or pyrogen-free water orally in a single daily dose for 30 days. After this period, the CLP was performed. Naïve and Sham groups were performed as non-infected controls. Animal survival was monitored for 60 h after the CLP. Half of mice were euthanized after 12 h to analyze colony-forming units (CFUs); hematological parameters; production of IL-10, IL-12, IL-6, TNF-α, IFN-γ, and MCP-1; cell counts on peritoneum, bronchoalveolar lavage (BAL), bone marrow, spleen, and mesenteric lymph node; immunephenotyping of T cells and antigen presenting cells and production of hydrogen peroxide ($H_2O_2$). Simvastatin induced an increase in survival and a decrease in the CFU count on peritoneum and on BAL cells number, especially lymphocytes. There was an increase in the platelets and lymphocytes number in the Simvastatin group when compared to the CLP group. Simvastatin induced a greater activation and proliferation of CD4+ T cells, as well as an increase in IL-6 and MCP-1 production, in chemotaxis to the peritoneum and in $H_2O_2$ secretion at this site. These data suggest that simvastatin has an impact on the survival of animals, as well as immunomodulatory effects in sepsis induced by CLP in mice.

**Keywords: simvastatin, prophylactic treatment, sepsis, immunomodulation, macrophages, hydrogen peroxide, cytokines**

## INTRODUCTION

Sepsis is defined as a complex systemic inflammatory response caused by an uncontrolled infection with activation of both pro- and anti-inflammatory responses. The development and progression of sepsis are multifactorial, affecting the cardiovascular, neuronal, endocrine, and immune systems (1, 2). It is the second most frequent cause of death among patients hospitalized in UTIs and the 10th most frequent cause of mortality in general (3).