



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MODIFICAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA EM
RATOS INOCULADOS COM CARCINOSSARCOMA 256 DE
WALKER: PAPEL DA DEGRANULAÇÃO MASTÓCITÁRIA.**

ANDRE LUIZ DOS REIS BARBOSA

**Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Lima Vale.**

**FORTALEZA-CE
2007**

ANDRE LUIZ DOS REIS BARBOSA

**MODIFICAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA EM
RATOS INOCULADOS COM CARCINOSSARCOMA 256 DE
WALKER: PAPEL DA DEGRANULAÇÃO MASTÓCITÁRIA.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.

**FORTALEZA-CE
2007**

B195m Barbosa, André Luiz dos Reis
 Modificação da resposta inflamatória sistêmica em ratos
 inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker : papel da
 degranulação mastocitária / André Luiz dos Reis Barbosa –
 Fortaleza, 2007.
 92 f : il.

 Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.
 Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2007.
 1. Carcinoma 256 de Walker 2. Inflamação 3. Mastócitos I.
 Souza, Marcellus Henrique Loiola Ponte de (Orient.) II. Título

CDD: 616.994

ANDRE LUIZ DOS REIS BARBOSA

**MODIFICAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA EM
RATOS INOCULADOS COM CARCINOSSARCOMA 256 DE
WALKER: PAPEL DA DEGRANULAÇÃO MASTÓCITÁRIA.**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na biblioteca setorial da referida Universidade.

Data da aprovação: 27/07/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Universidade Federal do Ceará (Orientador)

Prof. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo

Prof. Dra. Gerly Anne Castro Brito

A meus pais que tanto me incentivaram nessa maratona de atividades e a minha noiva que sempre esteve ao meu lado.

Quanto mais me aprofundo nas ciências, mais perto eu chego de Deus.

Albert Einstein.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo a **Deus**, pelas graças alcançadas e pela força a mim concebida.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pela sua dedicada e minuciosa orientação, por sua paciência, amizade, profissionalismo, e principalmente pelo incentivo que me deu na realização dos experimentos.

Ao LOE, em especial ao professor **Manoel Odorico de Moraes** e a professora **Claudia do Ó Pessoa**, por terem me cedidos amostras do tumor experimental com qual eu trabalhei.

Ao Prof. Dr. **Ronaldo Albuquerque Ribeiro**, exemplo de autoridade e seriedade, por ter me concedido o espaço laboratorial e pelas sugestões essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, especialmente ao Profa. Dra. **Mariana Lima Vale** especialmente por participar ativamente das atividades relacionadas ao desenvolvimento dessa dissertação .

As bolsistas **Livia, Graciela e Cleiton**, pela grande ajuda na realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos pós-graduandos do LAFICA: **Antoniella, Rosymeire (Rosinha), Ana Caroline, Jand Venes , Pedro, Marco Botelho**, e **todos os outros** pela ajuda concedida nas atividades laboratoriais e pela inestimável amizade feita ;

A **Maria Silvandira França Pinheiro** (Vandinha), pela competência, humildade e dedicação ao LAFICA;

Ao técnico de laboratório **Ivan** por ter contribuído de uma maneira amigável e competente para a realização dos experimentos

A **meus pais**, que sempre me incentivaram nos meus estudos e a quem eu devo todo o mérito de chegar aonde eu cheguei.

A minha esposa, **Cleivânia**, que comigo sempre viveu todas as fases do meu aprendizado, me apoiando nas etapas difíceis da confecção dessa dissertação.

Os meus agradecimentos a CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro a mim concedido para a realização do meu projeto de Mestrado.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
5HT1 A	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 1A
5HT1 B	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 1B
5HT1 D	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 1D
5HT2 A	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 2A
5HT2 B	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 2B
5HT2 C	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 2C
5HT3	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 3
5HT4	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 4
5HT5	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 5
5HT6	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 6
5HT7	Receptor da 5-hidroxitriptamina tipo 7
B1	Receptor da bradicinina tipo 1
B2	Receptor da bradicinina tipo 2
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
BK	Bradicinina
C5a	Fração 5a do complemento
CC	Quimiocinas compostas de dois resíduos de cisteínas adjacentes
Cg	Carragenina
cm	Centímetro
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
COX 2	Ciclooxigenase
CX3C	Quimiocina com o domínio CX3C
CXC	Quimiocinas compostas de uma aminoácido separando dois resíduos de cisteína
DAG	Diacilglicerol
DXT	Dextrana
ECM	Matriz extracelular
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico.
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média

GTP	Trifosfato de guanosina
H1	Receptor de histamina tipo 1
H2	Receptor de histamina tipo 2
H3	Receptor de histamina tipo 3
H4	Receptor de histamina tipo 4
ICAM-1	Moléculas de adesão intercelular 1
ICAM-2	Moléculas de adesão intercelular 2
IFN- γ	Interferon γ
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto nacional do câncer
iNOS	Oxido nítrico sintase induzível
ip	Intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1-4-5-trifosfato
LPS	Lipossacarídeo bacteriano
LT	Leucotrieno
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄
LTs	Leucotrienos
mL	mililitro
MMP 9	Metaloproteinase tipo 9
MMP-7	Metaloproteinase tipo 7
MMPs	Metaloproteinases
MNCF	Fator quimioatraente de neutrófilo derivado de macrófagos
MO	Microscópio ótico

MP-2	Metaloproteinase tipo 2
MPO	Enzima mieloperoxidase
MS	Ministério da saúde
NFκβ	Fator de transcrição nuclear κβ
NK1	Receptor de capsaicina tipo 1
nNOS	Oxido nítrico sintase neuronal
NO	Oxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PGD ₂	Prostaglandina D2
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMN	Polimorfonucleares
PPI ₂	Fosfatidilinositol-4-5-bifosfato
RL	Ringer-lactato
Sal	Salina
sp	Sub-plantar
SP	Substância P
TGF-β	Fator de crescimento de fibroblastos tipo β
Th1	Células t helper 1
Th2	Células t helper 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TRPV 1	Receptor vanilóide tipo 1
V-CAM	Molécula de adesão vascular
VEGF	Fator de crescimento derivado do endotélio
VPF	Fator de permeabilidade vascular
μg	Micro grama
μmol	Micro mol

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema da avaliação do edema de pata induzido por carragenina.....	33
FIGURA 2 - Esquema da avaliação do edema de pata induzido por dextrana.....	34
FIGURA 3 - Esquema da avaliação da atividade da enzima MPO após o estímulo inflamatório induzido por carragenina.....	36
FIGURA 4 - Esquema da avaliação da migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de ratos Wistar.....	38
FIGURA 5 - Crescimento do volume tumoral em ratos inoculados com carcinossarcoma 256 Walker na coxa direita.....	44
FIGURA 6 - Curva de sobrevida realizada em ratos inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker na coxa direita.....	45
FIGURA 7 - Efeito inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	47
FIGURA 8 - Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre o edema de pata induzido por dextrana.....	48
FIGURA 9 - Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a atividade de MPO, em patas de ratos estimuladas com carragenina.....	50
FIGURA 10 - Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.....	51
FIGURA 11 - Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por bradicinina.....	53
FIGURA 12 - Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por serotonina.....	54
FIGURA 13 - Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida pelo composto 48/80.....	55
FIGURA 14 - Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina.....	56
FIGURA 15 - Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por substância P.....	57
FIGURA 16 - Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por capsaicina.....	58
FIGURA 17 - Fotos da pele do dorso de animais avaliados quanto ao aumento da permeabilidade vascular induzido por diversos estímulos, no 4º dia após a inoculação do carcinossarcoma de Walker.....	59
FIGURA 18 - Fotos da pele do dorso de animais avaliados quanto ao aumento da permeabilidade vascular induzido por diversos estímulos, no 7º dia após a inoculação do carcinossarcoma de Walker.....	60
FIGURA 19 - Fotos da pele do dorso de animais avaliados quanto ao aumento da permeabilidade vascular induzido por diversos estímulos, no 10º dia após a inoculação do carcinossarcoma de Walker.....	61
FIGURA 20 - Efeito da inoculação do carcinossarcoma de walker sobre a degranulação de mastócitos de mesentério de rato induzida pelo composto 48/80“in vitro”.....	63
FIGURA 21 - Foto micrografia mostrando a degranulação de mastócitos do mesentério estimulada pelo composto 48/80 em animais controle (sem tumor) ou com tumor inoculado há quatro dias.....	64

- FIGURA 22** - Fotomicrografia mostrando a degranulação de mastócitos do mesentério estimulada pelo composto 48/80 em animais controle (sem tumor) ou com tumor inoculado há sete dias.....65
- FIGURA 23** - Fotomicrografia mostrando a degranulação de mastócitos do mesentério estimulada pelo composto 48/80 em animais controle (sem tumor) ou com tumor inoculado há dez dias.....66

RESUMO

Modificação da resposta inflamatória sistêmica em ratos inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker: papel da degranulação mastocitária. André Luiz dos Reis Barbosa. Dissertação submetida ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte Souza. Fortaleza, 2007.

No presente estudo avaliou-se os efeitos da inoculação do carcinossarcoma 256 de Walker, bem como o curso de seu desenvolvimento, sobre a reação inflamatória sistêmica. Ratos Wistar machos, pesando entre 180 a 220g, foram inoculados, por via intramuscular, com 10^6 células tumorais na coxa direita. Os experimentos foram realizados após o 4^o, 7^o e 10^o dias (4D, 7D e 10D) da inoculação do carcinossarcoma 256 de Walker. O grupo controle não foi inoculado as células tumorais. Os ratos foram divididos em grupos experimentais com $n = 6$, nos quais foram avaliados os seguintes parâmetros: edema de pata por carragenina (Cg; 300 μ g/pata direita) ou dextrana (Dxt; 500 μ g/pata direita), atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzidas por carragenina (Cg; 300 μ g/pata direita), permeabilidade vascular cutânea induzidas por bradicinina (2 μ g/sítio), histamina (30 μ g/sítio), serotonina (1 μ g/sítio), substância P (250ng/sítio), capsaicina (50 μ g/sítio) ou composto 48/80 (1 μ g/sítio) e degranulação mastocitária induzida por composto 48/80. A intensidade do edema foi avaliada na pata contralateral ao tumor 1, 2, 3 e 4 hs (Cg) e 30', 1, 2, 3, 4 hs (Dxt) por pletismometria. A migração de neutrófilos foi induzida pela administração de Cg (300 μ g/pata) na pata contralateral ao tumor ou na cavidade peritoneal. Após 4 horas, os ratos foram sacrificados e as peles das patas foram retiradas para medir indiretamente a infiltração de neutrófilos, pela técnica da dosagem da atividade da MPO, e a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal foi avaliada através da contagem total e diferencial de leucócitos. Em relação a permeabilidade vascular cutânea, imediatamente após as injeções intradérmicas dos estímulos (bradicinina, histamina, serotonina, substância P, capsaicina ou composto 48/80), foi administrado azul de Evans (0,1mL/100g do animal), na veia do plexo peniano. Após 30 min, os ratos foram sacrificados e a pele do dorso retirada, para avaliar o extravasamento do azul de Evans por espectrometria. A degranulação de mastócitos do mesentério foi avaliada após coloração com azul de toluidina, sendo contados os mastócitos degranulados num total de 100 células. Os animais com tumor apresentaram uma inibição significativa do edema de pata, com efeito máximo observado nos 7^o e 10^o dias, tanto com a Cg, quanto com Dxt, quando comparados com o controle sem tumor. Em nenhum dos dias estudados, foram observadas diferenças na atividade da MPO na pata e nem na avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzidas por Cg. Após 4 e 7 dias da inoculação do tumor, o animais apresentaram uma significativa diminuição na permeabilidade vascular cutânea induzida por bradicinina, serotonina, e composto 48/80. No entanto, o aumento da permeabilidade vascular induzida por histamina, substância P e capsaicina não foi alterada nesses dois dias. No 10^o dia, observou-se uma diminuição da permeabilidade vascular induzida por todos os estímulos quando comparado com o grupo sem tumor. A degranulação mastocitária foi inibida em animais com tumor nos 4^o, 7^o e 10^o dias em comparação com o grupo controle. Tais dados sugerem que o microambiente do tumor de Walker diminui o curso da resposta inflamatória através da inibição da degranulação dos mastócitos

Palavras-chaves: Tumor de Walker, micro ambiente tumoral, resposta inflamatória, mastócito.

ABSTRACT

Modification of the systemic inflammatory response in rats with carcinossarcoma 256 Walker: Role of mast cell degranulation. André Luiz dos Reis Barbosa. Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceara, (Pharmacology master science). Supervisor: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte Souza. Fortaleza, 2007.

Our objective was to evaluate the effect of the 256 Walker carcinossarcoma inoculation, as well as the time course of tumoral development, upon the acute inflammatory response in rats. Wistar rats, 180-220g, received intramuscular 10^6 tumor cells injections. At the end of 4, 7 or 10 days, wistar rats were separated into 4 groups, with 6 animals per group. The control group, were not inoculated with tumoral cells. Several parameters were evaluated: paw edema induced by carrageenan (Cg; 300 μ g/hind) or dextran (Dxt, 500 μ g/hind paw), myeloperoxidase activity (MPO), neutrophil migration to peritoneal cavity induced by carrageenan, cutaneous vascular permeability induced by bradykinin (2 μ g/site), serotonin (1 μ g/site), histamine (30 μ g/site), substance P (250ng/site), capsaicin (50 μ g/site) or 48/80 compound (1 μ g/site) and mast cell degranulation induced by 48/80 compound. Paw edema was evaluated in the contra lateral hind paw of the tumor and measured at 0, 1, 2, 3 and 4h for Cg, and 0, 30', 1, 2, 3 and 4h.for Dxt by plethysmometry. Neutrophil migration was induced by Cg injection in the contralateral hind paw or in the peritoneal cavity. After 4h, rats were sacrificed and the skin of the hind paw was harvested to measure neutrophil infiltration by MPO assay. Neutrophil migration induced by Cg was also evaluated in the peritoneal cavity, with the total e differential leucocytes counted. In order to measure cutaneous vascular permeability, immediately after intradermic stimulus injections (bradykinin, histamine, serotonin, substance P, capsaicin or 48/80 compound) Evans Blue dye was administrated (0,1mL/100g of per animal) by endovenous route. After 30 min rats were sacrificed and the skin was harvested to evaluate Evans Blue extravasations by spectrofotometry. Mast cells degranulation was evaluated in the in mesentery incubated with 48/80 compound and colored with toluidine blue. Our results shows that, in animals inoculated with the carcinossarcoma, there was a significant inhibition in the Cg and Dxt- induced paw edema, with maximal effect at the 7th and 10th days. There were no differences in MPO activity and neither in the peritoneal neutrophil infiltration induced by Cg in rats inoculated with the carcinossarcoma when compares to normal animals. After 4 and 7 days of the tumor inoculation, we observed a significant inhibition of the vascular permeability induced only by bradikinin, serotonin and 48/80 compound.. In the 10th day after the carcinossarcoma inoculation, there was a significant inhibition of the vascular permeability induced by all inflammatory stimulus tested, when we compared animals not inoculated. Mast cell degranulation was decreased in the 4th, 7th and 10th days after carcinossarcoma inoculation. These results suggested that the tumor microenvironment decreased the acute inflammatory response probably due to a inhibition of the mast cell degranulation.

Key words: Walker tumor, tumoral microenvironment, inflammatory process, mast cell.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais do processo inflamatório.....	1
1.2. Fenômenos vasculares da resposta inflamatória.....	2
1.3. Fenômenos celulares da resposta inflamatória.....	3
1.3.1. Neutrófilos.....	3
1.3.2. Macrófagos.....	6
1.3.3. Mastocitos.....	7
1.4. Mediadores inflamatórios.....	9
1.4.1. Histamina.....	10
1.4.2. Serotonina.....	11
1.4.3. Bradicininina.....	12
1.4.4. Substancia P.....	12
1.4.5. Eicosanóides.....	13
1.4.6 Oxido nítrico.....	14
1.4.7. Citocinas.....	14
1.4.8. Capsaicina.....	15
1.5. Importância do estudo do câncer.....	15
1.6. Tumor experimental.....	17
1.7. Carcissarcoma 256 de Walker.....	17

1.8. Micro ambiente tumoral.....	18
1.9. Inflamação e câncer.....	20
2. OBJETIVOS.....	24
3. METODOLOGIA.....	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Aparelhos e equipamentos laboratoriais.....	26
3.3 Soluções , drogas e corantes utilizados.....	27
3.4. Protocolo experimental.....	30
3.4.1. Implante do tumor de Walker.....	30
3.4.2. Determinação do volume tumoral.....	30
3.4.3. Sobrevida dos animais.....	31
3.4.4. Grupos experimentais.....	31
3.4.5. Edema de pata induzido por carragenina.....	31
3.4.6. Edema de pata induzido por dextrana.....	32
3.4.7. Avaliação da atividade de mieloperoxidase na pata.....	35
3.4.8. Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.....	37
3.4.9. Avaliação da permeabilidade vascular cutânea.....	39
3.4.10. Avaliação da degranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80 no mesentério de ratos wistar	40
3.4.11. Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Determinação do crescimento do volume tumoral e da curva de sobrevida dos ratos inculados com o tumor de Walker.....	43
4.2. Efeito da inoculação do carcinossarcoma de Walker sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	46

4.3. Efeito da inoculação do carcinossarcoma de Walker sobre o edema de pata induzido por dextrana.....	46
4.4. Efeito da inoculação do carcinossarcoma de Walker sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em pata de ratos estimuladas com carragenina.....	49
4.5. Efeito da inoculação do carcinossarcoma de Walker sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.....	49
4.6. Efeito da inoculação do carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por bradicinina, serotonina, composto 48/80, histamina, substância p ou capsaicina.....	52
4.7. Efeito da inoculação do carcinossarcoma de Walker sobre a degranulação de mastócitos do mesentério induzida pelo composto 48/80.....	62
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	68
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	80
8. ANEXOS.....	93

I. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Os primeiros relatos sobre o processo inflamatório datam desde 3000 anos a.C porém foi Cornélius Celsius que, no início da era cristã, descreveu os quatro sinais principais da resposta inflamatória: dor, calor, rubor e edema. Posteriormente, a inatividade funcional foi acrescentada por Virchow como sendo o quinto sinal da inflamação (ROCHA e SILVA, 1978).

A resposta inflamatória pode ser gerada por traumas, complexos antígenos-anticorpos, patógenos e por uma gama de mediadores, inclusive neurotransmissores que são liberados por terminações nervosas. Esse fenômeno pode ser dividido em fase aguda e fase crônica (ROBBINS et al., 1994).

A fase aguda da resposta inflamatória pode ser caracterizada por ser de curta duração. Possui três componentes principais: às alterações do calibre dos vasos, alterações das estruturas da microvasculatura e migração de leucócitos da micro circulação para o foco da lesão (ROBBINS et al., 1994).

A fase crônica do processo inflamatório é aquela considerada de duração prolongada. Nesta fase ocorre inflamação ativa, destruição tecidual e tentativa de reparação. Além disso, ocorre também infiltração de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e angiogênese (ROBBINS et al., 1994).

1.2. FENÔMENOS VASCULARES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Os fenômenos vasculares que ocorrem nas reações inflamatórias consistem em alterações do fluxo sanguíneo, calibre e permeabilidade vasculares. O processo tem início com contração arteriolar, seguido de vaso dilatação, recrutamento de novos leitos vasculares e aumento do fluxo sanguíneo na região afetada pelo estímulo inflamatório. O aumento da permeabilidade na micro circulação permite a fuga de líquido plasmático rico em proteínas, reduzindo a pressão oncótica intravascular e aumentando a pressão oncótica intersticial. Este fenômeno, associado ao aumento da pressão hidrostática, secundário a vaso dilatação, leva a um extravasamento acentuado de líquido para o espaço intersticial constituindo o edema (ROBBINS et al., 1994).

Como podemos observar, para que ocorram todos estes eventos descritos é fundamental que ocorram alterações no endotélio para explicar as modificações observadas no mesmo. Existem alguns mecanismos que foram propostos por Majno (1992) e modificados por Collins (1999). O primeiro deles consiste na formação de fendas no endotélio das vênulas e é alcançado pela ação da histamina, bradicinina (BK), leucotrienos (LT), substância P e vários outros mediadores químicos. O aumento de permeabilidade ocorre rapidamente após a exposição ao mediador e consiste em um evento de curta duração (15 a 30 minutos); este mecanismo afeta apenas as vênulas (MAJNO & PALADE, 1961; BOWDEN et al, 1996). Uma outra forma de modificação que pode ocorrer no endotélio é a reorganização do cito esqueleto com retração endotelial, que pode ser induzida *in vitro* por algumas citocinas – como IL-1, TNF- α e interferon- γ (IFN- γ) – por hipóxia e por injúrias sub-letais às células endoteliais. Em contraste ao efeito da histamina, a resposta é normalmente retardada (4 a 6 horas) e de longa duração (24 horas ou mais); ainda permanece incerta a hipótese de que este mecanismo contribua para o aumento da permeabilidade *in vivo* (BRETT et al, 1989).

Além desses mediadores, existem outros que são coadjuvantes no processo de vaso dilatação como, por exemplo, o óxido nítrico (NO) , que causa potencial vaso dilatação e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2) e também produz o PAF. O PAF além de causar considerável vaso dilatação, provoca eritema e formação de pápulas (DALE et al., 2003).

1.3. FENÔMENOS CELULARES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

O mecanismo principal de defesa do organismo contra agentes lesivos e de reparo dos tecidos lesionados é o da resposta inflamatória celular

Dentre as células envolvidas na inflamação, algumas estão presentes normalmente nos tecidos (mastócitos, macrófagos), enquanto outras (plaquetas e leucócitos) têm acesso à área da inflamação, a partir do sangue (DALE et al., 2003). Além dessas células, as células do sistema linfático também participam do evento celular do processo inflamatório (células dendríticas e interdigitantes).

1.3.1. NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos constituem os primeiros leucócitos sanguíneos a alcançar a área da resposta inflamatória. Essas células aderem ao endotélio vascular através de uma interação entre as moléculas de adesão presentes nas células endoteliais, como, por exemplo, a família da selectinas, com moléculas correspondentes sobre o neutrófilos como, por exemplo, a família das integrinas (DALE et al., 2003).

Os neutrófilos produzem citocinas e quimiocinas, que atraem outros neutrófilos e outras células do sistema imune. Essas células são de extrema importância para o controle do

desenvolvimento local bacteriano e, conseqüentemente, prevenção da disseminação bacteriana (DALSECCO et al., 2006).

A seqüência de eventos na jornada dos leucócitos da luz para o tecido intersticial, pode ser dividida nas seguintes etapas: 1. Marginação, rolagem e aderência; 2. Diapedese; 3. Migração para os tecidos. A migração de neutrófilos é mediada por citocinas pro - inflamatórias, como TNF- α , IL-8 e fator quimioatraente de neutrófilo derivado de macrófagos (MNCF) (CUNHA et al., 2000). A diapedese dos neutrófilos do lúmen dos vasos capilares para o espaço extra vascular é um processo que resulta da ação conjunta de várias moléculas de adesão celular, classificadas em quatro famílias: integrinas, imunoglobulinas, glicoproteínas e selectinas. Essas moléculas facilitam a interação de leucócitos polimorfunucleares com o endotélio.

Essa interação dos neutrófilos com o endotélio venular é fraca. Esse evento e a lentificação do fluxo sanguíneo, resulta no rolamento dos polimorfunucleares sobre o endotélio venular. As selectinas P e E do endotélio e as selectinas L dos leucócitos são as proteínas responsáveis por este contato inicial. As selectinas P e E são glicoproteínas de membrana cujos domínios lectínicos, que são dependentes de cálcio, ligam-se às porções siálicas de oligossacarídeos, que estão presentes em glicoproteínas da superfície de leucócitos (McEVER, 1991; VARKI, 1992). A expressão dessas proteínas de adesão que são indispensáveis para o início do processo inflamatório, é estimulada por histamina, trombina, PAF (ROBBINS et al., 1994) e TNF - α .

A E-Selectina é uma glicoproteína específica de membrana das células endoteliais, que tem como função mediar à rolagem lenta e a estabilização do arraste dos leucócitos no endotélio durante a inflamação. Essa selectina possui um domínio amino - terminal tipo C. Há uma evidencia de que a E-Selectina tem uma significativa importância no processo de

angiogênese. Essa proteína está envolvida com eventos essenciais do processo angiogênico como, proliferação celular, migração e neovascularização (YU et al., 2004).

A adesão acontece quando se estabelece a firme ligação entre as β_2 integrinas (p.ex. CD11a/CD18, CD11b /CD18 e CD11c/CD18) dos leucócitos e as moléculas de adesão intercelulares da classe das imunoglobulinas (ICAM-1 e ICAM-2) na superfície do endotélio (McEVER, 1992; CRONSTEIN & WEISSMANN, 1993).

Após o extravasamento, os leucócitos emigram dos tecidos em direção ao local da lesão. Substâncias endógenas e exógenas podem atuar como quimioatraentes. Os agentes exógenos mais comuns são os produtos bacterianos como lipossacarídeo bacteriano (LPS). Os mediadores químicos endógenos incluem componentes do complemento (C5a), produtos da via da lipoxigenase, principalmente leucotrieno B₄ e citocinas, e quimiocinas (ROBBINS et al., 1994). A ligação de agentes quimiotáticos a receptores específicos nas membranas celulares dos leucócitos resulta na ativação da fosfolipase C, mediadas por proteínas G singulares, levando á hidrólise de fosfatidilinositol-4-5-bifosfato (PPI₂) em inositol-1-4-5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), e posterior liberação de cálcio, primeiro das reservas intracelulares e, depois, por influxo de cálcio extracelular. A elevação do cálcio citosólico suscita a montagem dos elementos responsáveis pelo movimento celular. O mecanismo de defesa do organismo desenvolvido pelos neutrófilos, após a sua migração para o local da lesão, consta da produção de espécies reativas de oxigênio, como anion superóxido (O₂⁻) e a espécie extremamente oxidante e reativa derivada do NO que é o anion peroxinitrito (ONOO⁻) (GREENACRE et al., 2002), além da fagocitose de partículas (ROBBINS et al., 1994).

1.3.2. MACRÓFAGOS

Os macrófagos fazem parte do sistema fagocítico mononuclear, composto por células que são idênticas em relação as suas características morfológicas, imunológicas e funcionais. As células desse sistema são oriundas da medula óssea, a partir de um precursor comum, que dá origem aos monócitos da corrente sanguínea, que nos tecidos se transformam em macrófagos. A meia-vida do monócito sanguíneo é de cerca de um dia, enquanto os macrófagos teciduais podem durar vários meses (ROBBINS et al., 1994).

Nos tecidos, os monócitos são transformados em macrófagos. São encontradas células semelhantes, todas pertencentes ao sistema de fagócitos mononucleares, em vários tecidos, que provavelmente derivam de monócitos circulantes (DALE et al., 2003). TNF- α é responsável pela maturação de monócitos a macrófagos residentes.

Dentre os fatores quimioatraentes para macrófagos incluem: C5a, quimiocinas produzidas por macrófagos ativadas (MCP-1), certos fatores do crescimento como o TGF- β , fragmentos da degradação de colágeno e fibronectina (ROBBINS et al., 1994). Adicionalmente, diversos estímulos exógenos, como as injeções de substâncias irritantes ou de microorganismos podem alterar a divisão, recrutamento e provocar uma grande migração de macrófagos (VAN FURTH, 1978).

No princípio do processo inflamatório, os macrófagos funcionam como células de alarme, informando a presença de estímulos injuriantes nos tecidos e liberando mediadores envolvidos na fagocitose, migração de leucócitos, dor e resposta imunológica (FERREIRA et al., 1993).

O macrófago é uma figura central no processo inflamatório crônico devido ao grande número de substâncias que o macrófago ativado produz. Algumas dessas substâncias são tóxicas para a célula como, por exemplo, o NO. Outras causam influxo de outros tipos celulares como, por exemplo, citocinas, quimiocinas e outras causam proliferação de fibroblastos, depósito de colágenos e angiogênese (ROBBINS et al., 1994).

MASTÓCITOS

Os mastócitos estão localizados primariamente nas mucosas e nas áreas perivasculares de vários tecidos. Eles são de fundamental importância para a reação imune e estão presentes no local do processo inflamatório, junto de outras células responsáveis pelo desencadeamento da resposta inflamatória, como por exemplo, macrófagos. Evidências sugerem que moléculas existentes na superfície da membrana dessas células são de fundamental importância para o acúmulo, destruição e regulação de leucócitos no local do processo inflamatório (VALENTE et al., 1989). Existe uma heterogeneidade entre as populações de mastócitos de diferentes tecidos e espécies, sendo os mastócitos da cavidade peritoneal de ratos, aqueles frequentemente utilizados como modelo de um mastócito genérico (KOIVISTO et al., 1999).

Durante certas respostas imunes, mastócitos e células T podem ser ativadas simultaneamente por mecanismos independentes. Células T ativadas podem induzir mastócitos a secretar histamina, TNF- α e metaloproteinase 9 (MMP 9). É conhecido que, certos produtos da degranulação mastocitária podem influenciar na função das células T. Os mastócitos são produtores em potencial de TNF- α , com isso eles podem controlar o recrutamento, ativação e função das células T. A histamina, que é o mediador que existe em maior quantidade nos mastócitos humanos, promove a ativação de células Th1 e Th2. Estudos recentes mostraram que LTB₄, que é produzido por mastócitos, regula a migração de células T (NAKAE et al., 2005).

O fator de crescimento endotelial (VEGF) e o fator de permeabilidade vascular (VPF) da linhagem de mastócitos da pele humana (MHC-1) parecem estar envolvidos no processo de neovascularização, com sua exata participação ainda não sendo clara (GRÜTZKAU et al., 1998).

Na tentativa descobrir os mecanismos de degranulação dos mastócitos, chegou-se a revelar a existência de dois tipos de mecanismos: o de liberação rápida ou degranulação anafilática, que se completa alguns minutos após o estímulo e é caracterizado pela fusão coordenada dos grânulos e posterior secreção dos mediadores, e um segundo mecanismo de esvaziamento lento dos grânulos, que é caracterizado pela ausência de fusão intergranular (DVORAK, 1997).

Os passos bioquímicos que envolvem a degranulação anafilática são apenas parcialmente conhecidos; supõe-se que a ligação cruzada das IgEs ao antígeno ative uma proteína G de ligação a guanosina trifosfato (GTP), que, por sua vez, provoca a ativação de uma PLC (fosfolipase C) específica para o bi fosfato de fosfatidilinositol (PIP₂). Essa enzima catalisa a liberação de IP₃ e de DAG do PIP₂ de membrana. O IP₃ promove a liberação do cálcio intracelular do retículo endoplasmático. Cálcio e DAG combinam-se com fosfolípidos de membrana para a ativação da proteína quinase. Com o aumento da concentração citoplasmática de cálcio, ocorre ativação de enzimas, como a PLA₂; além disso, o complexo cálcio-calmodulina é capaz de ativar a quinase de cadeia leve de miosina. Nos mastócitos, o resultado desta ativação é a geração de mediadores lipídicos, como as PGs e LTs bem como a exocitose dos grânulos. (ABBAS et al., 1997).

Mastócitos quando ativados secretam por exocitose, histamina, catepsina G e carboxipeptidases. Sintetizam também PGE₂, LTD₄, LTE₄, LTB₄, LTC₄, PAF. Iniciam processos de transcrição, e secreção de citocinas como IL-4, IL-8, IL-6, IL-5, TNF- α (GALLI et al., 1991; COSTA et al., 1998). A 5-Hidroxitriptamina (Serotonina) está pré-formada em mastócitos e plaquetas de roedores, mas não está presente em mastócitos e plaquetas humanas.

Contudo, os mastócitos são considerados células amplificadoras da reação inflamatória por liberarem e por estimularem a produção de muitos dos mediadores químicos da inflamação.

Estes mediadores, por sua vez, podem atuar aumentando a permeabilidade vascular ou mesmo contribuindo para a migração e ativação de leucócitos durante a fase mais tardia da inflamação.

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Os mediadores químicos participam de todos os passos do processo inflamatório, como descrito anteriormente. Collins (1999) definiu as principais características das moléculas mediadoras da inflamação. Os mediadores originam-se do plasma ou de células. Os mediadores oriundos do plasma, como por exemplo, o sistema complemento, estão presentes na sua forma precursora inativa, que deve ser ativada, normalmente por uma série de clivagens proteolíticas, para que a molécula adquira suas propriedades biológicas. Já aqueles dependentes de células, são normalmente estocados em grânulos intracelulares, que precisam ser secretados (como a histamina presente nos mastócitos) ou são sintetizados “de novo” (como as citocinas) em resposta a um estímulo. As células que originam esses mediadores são normalmente as plaquetas, os neutrófilos, os monócitos, os macrófagos e mastócitos, porém, células mesênquimais (endotélio, músculo liso, fibroblastos) e epiteliais podem também ser induzidas e gerar alguns desses mediadores.

Os principais mediadores de ação farmacológica são: histamina, serotonina, bradicinina, neuropeptídeos, como por exemplo, a substância P(SP), eicosanóides, NO e citocinas (DALE et al., 2003). A capsaicina não é um mediador inflamatório, mas ela será citada como um potente estimulador experimental da resposta inflamatória. Abaixo será descrito algumas das principais ações desses mediadores tão importantes para a resposta inflamatória.

HISTAMINA

Histamina é sintetizada por basófilos humanos, mastócitos, linfócitos, neurônios e células gástricas enterocromafins .

A interação da histamina com o receptor H1 medeia uma variedade de efeitos associados com os sintomas da anafilaxia e doenças alérgicas (SIMON et al., 1994; SIMON et al., 1997). A histamina contribui para a progressão das respostas inflamatória e alérgica através da produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-6, IL-8 (BAYRAM et al. 1999; JEANNIN et al., 1994; VANIER e DINARELLO, 1993)

Existem quatro receptores de histamina (MILLER & NELSON, 1989). Esses receptores são do tipo acoplado á proteína G. O receptor H1, quando ativado, produz muitos sintomas e sinais da doença alérgica na pele, nariz e vias aéreas. Ele está presente no músculo liso vascular, neutrófilos, eosinófilos e células B e T. O receptor H2 está presente nas células gástricas, células nervosas, hepatócitos e a sua estimulação aumentam a liberação da secreção ácida gástrica (DALE et al., 2003). Células endoteliais expressam receptores H1 e H2 e através da ação sobre receptores H1, a histamina aumenta a expressão das moléculas de adesão como I-CAM, V-CAM e P-selectina (YAMAKI et al.,1998; KUBES & KANWAR , 1994). Modulando a ação desses receptores a nível vascular ela exerce forte influencia no processo inflamatório (SCHAEFER et al., 1999).

O receptor H3 foi identificado no sistema nervoso central e periférico, sendo receptores pré-sinápticos responsáveis pelo controle da produção da histamina e de outros neurotransmissores (DIMITRIADOU et al., 1994). O receptor H4 se mostra fortemente presente na medula óssea, células hematopoiéticas periféricas, neutrofilos, eosinófilos, timo e coração (NAKAMURA et al., 2000). Basófilos e mastócitos expressam receptor H4. (ZHU et

al., 2001). A estimulação desse receptor promove acúmulo de células inflamatórias (eosinófilos e mastócitos) no local da inflamação alérgica (NAKAMURA et al., 2000).

1.4.2. SEROTONINA

A serotonina foi descoberta em 1948 e foi identificada quimicamente no plasma, como 5-hidroxitriptamina(5-HT). Posteriormente, foi encontrada no trato gastrintestinal e no sistema nervosa central (DALE et al., 2003). Esse neurotransmissor é um mediador vaso ativo pré-formado com ações similares a da histamina (ROBBINS et al., 1994). Essa substância vasoativa é produzida por mastócitos (roedores), plaquetas e basófilos (DRAY, 1995). Seus principais receptores são 5HT1 A, 5HT1 B, 5HT1 D, 5HT2 A, 5HT2 B, 5HT2 C, 5HT3, 5HT4, 5HT5, 5HT6 e 5HT7.

Os receptores 5HT1 quando estimulados, produzem inibição neuronal, ansiedade, vaso constrição pulmonar, vaso constrição cerebral. Os receptores 5HT2 na presença de um agonista, produzem excitação neuronal e contração de músculo liso cerebral. Os receptores 5HT3 quando ativados produzem excitação neuronal, êmese e efeitos comportamentais. O receptor 5HT4 quando estimulado possui efeito na motilidade gastrintestinal. As ações dos receptores 5HT5, 5HT6 e 5HT7 permanecem desconhecidas (DALE et al. 2003).

Assim como a histamina, a serotonina é de fundamental importância para a potencialização da resposta inflamatória, pois age sobre os vasos, causando em alguns deles vasodilatação e também age sobre as terminações nervosas, gerando a inflamação neurogênica.

BRADICININA

A bradicinina é um peptídeo vaso ativo formado pela ação de enzimas sobre substratos protéicos, denominados cininogênios. Essa substância é formada a partir do cininogênio de alto peso molecular no plasma, sob a ação da calicreína (DALE et al., 2003).

A bradicinina é capaz de produzir muito dos fenômenos da resposta inflamatória como, por exemplo, dor, vaso dilatação, aumento da permeabilidade vascular e espasmo da musculatura lisa vascular.

Essa substância possui dois receptores: B1 e B2. O receptor B1 esta presente na maioria dos tecidos normais. Esses receptores respondem ao metabólito da bradicinina e podem desempenhar um importante papel na inflamação e hiperalgesia. Os receptores B2 estão constitutivamente presentes em muitas células e tecidos normais (DALE et al., 2003).

A bradicinina provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular por produzir PGI₂ e liberação de NO (DALE et al., 2003).

SUBSTÂNCIA P

Os neuropeptídeos liberados de neurônios sensitivos contribuem para a reação inflamatória. A substancia P atua sobre mastócitos, liberando histamina e outros mediadores, e produzem contração da musculatura lisa vascular (DALE et al., 2003). Essa substância está expressa em células endoteliais, em diferentes tipos de células inflamatórias e imunológicas e células musculares lisas das vias áreas e intestino (KHAN & COLLINS, 1994; MAGHNI et al., 2003). Os receptores da substância P são receptores de membrana acoplados a proteína-G (NAKANISHI, 1991; GERARD et al., 1993; KRAUSE et al., 1994). Como exemplo desses receptores temos NK 1, NK 2 e NK 3 (GERARD et al . , 1991; TAKEDA et al . , 1991 ; TAKANISHI et al . , 1992 ; Buell et al . , 1992).

A substância P pode regular a resposta inflamatória e imune não somente por mecanismo neuronal, mas também por mecanismo não neuronal, como estimulando a ação de células inflamatórias (macrófagos e eosinófilos). A presença de substância P (SP) nessas células permite ocorrer um aumento da resposta inflamatória.

EICOSANOIDES

Ao contrário da histamina, os eicosanóides não são encontrados pré-formados nos tecidos, sendo produzidos a partir de fosfolipídios da membrana. Eles são os mediadores e moduladores mais importantes da resposta inflamatória. Os principais eicosanóides são as prostaglandinas, leucotrienos e os tromboxanos (DALE et al., 2003).

Os prostanóides (tromboxanos e prostaglandinas) e leucotrienos são derivados do ácido araquidônico pelas ações das enzimas ciclooxigenases e lipooxigenase respectivamente. (SMITH et al., 2000).

Nas áreas de inflamação aguda, os principais prostanóides encontrados são a PGE_2 e a PGI_2 . Essas prostaglandinas são produzidas nos tecidos lesionados e vasos sanguíneos, enquanto os mastócitos produzem e liberam PGD_2 (DALE et al., 2003).

Os leucotrienos são outros tipos eicosanóides. Eles são gerados pela ação da lipooxigenase sobre o araquidonato. A lipooxigenase envolvida é a do tipo 5.

Os leucotrienos são importantes para a resposta inflamatória, pois induzem nos neutrófilos a expressão de moléculas de adesão da membrana e aumenta a produção de produtos tóxicos de oxigênio, bem como a liberação de enzimas proteolíticas (DALE et al., 2003). Os cisteinil leucotrienos (LTD_4 , LTC_4 , LTE_4) possuem ações sobre os sistemas respiratórios e cardiovasculares.

ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é formado na atmosfera durante tempestades com relâmpagos. É também formado de maneira notável como segundo mensageiro em muitas células, como nervos, músculo liso, monócitos e plaquetas (DALE et al., 2003).

As enzimas responsáveis pela sua produção são as NO sintases. Existem três isoformas de NO sintase: nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) e a iNOS. As duas primeiras são constitutivas e a segunda, que é induzida, é expressada durante o processo inflamatório (NATHAN et al., 1994)

O VEGF promove produção de NO através da ação da enzima iNOS. A diminuição da produção de NO resulta na redução da angiogênese e permeabilidade vascular induzida por VEGF (MUROHARA et al., 1998; ZICHE et al., 1997).

Essa substância possui importante ação inflamatória, pois é um potente vasodilatador, e contribui para a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (DALE et al., 2003).

CITOCINAS

São mediadores protéicos ou peptídicos, liberados pelas células do sistema imune. Essas substâncias possuem efeito tanto inflamatório quanto antiinflamatório. A super família de citocinas inclui: interleucinas, quimiocinas, interferons, fatores de estimulação de colônias, fatores de crescimento. As citocinas pró-inflamatórias são aquelas que participam da inflamação crônica ou aguda. Dentre as citocinas pró-inflamatórias conhecidas destacam-se o TFN- α e a IL-1. Dentre as citocinas antiinflamatórias podemos citar o TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13. Essas citocinas podem inibir a ação de quimiocinas e a ação de células Th1 (DALE et al., 2003).

CAPSAICINA

A Capsaicina é um derivado de um tipo de pimenta picante que quando utilizado, causa dor e desencadeia mecanismos de inflamação (SZALLASI et al . , 1999).

Essa substância atua sobre o receptor vanilóide tipo 1 (TRPV 1). Esse receptor pode ser ativado não só pela capsaicina, mas também por ácido e por vários lipídeos (CATERINA et al., 2001).

A capsaicina não causa somente dor, que é decorrente da excitação das terminações nervosas livres. Essa substancia também causa analgesia, principalmente quando usada para o tratamento da dor neuropática diabética e da dor da artrite reumatóide. Essa ação paradoxal dessa substância é devido à dessensibilização das terminações nervosas.

1.5. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DO CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecido e órgãos, podendo gerar metástases para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, essas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis determinando na formação de tumores (acúmulo de células cancerosas). Diferentemente, um tumor benigno é uma massa localizada de células que se multiplica mais lentamente e são semelhantes ao seu tecido original, raramente constituindo um risco à vida.

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das

vezes, geneticamente pré-determinadas, estando ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) do Ministério da Saúde (MS) estima para o ano de 2002, em todo o Brasil, a ocorrência de 337.535 novos casos de câncer e 122.600 óbitos devidos à doença. Desse total, 165.895(49,1%) casos e 66.060 (53,9%) óbitos serão para o sexo masculino e 171.640(50,9%) casos e 56.540 (46,1%) óbitos para o sexo feminino. Estima-se que o principal câncer a acometer a população brasileira será o câncer de pele não melanoma (62.190 casos – 18,4%), seguido pelas neoplasias malignas da mama feminina (36.090 casos – 10,7%), câncer de próstata (25.600 casos – 7,6%), de pulmão (21.425 casos – 6,3%) e de estômago (20.420 casos – 6,0%) (BRASIL, 2002).

A análise por sexo demonstra que as maiores taxas de incidência entre os homens serão devido ao câncer de pele não-melanoma (36,57/100 mil), próstata (29,76/100 mil), pulmão (17,45/100 mil) e estômago (16,14/100 mil), enquanto que entre as mulheres, destacam-se as neoplasias malignas da mama (40,66/100 mil), câncer de pele não-melanoma (34,56/100 mil), colo do útero (19,82/100 mil), cólon e reto (11,04/100 mil) e estômago (7,38/100 mil) (BRASIL, 2002).

Devido ao alto índice de desenvolvimento do câncer e a relação dessa patologia com um grande numero de óbitos no país e no mundo, fez-se necessário estudos mais apurados dessa doença. Esses estudos foram realizados com auxílios de técnicas laboratoriais, onde se induziram processos cancerígenos e realizaram protocolos experimentais e estudos dessa doença em animais experimentais e em seres humanos com a finalidade de desvendar os possíveis mecanismos pelos quais o câncer causa morte e incapacitação em seres humanos.

1.6. TUMOR EXPERIMENTAL

Um dos principais obstáculos enfrentados pelos pesquisadores que vêm tentando estudar os tumores experimentais é a falta de disponibilidade de um modelo de câncer experimental adequado. O desenvolvimento de tumores experimentais a partir de carcinógenos químicos tem se mostrado pouco prático em função da demora e do crescimento errático destas neoplasias (RAY et al., 1961; BRAGHETO, 1984). Para se estabelecer experimentalmente a eficácia de novas terapias anti-cancer é necessário utilizar um modelo de câncer experimental em animal que tenha uma boa pega tumoral e que seja de fácil manuseio nos testes laboratoriais. O Carcinossarcoma 256 de Walker, descrito por Earle 1935, por suas características, parece ser o ideal para os objetivos propostos. Trata-se de um tumor experimental bem caracterizado, facilmente mantido em laboratório, de crescimento rápido e uniforme, que raramente apresenta regressão espontânea, sendo comprovada eficácia em testes laboratoriais (MORAES FILHO, 1981). Baseado nestas características desenvolveu-se modelos experimental para se avaliar a resposta inflamatória aguda, após a instalação desta neoplasia.

1.7. CARCINOSSACOMA 256 DE WALKER

O tumor foi descoberto no ano de 1928, quando George Walker, no seu laboratório da Universidade Johns Hopkins, observou uma massa tumoral localizada na glândula mamaria de uma rata albina prenha , segundo descrição própria, regredia durante o período de lactação e depois voltava a recrudescer. A histopatologia revelou um adenocarcinoma e sua transplantabilidade foi comprovada por Walker com um índice de aproximadamente 56% de pega em 16 ratos albinos (EARLE, 1935).

Walker & Earle, em 1935, descreveram macroscopicamente a neoplasia como uma massa tumoral aproximadamente do tamanho de noz, localizada na região abdominal esquerda.

Microscopicamente, mostrou-se como uma estrutura tipicamente carcinomatosa, com o estroma constituído de tecido conjuntivo frouxo. As células principais apresentaram forma poligonal ou arredondada, com núcleos volumosos, redondos ou ovais.

Na segunda geração, desorganizou-se a estrutura glandular e as células epiteliais continuavam com as mesmas características. As células do estroma apresentavam-se de dois tipos diversos: um de tamanho pequeno, alongado e com núcleo densamente corado, e outro bem mais volumoso, alongado e com núcleo fracamente corado (EARLE, 1935).

Após sucessivos implantes, o tumor apresentou variações alterações morfológicas (EARLE, 1935; SCHREK & AVERY, 1937; TALALAY et al., 1952; STEWART e al . , 1959). O tumor foi encontrado nas formas carcinomatosa, sarcomatosa e mista, e carcinosarcomatosa.

MICROAMBIENTE TUMORAL

O micro ambiente tumoral é composto de células tumorais, células do sistema imune, células do estroma e matriz extracelular, e é considerado o local onde ocorre o processo neoplásico de proliferação e migração de células tumorais. A interação patológica entre as células cancerígenas e as células do estroma do hospedeiro desencadeia uma série de mecanismos que são essenciais para o crescimento tumoral. As células tumorais podem reagir com o estroma tornando-o permissivo a progressão do tumor. Após isso, as células tumorais geram um microambiente de suporte para o seu desenvolvimento através de fatores de crescimento derivado do estroma tumoral. Dentre os fatores produzidos estão O bFGF, VEGF, PDGF, EGFR, citocinas e TGF β (WEMER et al., 2003). Esses fatores rompem a homeostasia

tecidual normal e induzem reações do estroma, como, a angiogênese e a resposta inflamatória (L M. et al., 2002). Esses fatores liberados pelas células do estroma ativam as células circunvizinhas ao estroma, como, fibroblastos, células musculares lisas e adipócitos (DE WEVER et al., 2003; MANABE et al., 2003).

A remodelação da matriz extracelular (ECM) torna o micro ambiente propenso à migração e a invasão das células tumorais. As células tumorais malignas induzem a produção de colagenase pelo estroma tumoral, enquanto as células normais não produzem. No processo de remodelação da ECM, as proteases metaloproteinases (MMPs) contribuem para a intensa ligação entre células tumorais e o micro ambiente. A expressão dessas proteases é modulada pelo micro ambiente do estroma. As metaloproteinases 1 e 9 são expressas em células tumorais, mas não em células normais.

TGF β e PDGF são os dois fatores de crescimento que são secretados por células tumorais que medeiam à interação das células cancerígenas e os fibroblastos do estroma. Juntos, esses dois fatores são importantes no desenvolvimento da desmoplasia.

O estroma tem, portanto, uma participação direta no processo tumoral e a sua normalização pode reverter à progressão do tumor.

1.9. INFLAMAÇÃO E CÂNCER

Em 1863 Rudolf Virchow verificou a presença de leucócitos nos tecidos neoplásicos e fez uma conexão entre inflamação e câncer. A inflamação crônica foi identificada como um importante fator de risco para a neoplasia maligna (GIRIDK et al. 2004; MANTOVANI et al.,

2005; COUSSENS et al., 2002), pois existe uma correlação direta entre algumas afecções crônicas e malignidade como, por exemplo, HPV e câncer no colo uterino, *Helicobacter pylori* e câncer gástrico e cirrose e carcinoma hepatocelular

Várias substâncias que possuem uma importância significativa no desenvolvimento do processo inflamatório também possuem importância no desenvolvimento do processo tumoral. Dentre elas podemos citar o TNF- α , interleucinas, quimiocinas, ciclooxigenases, lipooxigenases, metaloproteinases e NF κ B.

O TNF- α induz a proliferação celular, a transformação celular e a promoção tumoral (COUSSENS et al., 2002; BALKWILL F, 2002). Além do seu efeito indutivo, essa citocina também é produzida por células tumorais, como por exemplo, células B de linfomas, células T de linfoma cutâneo, carcinoma de cólon, carcinoma pulmonar e câncer pancreático (DIGEL et al., 1989, 1990; KALTHOFF et al., 1993; SSHMIEGEL et al., 1993).

Essa citocina parece estar envolvida no aumento da produção do VEGF por macrófagos, sendo esse fator de fundamental importância para o desenvolvimento da tumorigênese.

As interleucinas desempenham um papel fundamental na tumorigênese. As principais interleucinas envolvidas nesse processo são a IL-1, IL-6, IL-8 e IL-18. A secreção de IL-1 está relacionada com o desenvolvimento de carcinoma cervical (VANHAMME et al., 1993). A IL-6 atua como um fator de desenvolvimento múltiplo para o mieloma (KLEIN et al., 1989; VOORZANGER et al., 1996; OKAMOTO et al., 1995; LANDI et al., 2003; ÂNGELO et al., 2002). A IL-8 promove o desenvolvimento e a metástase de vários tipos de câncer além de estar envolvida no processo de iniciação tumoral e neovascularização. IL-18 está envolvida na progressão da doença leucêmica (KOTHAPALLI et al., 2005).

As quimiocinas participam diretamente do processo tumoral, pois induzem angiogênese, inflamação, recrutamento celular e migração celular. As principais quimiocinas envolvidas são: CC, CXC e a CX3C (CHARO et al., 2006).

A ciclooxigenase envolvida no processo tumoral é a ciclooxigenase do tipo 2 (COX 2), uma enzima induzida, com a sua expressão controlada por $\text{NF}\kappa\beta$. A expressão dessa enzima em vários cânceres humanos pode ser induzida por vários fatores de crescimento, citocinas e outros fatores.

A lipooxigenase tipo 5 está envolvida no processo de carcinogênese tanto em humanos quanto em animais. Essa enzima estimula a produção de fatores essenciais para a tumorigênese como MP-2 e VEGF (BOADO et al., 1992).

As metaloproteinases (MP) são responsáveis pela modulação de vários eventos biológicos durante os processos pato fisiológicos, dentre os quais estão incluídos angiogênese, migração celular, inflamação e câncer. Em tumores a presença da MMP-9 caracteriza a infiltração de células inflamatórias no micro ambiente tumoral. A MMP-7 promove invasão de células tumorais por destruir substratos da matrix extra celular e ativar outras MMPs (EGEBLAD et al., 2002 ; VAN'T VEER et al., 2002).

O $\text{NF}\kappa\beta$ através da sua transcrição modula muitas substâncias tumorigenicicas como, por exemplo, $\text{TNF-}\alpha$, interleucinas, citocinas e COX-2 (SHISHODIA, 2004). O bloqueio dessa substância inibe a angiogênese e a tumorigenicidade em câncer de ovário humano, por suprimir a expressão de VEGF e IL-8 (HUANG et al., 2000).

Tendo em vista a estreita relação entre o processo tumoral e o desenvolvimento da resposta inflamatória, se propôs estudar a ação do tumor sobre o processo inflamatório agudo, com intuito de se observar como o ambiente tumoral influencia essa etapa da inflamação.

II. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o curso e a intensidade da resposta inflamatória sistêmica em ratos inoculados com carcinossarcoma de Walker 256.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da inoculação do carcinossarcoma de Walker, bem como o curso de seu desenvolvimento, na intensidade do edema de pata induzido por carragenina ou por dextrana em ratos.
- Estudar a migração de neutrófilos induzida por carragenina, na pata contralateral ou na cavidade peritoneal, curso do desenvolvimento do carcinossarcoma 256 de Walker.
- Investigar o efeito da inoculação do carcinossarcoma de Walker, bem como o curso de seu desenvolvimento, na permeabilidade vascular cutânea do dorso induzida por histamina, serotonina, bradicinina, substância P, capsaicina e composto 48/80.
- Estudar a degranulação de mastócitos do mesentério induzida pelo composto 48/80 no curso do desenvolvimento do carcinossarcoma 256 de Walker.

III. METODOLOGIA

3. METODOLOGIA.

3.1. ANIMAIS

Os animais utilizados foram ratos Wistar (*ratus norvegicus*) machos, com pesos entre 180 – 220 g procedentes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceara, mantidos em caixas adequadas com livre acesso a água e alimentação. Os experimentos foram realizados segundo o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório, elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA).

3.2. APARELHOS E EQUIPAMENTOS LABORATORIAIS

- Agitador para tubos de ensaio (Marconi, modelo TE089).
- Agulhas.
- Alicates para deslocamento cervical.
- Balanças analíticas (Marte, modelo AL200 e Ohaus, modelo AS260D).
- Balança para pesagem de animais (Filizola, modelo ID 1500).
- Béqueres.
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025mm²)
- Centrifuga excelsa Baby (FANEM, modelo 248)
- Contador diferencial de células de 8 teclas (Clay Adams)
- Contador de células totais (Veeder Root)
- Espátulas
- Estufa (Olidef, modelo A42)
- Freezer
- Geladeira
 - Laminas e lamínulas para microscopia

- Luvas cirúrgicas
- Material cirúrgico (pinças , bisturi e tesouras)
- Micropipetas (Gilson)
- Microscópio óptico binocular (EMBRAEME)
- Papel de filtro
- Pipetas Pasteur de plástico (Sigma)
- Plestimografo (UGO - BASILE)
- Ponteiras (Sigma)
- Provetas (Simax)
- Seringas 1; 5 e 10 ml (BD PLASTIPÁK) e agulhas 29 G e 25 G (Benson- Dickson)
- Tubos de polipropileno para centrifuga de 15 ml (Falcon)
- Tubos de ensaio de vidro e plástico (Gibco)

3.3. SOLUÇÕES, DROGAS E CORANTES UTILIZADOS.

- Carragenina (BDH Chemicals Ltda, SIGMA)
- Composto 48/80 (Sigma)
- Dextrana (Dextran 70 , Pharmacia , UPPSALA)
- Eosina (MERCK)
- Hematoxilina (REAGEN)
- Heparina sódica (5000 ui / ml; Cristalia)
- Ringer lactato (Fresenius Kabi)
- Cloridrato de Gentamicina (Ipo Labor, Nova química)
- Azul de Tripan (Sigma)
- Cloreto de Sódio (Vetec)

- Álcool 70% (Alcoollux)
- Histamina (Sigma)
- Bradicinina (Sigma)
- Serotonina (Sigma)
- Substancia P (Sigma)
- Capsaicina (Sigma)
- Composto 48/80 (Sigma)
- PBS-tween 20, 0,1% (v/v);
- Formamida (Reagen)
- Câmara de fluxo laminar (Veco)

Solução de Turk (diluidor de glóbulos brancos) :

- Acido acético Glacial P. A (Merck)..... 20 ml
- Violeta Genciana..... 2,0 ml
- Água destilada..... 1000 ml

Solução para Pletismografo:

- Cloreto de Sódio (Vetec)..... 45,0 mg
- Solução Padrão..... 0,3 ml
- Água destilada..... 100 ml

Solução de azul de toluidina :

Azul de toluidina	100,0 mg
Álcool etílico	70,0 ml
Água destilada	30,0 ml

O pH foi ajustado para 1,8 – 2,0 com HCl (5 ml /L) . As diluições foram feitas

Em solução salina 0,9 % estéril .

Solução para o ensaio de mieloperoxidase.

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB):

HTAB (Sigma) -----	5 g;
Tampão fosfato de potássio -----	1 L.

- Peróxido de hidrogênio 0,1%:

Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) -----	1 mL;
Água destilada -----	29 mL.

- Solução de o-dianisidina (DDI):

O-dianisidina (Sigma) -----	16,7 mg;
Tampão fosfato de potássio -----	10,0 mL;
H ₂ O ₂ -----	50,0 µL;
Água destilada -----	90,0 mL.

3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.4.1 IMPLANTE DO TUMOR DE WALKER

A linhagem do tumor de Walker foi mantida em ratos Wistar, através de inoculações intramusculares sucessivas de 10^6 células neoplásicas, na coxa direita desses animais, a cada 7 dias. Nesta manutenção, no animal portador do tumor fez-se uma desarticulação cirúrgica da coxa onde estava implantado o processo tumoral. Realizou-se uma dissecação desse órgão, excluindo os tecidos necróticos e não tumorais. Posteriormente a isso, fez-se a trituração do tecido tumoral, com tesouras cirúrgicas e acrescentou-se ao material triturado ringer lactato e cloridrato de gentamicina (60 mg/ml), nas proporções de 5:1 respectivamente. Dessa suspensão de células retirou-se 30 μ l e diluiu-se com 30 μ l do corante excludente de células mortas Azul de Trypan. Depois se levou 30 μ l dessa mistura para a câmara de Neubauer para a realização da contagem de células do tumor. Após a determinação da concentração de células neoplásicas, houve a inoculação de 10^6 células por animal.

3.4.2 DETERMINAÇÃO DO VOLUME TUMORAL

A determinação do volume tumoral foi realizada através da fórmula de Steel (diâmetro antero-posterior x quadrado do diâmetro latero-lateral do tumor). O volume tumoral foi medido com o auxílio de um paquímetro digital e essas medidas foram feitas ao longo de 15 dias da inoculação de 10^6 células tumorais.

3.4.3. SOBREVIDA DOS ANIMAIS

A sobrevida foi feita através de acompanhamento diário dos animais pós inoculação do tumor e foi expressa através de porcentagem.

3.4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS:

A fim de avaliar o efeito da presença de um tumor experimental no curso da resposta inflamatória aguda, nos animais foram implantados ou não, 10^6 células do tumor de Walker. No grupo controle foi realizada a injeção de apenas salina. Após 4, 7 ou 10 dias da implantação tumoral, foram analisados o edema na pata contralateral induzida por carragenina (300 μ g/pata) ou dextrana (500 μ g/pata), atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), migração de neutrófilos induzida por carragenina (300 μ g) no peritônio, permeabilidade vascular cutânea no dorso induzidas por histamina (10 μ g/sítio), serotonina (1 μ g/sítio), bradicinina (2 μ g/sítio), composto 48/80 (1 μ g/sítio), substância P (250ng/sítio) ou capsaicina (50 μ g/sítio), e degranulação mastocitária induzida por 48/80 (0,8 μ g/ml).

3.4.5. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (sem tumor) + carragenina e tumor + carragenina. Esses experimentos foram realizados nos 4^o, 7^o e 10^o dias após a inoculação do tumor. A carragenina foi administrada intraplantarmente (ipl.) na dose de 300 μ g/pata.

O volume da pata traseira esquerda de cada rato foi medido usando pletismômetro (UGO BASILI) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Em seguida, foi injetado 0,1 ml do estímulo por via sub-plantar nos animais nessa mesma pata.

O volume da pata foi avaliado 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do estímulo, usando o mesmo pletismômetro. Foram utilizados esses tempos de medição já que o pico do edema induzido por carragenina ocorre na 3ª hora após a injeção desse estímulo. O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero).

3.4.6. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRANA.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (sem tumor) + dextrana e tumor + dextrana. Esse experimento será realizado nos 4º, 7º e 10º dias após a inoculação do tumor. A dextrana foi injetada na dose de 500µg/pata.

O volume da pata traseira esquerda de cada animal foi medido usando pletismômetro (UGO BASILI) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Em seguida, foi injetado 0,1 ml do estímulo por via sub-plantar nos animais nessa mesma pata.

O volume da pata foi avaliado 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do estímulo, usando o mesmo pletismômetro. Foram utilizados esses tempos de medição já que o pico do edema induzido por dextrana ocorre na 1ª hora após a injeção desse estímulo. O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero).

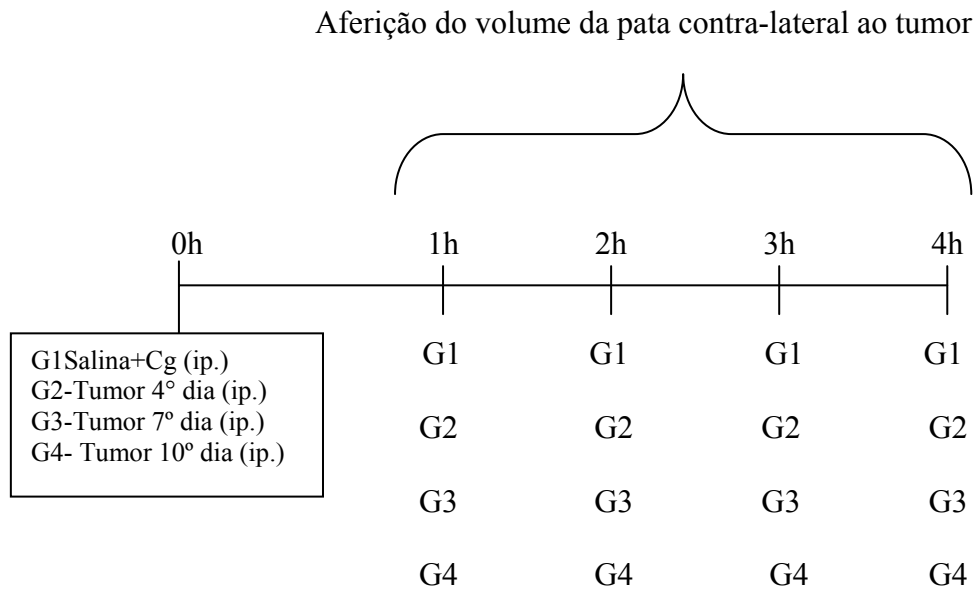


Figura 1. Esquema da avaliação do edema de pata induzido por carragenina.

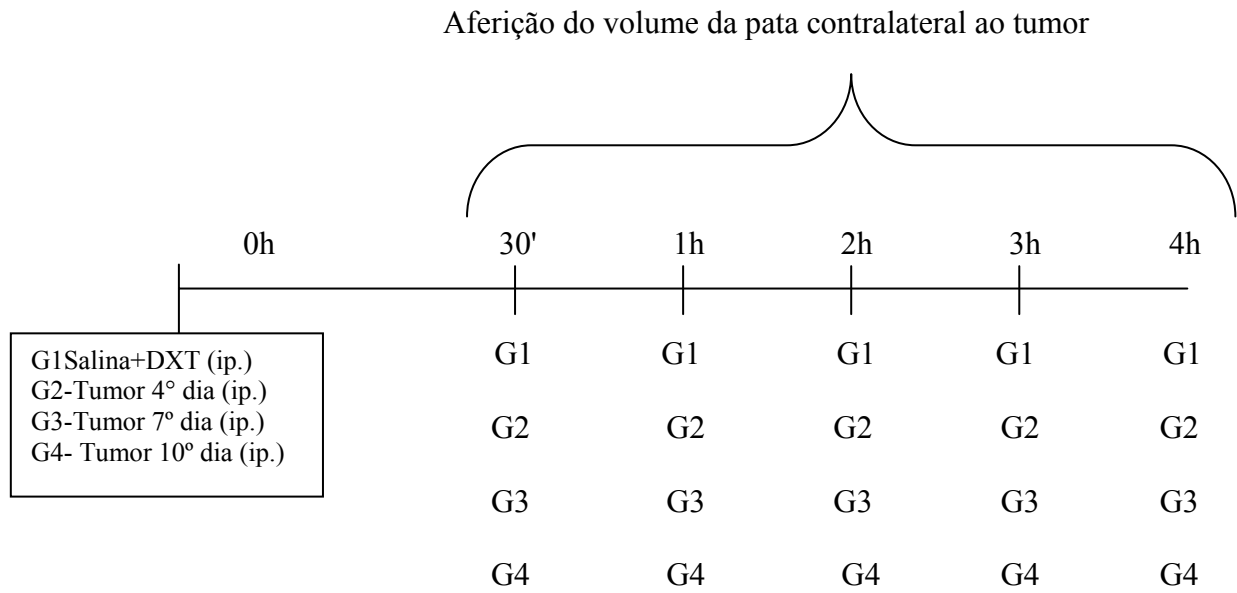


Figura 2. Esquema da avaliação do edema de pata induzido por dextrana.

3.4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE NA PATA

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (sem tumor) + carragenina (300 µg/pata.), tumor + carragenina (300 µg/pata). Esse experimento foi realizado utilizando 50 mg de pele e tecido celular subcutâneo, por animal, de cada grupo, nos 4º, 7º e 10º dias após a implantação do tumor ou da administração de salina. Essas amostras foram estocadas a -70°C, em eppendorfs de 1,5ml, para posterior dosagem da atividade de MPO no tecido. A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por mL de tampão) e depois trituradas com um homogeneizador de tecidos. As amostras foram congeladas, descongeladas e trituradas três vezes. Posteriormente foram centrifugadas a 4500 rpm, durante 12 min a uma temperatura de 4°C; o sobrenadante foi, então, colhido. Os níveis teciduais da atividade de MPO foram determinados por meio da técnica descrita por Bradley & Cols (1982), utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005 % como substrato para MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22°C. No ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio foi degradado ocorreu a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em composto de cor marrom. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi medida por espectrofotômetro à 450nm. Os resultados foram expressos como unidade de MPO/ mg de tecido.

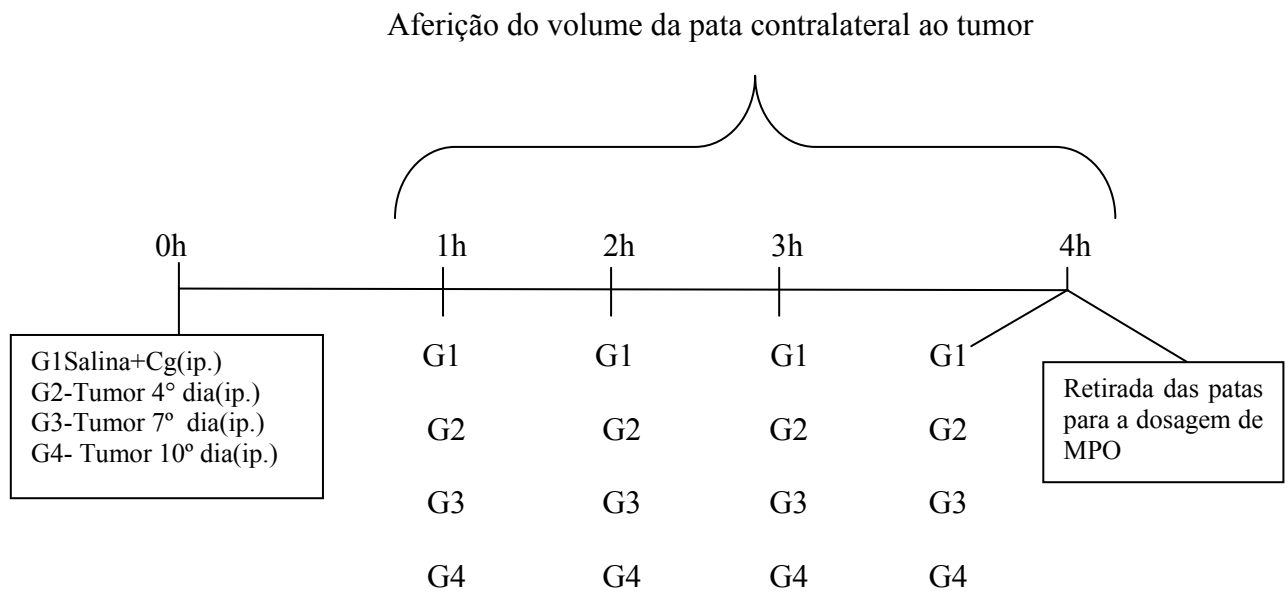


Figura 3. Esquema da avaliação da atividade da enzima MPO após o estímulo inflamatório induzido por carragenina.

3.4.7. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL INDUZIDA POR CARRAGENINA.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (sem tumor) + salina estéril, controle (sem tumor) + carragenina, tumor + salina estéril, tumor + carragenina (300 µg/pata). Esses experimentos foram realizados nos 4º, 7º e 10º dias após a inoculação do tumor. Com o objetivo de se avaliar a migração de neutrófilos, foram injetados intraperitonealmente, por cavidade de cada animal, 300 µg de carragenina diluídos em 1 mL de salina estéril ou apenas 1 mL de salina estéril. Após quatro horas, a cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL da solução de PBS heparinizado, massageada e incisada com bisturi para coleta do líquido com pipeta Pasteur. As contagens totais e diferenciais serão feitas de acordo com o método descrito por Souza & Ferreira (1985).

Do líquido colhido, 20µL foram diluídos em 380 µL de líquido de Turk (diluição de 1:20) e utilizados para contagem total de células em câmara de Neubauer. Dessa solução foram pipetados aproximadamente 20µL na câmara de Neubauer e realizado a contagem total. Foi feita essa contagem nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer e o número de células contadas foi multiplicado por 50 (20 da diluição e 2,5 do fator de correção da câmara). Para contagem diferencial de células, 30 µL do exsudato foram colocados em citocentrífuga (10 min a 2800 rpm). Em seguida, as lâminas foram coradas com corante rápido HEMA3. A leitura foi realizada no microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento de 100x). Serão contadas 100 células em cada orifício (200 células por lâmina). O número total de neutrófilos foi estimado calculando-se as percentagens do número total de células encontradas.

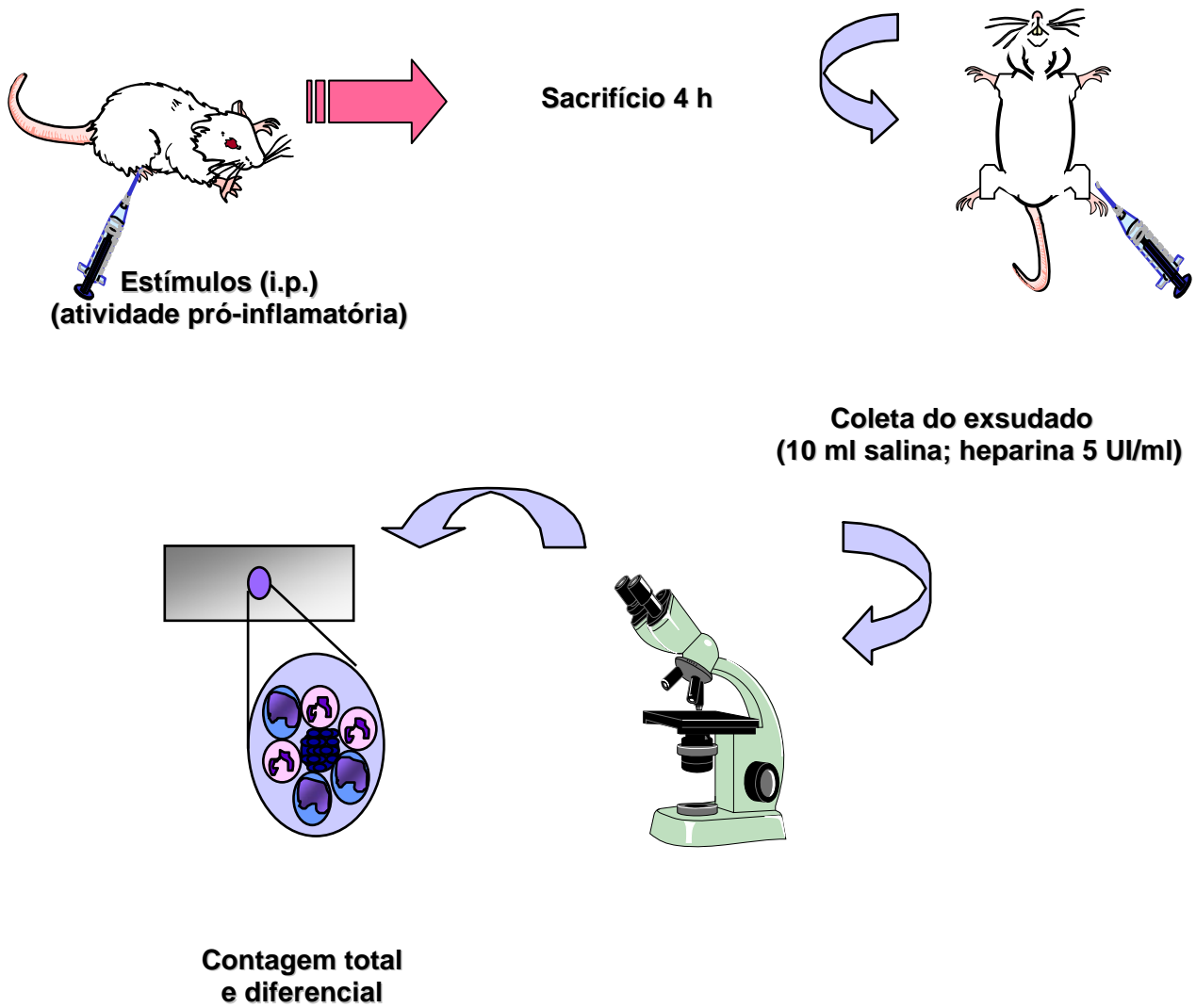


Figura 4. Esquema da avaliação da migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de ratos Wistar.

3.4.8. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR CUTÂNEA.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (sem tumor) e tumor. Esse experimento foi realizado nos 4º, 7º e 10º dias após a inoculação do tumor. Os ratos foram pesados e anestesiados com éter para que pudessem ter o seu dorso depilado. Em seguida foram anestesiados com tribromocloroetanol (2,5%). A pele do dorso foi dividida com caneta em seis partes. Em seguida, foram injetados 0,1 ml dos estímulos: histamina (30µg/sítio), substância P (250ng/sítio), serotonina (1µg/sítio), bradicinina (2µg/sítio), capsaicina (50µg/sítio) e composto 48/80 (1µg/sítio), por via intradérmica, no centro de cada divisão do dorso do animal. Logo a seguir, foi administrado o azul de Evans (0,1mL/100g do animal) na veia do plexo peniano. Depois, os animais foram sacrificados e suas peles dissecadas e fotografadas. Após isso, foram cortados pedaços de 1,5 cm de diâmetro em torno da injeção de cada estímulo. Esses pedaços foram pesados e mergulhados em 1mL de formamida. O material ficou em estufa 37°C por 48 horas para extração do azul de Evans. Após esse período, foi feita leitura em espectrofotômetro a 630nm. A quantidade de azul de Evans presente foi calculada com base na equação da reta, construída com diluições conhecidas de azul de Evans em formamida e foi expressa em µg de azul por mg de tecido.

3.4.9. AVALIAÇÃO DA DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA PELO COMPOSTO 48/80 NO MESENTÉRIO DE RATOS WISTAR

Ratos foram divididos nos seguintes grupos: controle (sem tumor) + 48/80, t, tumor + 48/80.

Esse experimento foi realizado nos 4º, 7º e 10º dias após a inoculação do tumor.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Foram feitos cortes do mesentério e incubados por 30 minutos em solução de Ringer-Locke (RL) com ou sem o composto 48/80 (na concentração submáxima de 0,8 µg/mL), de acordo com o grupo. Durante o período de incubação, as peças permaneceram em placas de Petri a temperatura ambiente. Passados os 30 minutos, os tecidos foram retirados das placas e colocados em lâminas. Após a secagem, todas as lâminas foram coradas com azul de toluidina por 2 minutos, lavadas com água destilada e colocadas para secar. Em seguida, o excesso de gordura foi removido com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Foram contadas 100 células em diferentes campos com o auxílio de MO, utilizando-se aumento de 400X. Em seguida, foi calculada a média do percentual de mastócitos degranulados para cada grupo.

3.4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prisma 3.04. Os resultados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) e teste de Bonferroni.

IV. RESULTADOS

RESULTADOS

DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DO VOLUME TUMORAL E DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS RATOS INOCULADOS COM CARCINOSSARCOMA DE WALKER.

Na figura 5, observa-se que a partir do 4º dia pós-inoculação do carcinossarcoma de Walker houve um crescimento exponencial do volume tumoral. O crescimento máximo foi visto no 15º dia pós-inoculação do mesmo. Na figura 6, observa-se, que a partir do 11º dia pós inoculação do carcinossarcoma de Walker, os animais começavam a morrer. No 15º dia pós-implantação das células tumorais, todos os animais estavam mortos. Através dos gráficos de sobrevivência e crescimento do volume tumoral, foram formados os grupos experimentais. Foi feita uma intersecção entre os gráficos e verificou-se que os melhores dias para que esses experimentos seriam o 4º, 7º e 10º dias pós-inoculação tumoral.

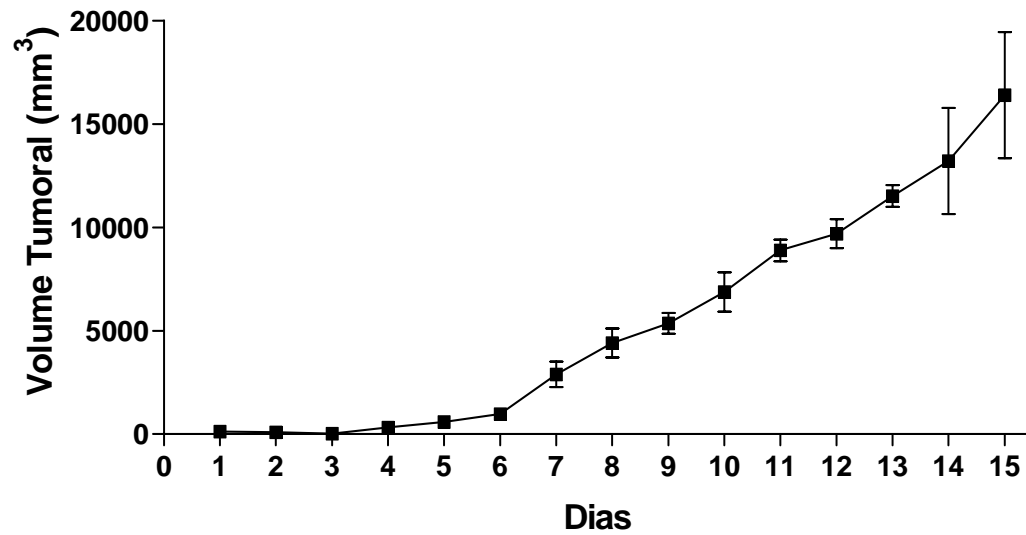


Figura 5. Crescimento do volume tumoral de ratos inoculados com carcinossarcoma Walker 256 na coxa direita. Após a inoculação de 10^6 células do carcinossarcoma de Walker na coxa direita de 6 ratos, foi aferido diariamente o volume tumoral, utilizando um paquímetro digital, por 15 dias. A fim de avaliar o crescimento do volume tumoral utilizou-se a fórmula de Stiefel, onde se multiplica o diâmetro antero-posterior pelo quadrado do diâmetro latero-lateral e divide o resultado por dois. O resultado foi aferido em mm^3 . Os pontos das curvas representam a média \pm EPM da variação do volume da pata dos 6 animais.

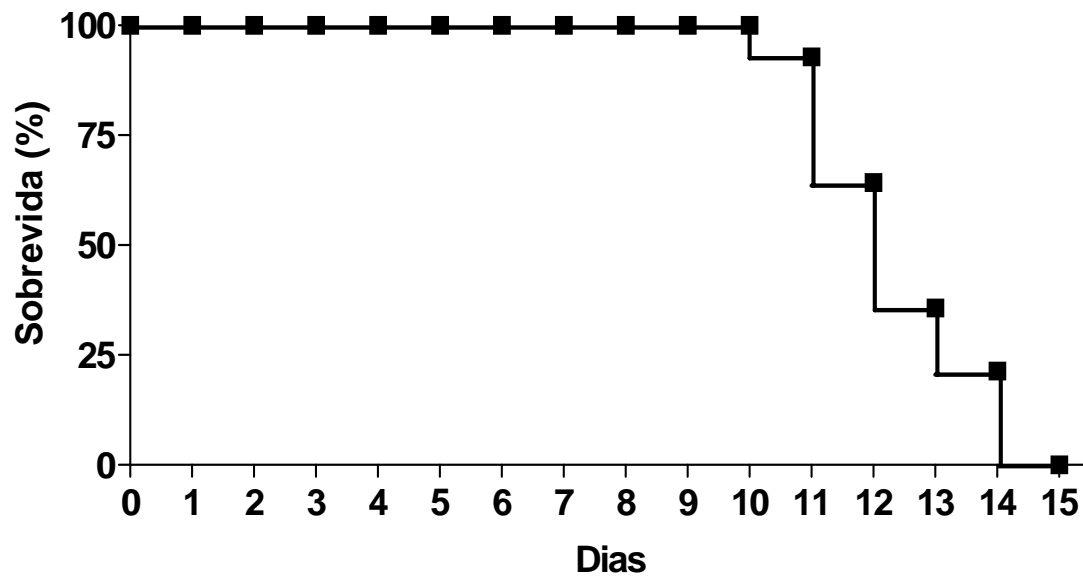


Figura 6. Curva de sobrevivência realizada em ratos inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker na coxa direita. Após a inoculação de 10^6 células do carcinossarcoma de Walker na coxa direita de 14 ratos, foi avaliada diariamente a sobrevivência. Os pontos representam a porcentagem de animais vivos em cada dia experimental após a inoculação do carcinossarcoma.

4.2. EFEITO DA INOCULAÇÃO DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.

Houve uma diminuição significativa do edema de pata induzido por carragenina nos 4º, 7º e 10º dias pós-inoculação do carcinossarcoma de Walker (painel A). Essa inibição pode ser vista na 1ª (painel B), 2ª e 3ª horas (painel C) após a inoculação subplantar de carragenina. No 4º dia depois que o carcinossarcoma foi inoculado, ocorreu uma diminuição do edema de pata somente após a 2ª e 3ª horas (painel C) da administração da carragenina.

4.3. EFEITO DA INOCULAÇÃO DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRANA.

Houve uma diminuição significativa do edema de pata induzido por dextrana no 7º e 10º dias pós-inoculação do carcinossarcoma de Walker (painel A) quando comparado ao grupo controle. Essa inibição pôde ser vista na 1ª (painel B), 2ª, 3ª (painel C) e 4ª horas após a injeção subplantar de dextrana. Não ocorreu uma diminuição significativa da resposta edematogênica da dextrana no 4º dia após a inoculação do carcinossarcoma de Walker.

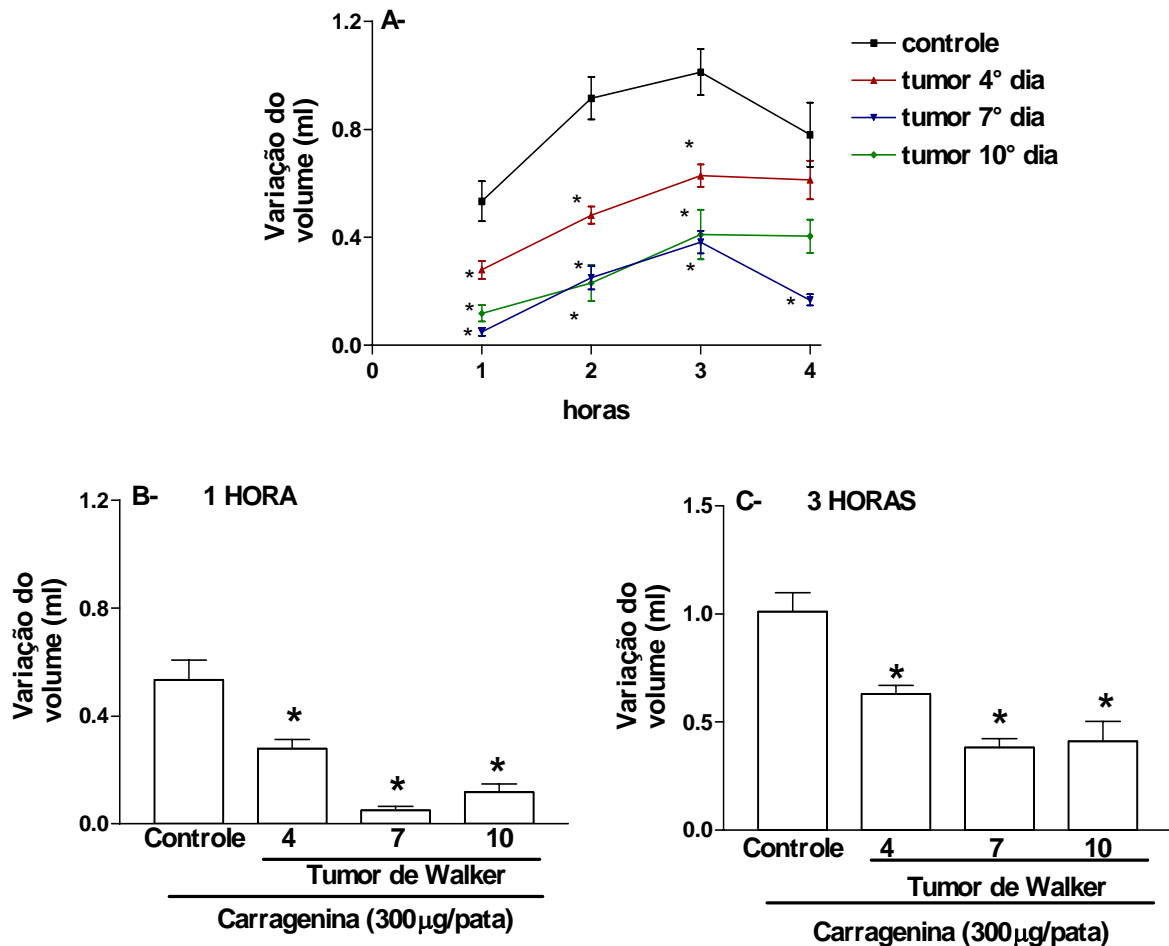


Figura 7. Efeito inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre o edema de pata induzido por carragenina. Decorridos 4, 7 ou 10 dias da inoculação do carcinossarcoma de Walker, carragenina (300µg/pata) foi injetada por via subplatar em todos os grupos. O volume do edema de pata foi aferido antes e 1, 2, 3 e 4 hs após a injeção de carragenina (300ug/pata). O grupo controle constitui-se de ratos não inoculados, mas que receberam a injeção de carragenina. **A:** Os pontos das curvas representam a média \pm EPM da variação do volume da pata de 5-6 animais por tratamento. **B:** Representa a variação do volume do edema induzido pela carragenina, após 1 hora. **C:** Representa a variação do volume do edema induzido pela carragenina, após 3 h. (*) $p < 0.05$ em relação ao grupo controle (ANOVA/Bonferroni).

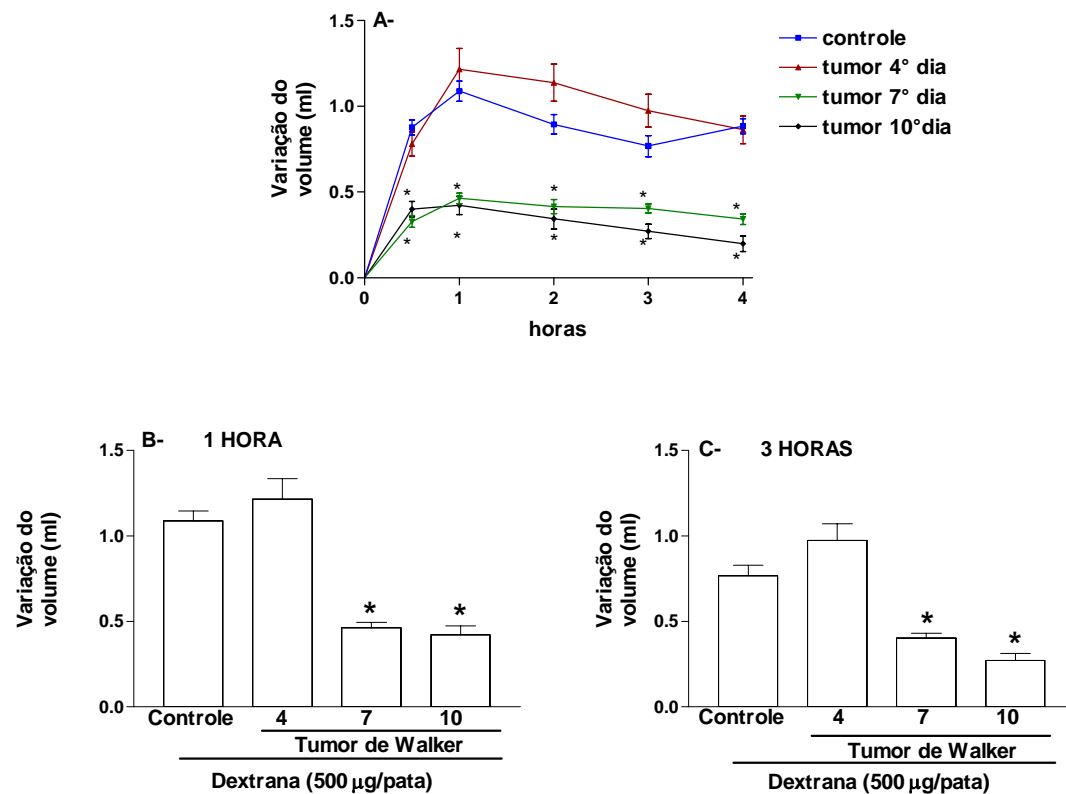


Figura 8. Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre o edema de pata induzido por dextrana. Decorridos 4, 7 ou 10 dias da inoculação do carcinossarcoma de Walker, dextrana (500µg/pata) foi injetada por via subplantar em todos os grupos. O volume do edema de pata foi aferido antes e 1, 2, 3 e 4 hs após a injeção de dextrana. O grupo controle constitui-se de ratos não inoculados, mas que receberam a injeção de dextrana. **A:** Os pontos das curvas representam a média \pm EPM da variação do volume da pata de 5-6 animais por tratamento. **B:** Representa a variação do volume do edema induzido pela dextrana, após 1 hora. **C:** Representa a variação do volume do edema induzido pela dextrana, após 3 hora. (*) $p < 0.05$ em relação ao grupo controle (ANOVA/Bonferroni).

4.4. EFEITO DA INOCULAÇÃO DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER SOBRE A ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO) EM PATA DE RATOS ESTIMULADAS COM CARRAGENINA.

Na avaliação da atividade da MPO, a injeção subplantar de carragenina aumentou significativamente a atividade dessa enzima tanto em animais controles como em animais inoculados com as células tumorais, quando comparado a animais que receberam injeção subplantar de salina. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com carcinossarcoma (4º, 7º e 10º dias pós-inoculação tumoral) e o grupo controle (figura 9).

4.5. EFEITO DA INOCULAÇÃO DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL INDUZIDA POR CARRAGENINA.

Na figura 10, observamos que a administração de carragenina induziu uma significativa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, tanto no grupo sem carcinossarcoma, como no grupo com carcinossarcoma, após 4 (painel A), 7 (painel B) ou 10 dias (painel C) da inoculação do carcinossarcoma de Walker comparado ao grupo que recebeu salina intraperitoneal. Entretanto, não houve diferença estatística na migração neutrofílica entre o grupo com e sem carcinossarcoma nos diversos intervalos de estudo.

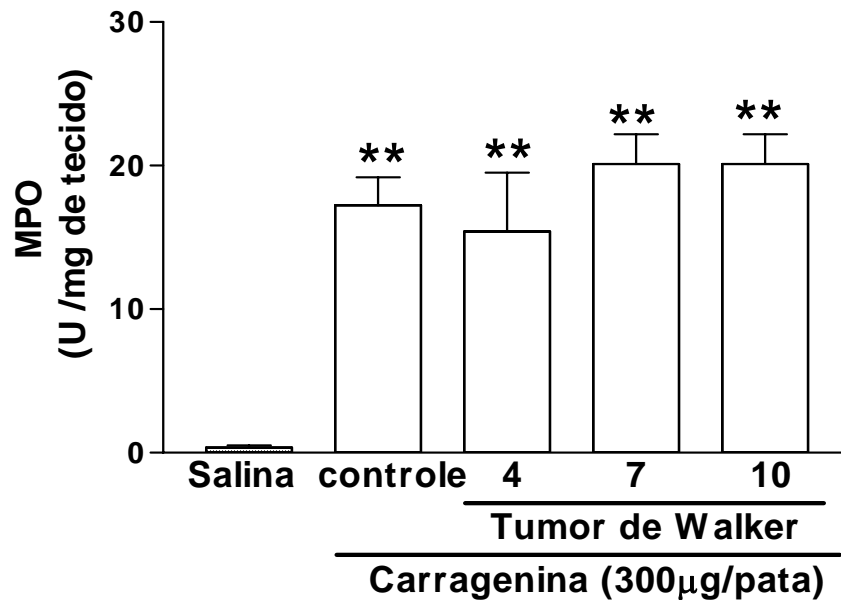


Figura 9. Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a atividade de MPO, em patas de ratos estimuladas com carragenina. A atividade da MPO foi avaliada em amostras da pele da pata de ratos retiradas 4 horas após a injeção subplantar de carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$) em animais não inoculados (controle) e em animais inoculados com o carcinossarcoma de Walker (4, 7, e 10). O grupo salina representa animais não inoculados que receberam uma injeção subplantar de salina. A atividade de MPO foi determinada por ensaio colorimétrico. As colunas representam a média \pm EPM de unidades de MPO/mg de tecido das amostras de 5 animais por tratamento, considerando-se o 1º min do ensaio. (**) $p < 0.001$ em relação ao grupo que recebeu somente solução salina à 0,9% . ANOVA/Bonferroni.

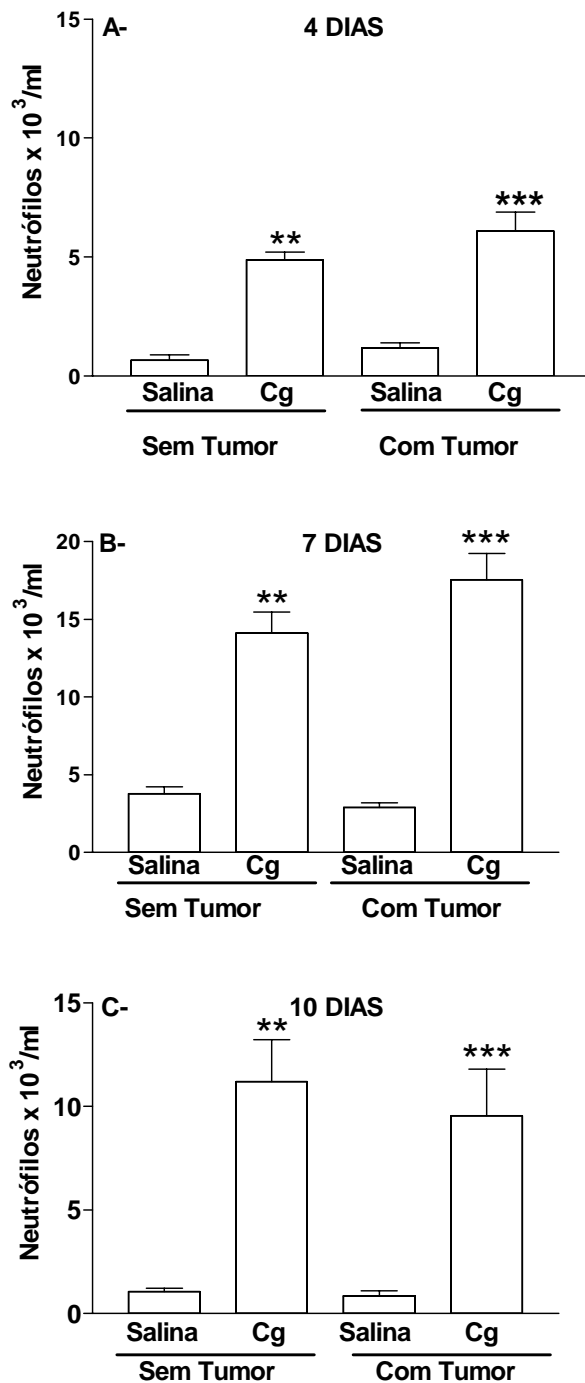


Figura 10. Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina. A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi avaliada 4 horas após a injeção intraperitoneal de solução salina (salina) ou carragenina (Cg; 300 μ g/cavidade) em animais não inoculados (sem tumor) e em animais inoculados com o carcinossarcoma de Walker no curso do crescimento do carcinossarcoma: 4 dias (painel A), 7 dias (painel B) e 10 dias (painel C). As barras representam a média \pm EPM do número de neutrófilos que migraram em 5-6 animais por tratamento. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina sem carcinossarcoma, e (***) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina com carcinossarcoma. ANOVA/Bonferroni.

4.6. EFEITO DA INOCULAÇÃO DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR CUTÂNEA INDUZIDA POR BRADICININA, SEROTONINA, COMPOSTO 48/80, HISTAMINA, SUBSTÂNCIA P OU CAPSAICINA.

Após 4 e 7 dias da inoculação do carcinossarcoma, o animais apresentaram uma significativa diminuição na permeabilidade vascular cutânea induzida por bradicinina (Figura 11), serotonina (Figura 12) ou composto 48/80 (Figura 13), mas não a induzida por histamina (Figura 14), substância P (Figura 15) ou capsaicina (Figura 16). Após 10 dias da inoculação do carcinossarcoma, observou-se uma diminuição da permeabilidade vascular induzidas por todos os estímulos nos ratos portadores de carcinossarcoma quando comparado com os ratos sem carcinossarcoma (Figuras 11-16). Foi também observado que houve uma maior inibição da permeabilidade vascular induzida por todos os estímulos.

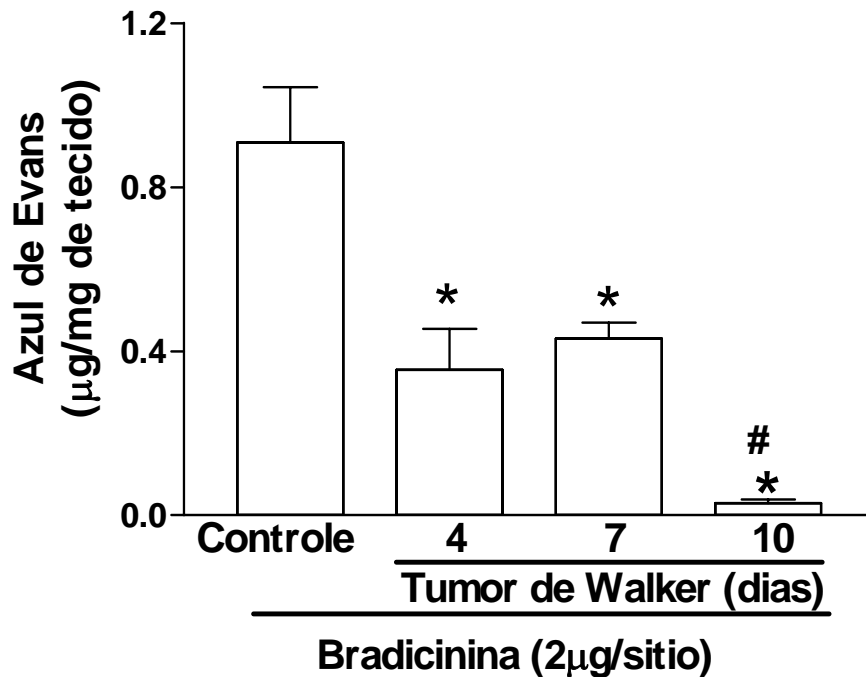


Figura 11. Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por bradicinina. Bradicinina (2 µg/sítio) foi injetada por via intradérmica em animais com (4, 7 e 10) ou sem carcinossarcoma de Walker (controle). Após 1 hora da injeção de bradicinina os animais foram sacrificados e tiveram a pele do dorso retirada. O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado na pele do dorsos pela quantidade de azul de evans extravasado no local de injeção do estímulo, o qual foi extraído em solução de formamida e mensurado por espectrofotometria à 600nm. As barras representam a média ± EPM de azul de evans por mg de tecido.(*) p<0,05 em relação ao grupo controle e # em relação aos grupos 4 , 7 dias pós-inoculação tumoral.

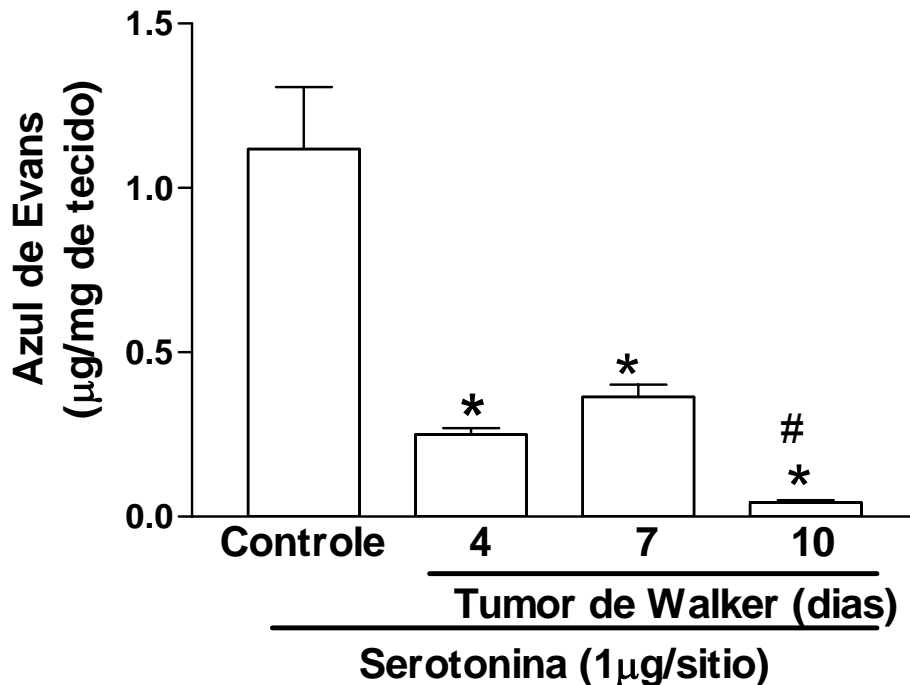


Figura 12. Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por serotonina. Serotonina (1µg/sitio) foi injetada por via intradérmica em animais com (4, 7 e 10) ou sem carcinossarcoma de Walker (controle). Após 1 hora da injeção de serotonina os animais foram sacrificados e tiveram a pele do dorso retirada. O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado na pele do dorsos pela quantidade de azul de evans extravasado no local de injeção do estímulo, o qual foi extraído em solução de formamida e mensurado por espectrofotometria à 600nm. As barras representam a média ± EPM de azul de evans por mg de tecido. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # em relação aos grupos 4 , 7 dias pós-inoculação tumoral.

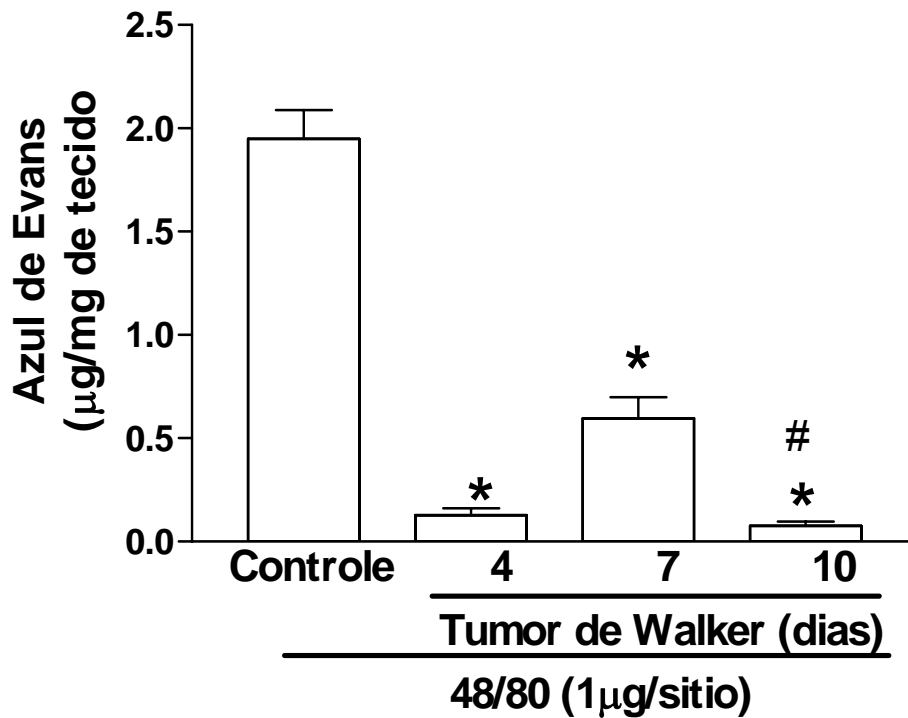


Figura 13. Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida pelo composto 48/80. O composto 48/80 (1µg/sitio) foi injetado por via intradérmica em animais com (4, 7 e 10) ou sem carcinossarcoma de Walker (controle). Após 1 hora da injeção do composto 48/80 os animais foram sacrificados e tiveram a pele do dorso retirada. O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado na pele do dorso pela quantidade de azul de evans extravasado no local de injeção do estímulo, o qual foi extraído em solução de formamida e mensurado por espectrofotometria à 600nm. As barras representam a média ± EPM de azul de evans por mg de tecido. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # em relação aos grupos 4, 7 dias pós-inoculação tumoral.

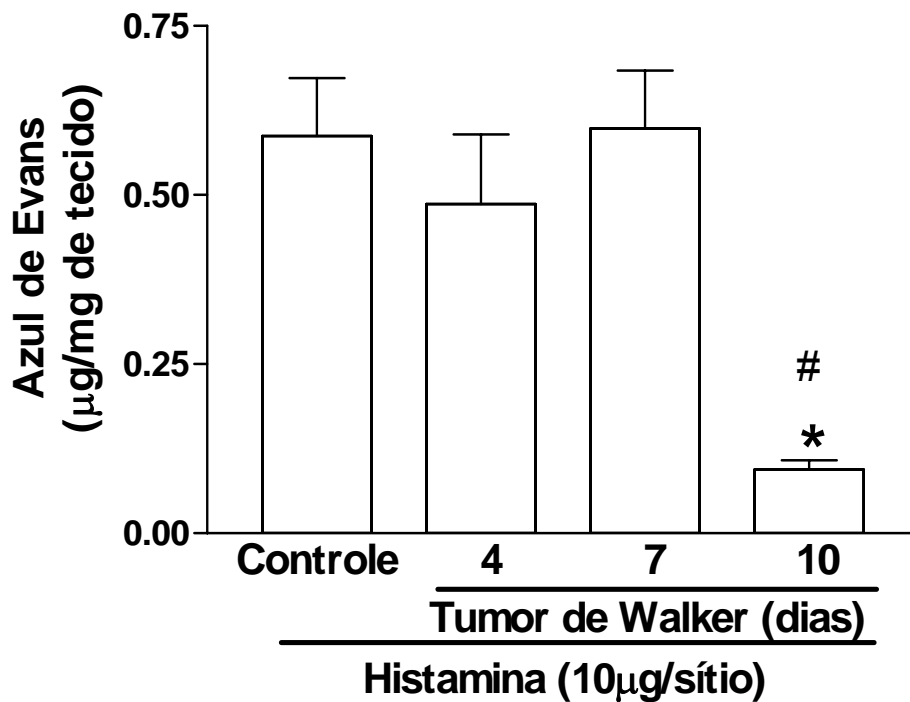


Figura 14. Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina. Histamina (10 µg/sítio) foi injetada por via intradérmica em animais com (4, 7 e 10) ou sem carcinossarcoma de Walker (controle). Após 1 hora da injeção de histamina os animais foram sacrificados e tiveram a pele do dorso retirada. O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado na pele do dorso pela quantidade de azul de evans extravasado no local de injeção do estímulo, o qual foi extraído em solução de formamida e mensurado por espectrofotometria à 600nm. As barras representam a média ± EPM de azul de evans por mg de tecido. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # em relação aos grupos 4 , 7 dias pós-inoculação tumoral.

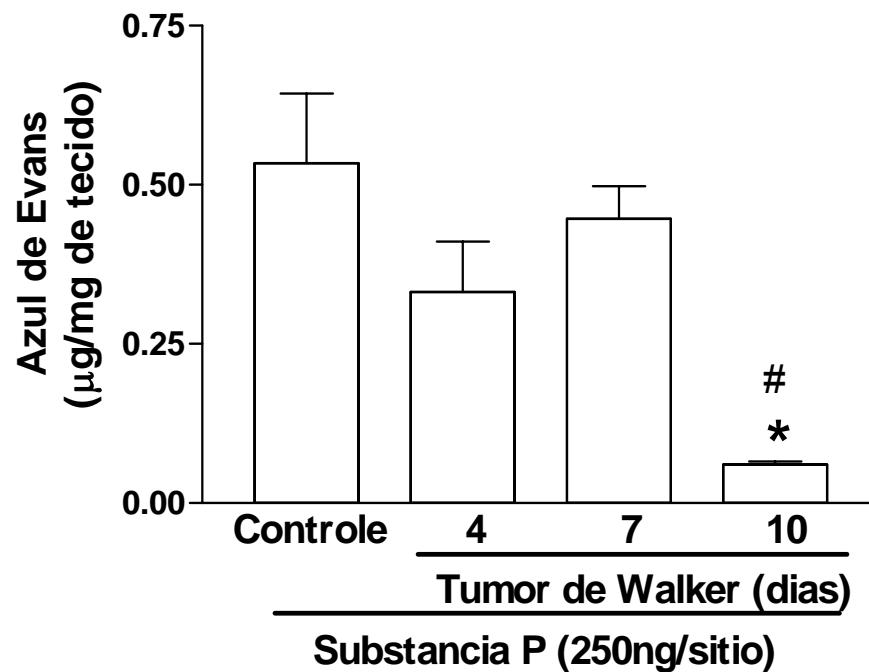


Figura 15. Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por substância P. Substancia P (250 ng/sitio) foi injetada por via intradérmica em animais com (4, 7 e 10) ou sem carcinossarcoma de Walker (controle). Após 1 hora da injeção de Substância P os animais foram sacrificados e tiveram a pele do dorso retirada. O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado na pele do dorso pela quantidade de azul de evans extravasado no local de injeção do estímulo, o qual foi extraído em solução de formamida e mensurado por espectrofotometria à 600nm. As barras representam a média \pm EPM de azul de evans por mg de tecido. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # em relação aos grupos 4, 7 dias pós-inoculação tumoral.

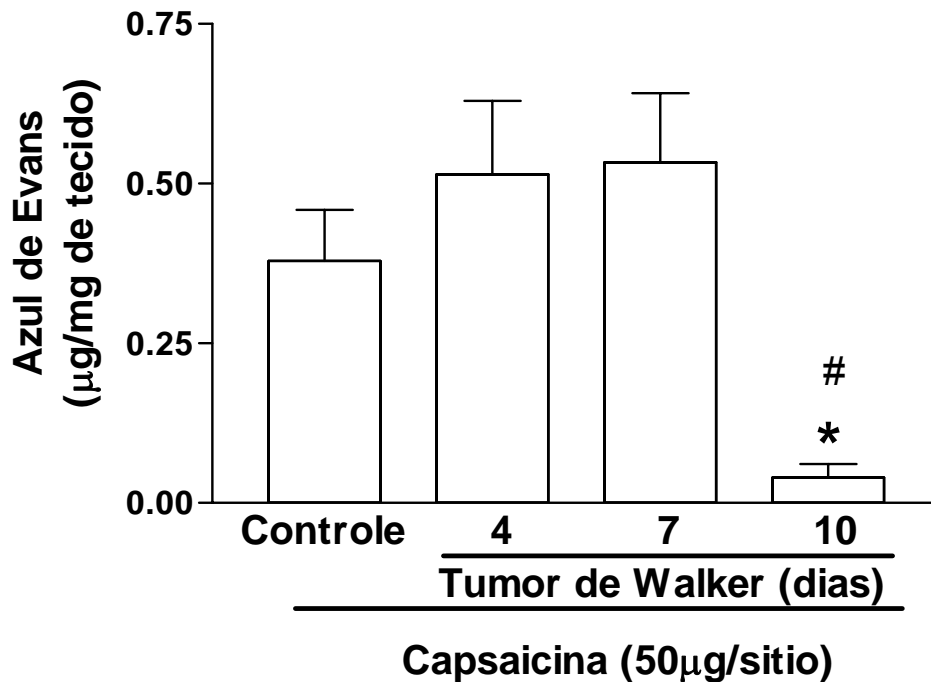


Figura 16. Efeito da inoculação do Carcinossarcoma de Walker sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por capsaicina. Capsaicina (50 µg/sitio) foi injetada por via intradérmica em animais com (4, 7 e 10) ou sem carcinossarcoma de Walker (controle). Após 1 hora da injeção de capsaicina os animais foram sacrificados e tiveram a pele do dorso retirada. O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado na pele do dorso pela quantidade de azul de evans extravasado no local de injeção do estímulo, o qual foi extraído em solução de formamida e mensurado por espectrofotometria à 600nm. As barras representam a média ± EPM de azul de evans por mg de tecido.(*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # em relação aos grupos 4, 7 dias pós-inoculação tumoral.

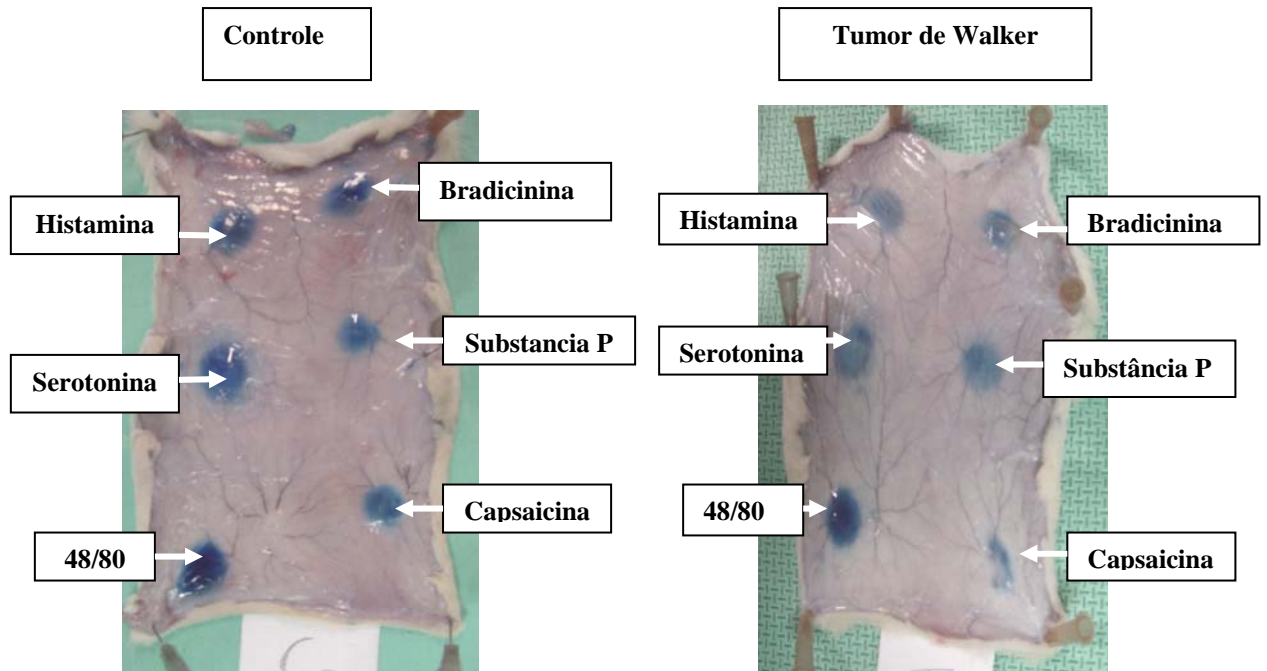


Figura 17. Fotos da pele do dorso de animais avaliados quanto ao aumento da permeabilidade vascular induzido por diversos estímulos, no 4º dia após a inoculação do carcinossarcoma de Walker. As fotografias foram tiradas de 1 animal do grupo controle (painel A) e de 1 animal do grupo com 4 dias de inoculação do carcinossarcoma de Walker (Painel B) os quais receberam injeções intradérmicas de bradicinina (2 $\mu\text{g/sítio}$), histamina (10 $\mu\text{g/sítio}$), substância P (250 ng/sítio), serotonina (1 $\mu\text{g/sítio}$), capsaicina (50 $\mu\text{g/sítio}$) e composto 48/80 (1 $\mu\text{g/sítio}$). Os círculos formados em cor azul indicam o local de aumento de permeabilidade vascular cutânea pelo o extravasamento do corante azul de Evans o qual foi injetado por via endovenosa imediatamente após a injeção dos estímulos.

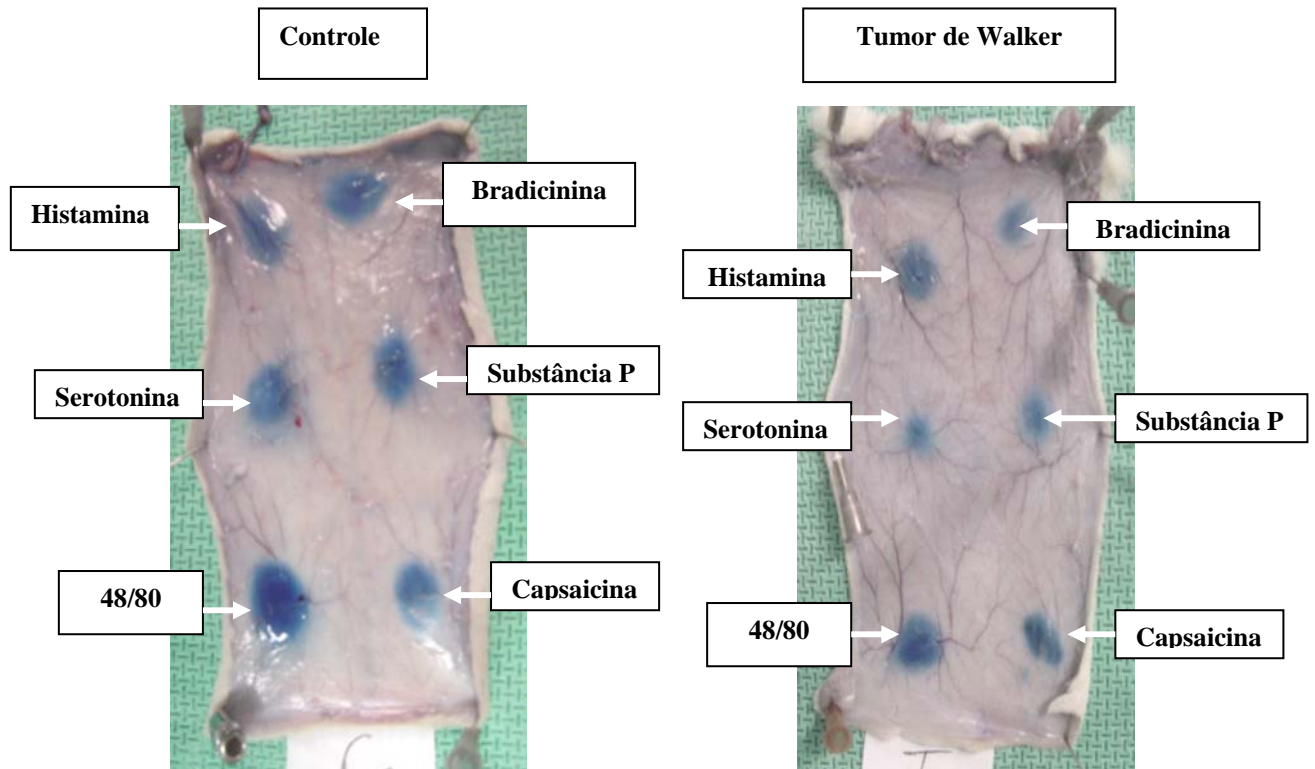


Figura 18. Fotos da pele do dorso de animais avaliados quanto ao aumento da permeabilidade vascular induzido por diversos estímulos, no 7º dia após a inoculação do carcinossarcoma de Walker. As fotografias foram tiradas de 1 animal do grupo controle (painel A) e de 1 animal do grupo com 7 dias de inoculação do carcinossarcoma de Walker (Painel B) os quais receberam injeções intradérmicas de bradicinina (2 µg/sítio), histamina (10 µg/sítio), substância P (250 ng/sítio), serotonina (1µg/sítio), capsaicina (50 µg/sítio) e composto 48/80 (1µg/sítio). Os círculos formados em cor azul indicam o local de aumento de permeabilidade vascular cutânea pelo extravasamento do corante azul de Evans o qual foi injetado por via endovenosa imediatamente após a injeção dos estímulos.

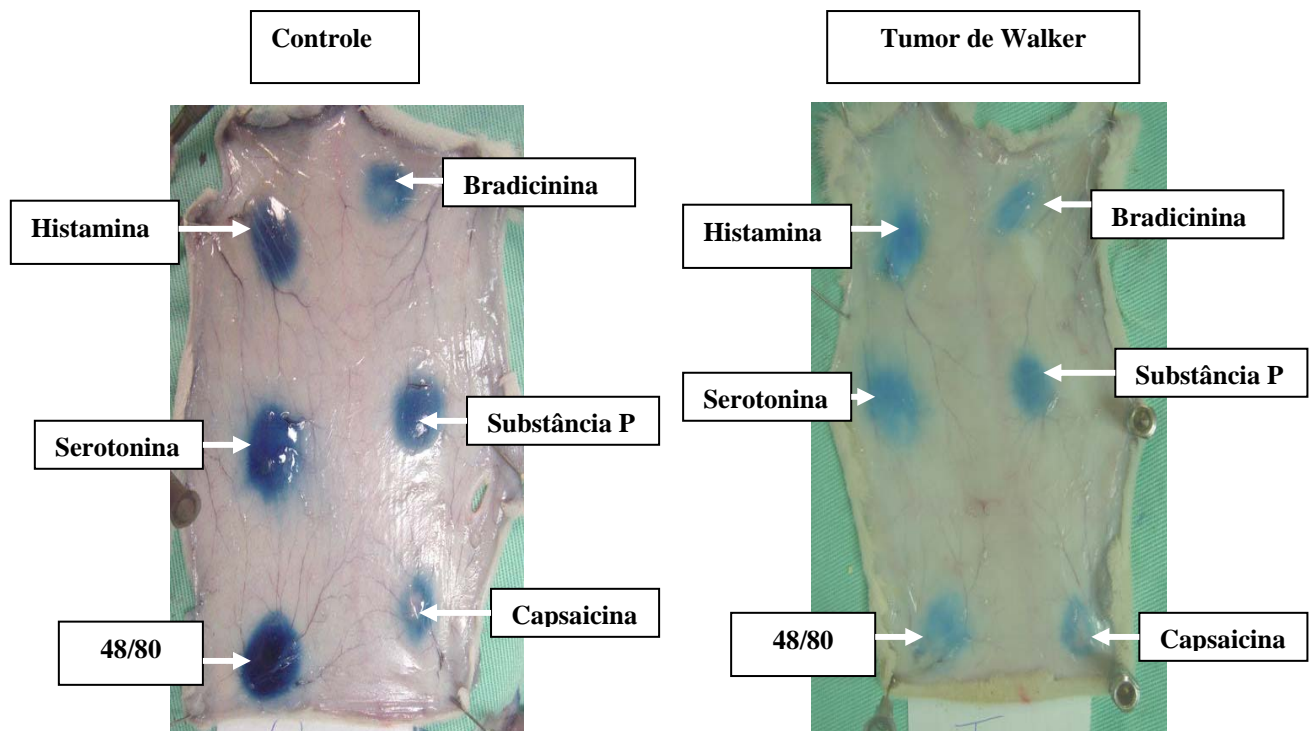


Figura 19. Fotos da pele do dorso de animais avaliados quanto ao aumento da permeabilidade vascular induzido por diversos estímulos, no 10º dia após a inoculação do carcinossarcoma de Walker. As fotografias foram tiradas de 1 animal do grupo controle (painel A) e de 1 animal do grupo com 10 dias de inoculação do carcinossarcoma de Walker (Painel B) os quais receberam injeções intradérmicas de bradicinina (2 $\mu\text{g/sítio}$), histamina (10 $\mu\text{g/sítio}$), substância P (250 ng/sítio), serotonina (1 $\mu\text{g/sítio}$), capsaicina (50 $\mu\text{g/sítio}$) e composto 48/80 (1 $\mu\text{g/sítio}$). Os círculos formados em cor azul indicam o local de aumento de permeabilidade vascular cutânea pelo extravasamento do corante azul de Evans o qual foi injetado por via endovenosa imediatamente após a injeção dos estímulos.

4.7. EFEITO DA INOCULAÇÃO DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS DO MESENTÉRIO INDUZIDA PELO COMPOSTO 48/80.

As figuras de 20 a 23 mostram que animais inoculados com o carcinossarcoma de Walker apresentam uma inibição significativa da degranulação de mastócitos do mesentério estimulados “in vitro” com o composto 48/80, em todos os dias experimentais avaliados, quando comparados a animais não inoculados (controle). Entretanto não houve diferenças significativas quando os grupos inoculados com o carcinossarcoma nos diferentes dias (4º, 7º e 10º dias) foram comparados entre si.

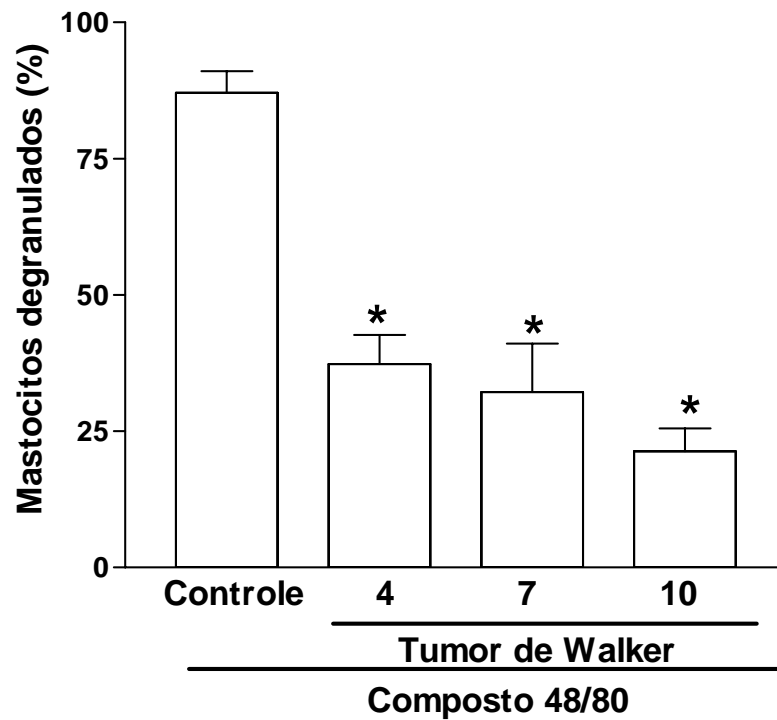


Figura 20. Efeito da inoculação do carcinossarcoma de walker sobre a degranulação de mastócitos de mesentério de rato induzida pelo composto 48/80“in vitro”. A degranulação mastocitária foi avaliada em amostras de mesentério retiradas de ratos inoculados com carcinossarcoma de Walker sacrificados do 4º, 7º e 10º dias após a inoculação. Os mesentérios retirados foram imersos, durante 30 min, em uma solução de Ringer-Locke contendo o composto 48/80 na concentração de $8\mu\text{g/ml}$. As amostras foram postas em lâminas de microscopia e coradas com o azul de toluidina para a contagem do número de células degranuladas. O grupo controle é formado por mesentérios retirados de animais não inoculados. Os valores representam a média \pm EPM da percentagem de mastócitos degranulados obtidas por contagem, em microscópio óptico, de 100 células. (*) $p < 0.001$ em relação ao grupo controle (ANOVA/Bonferroni).

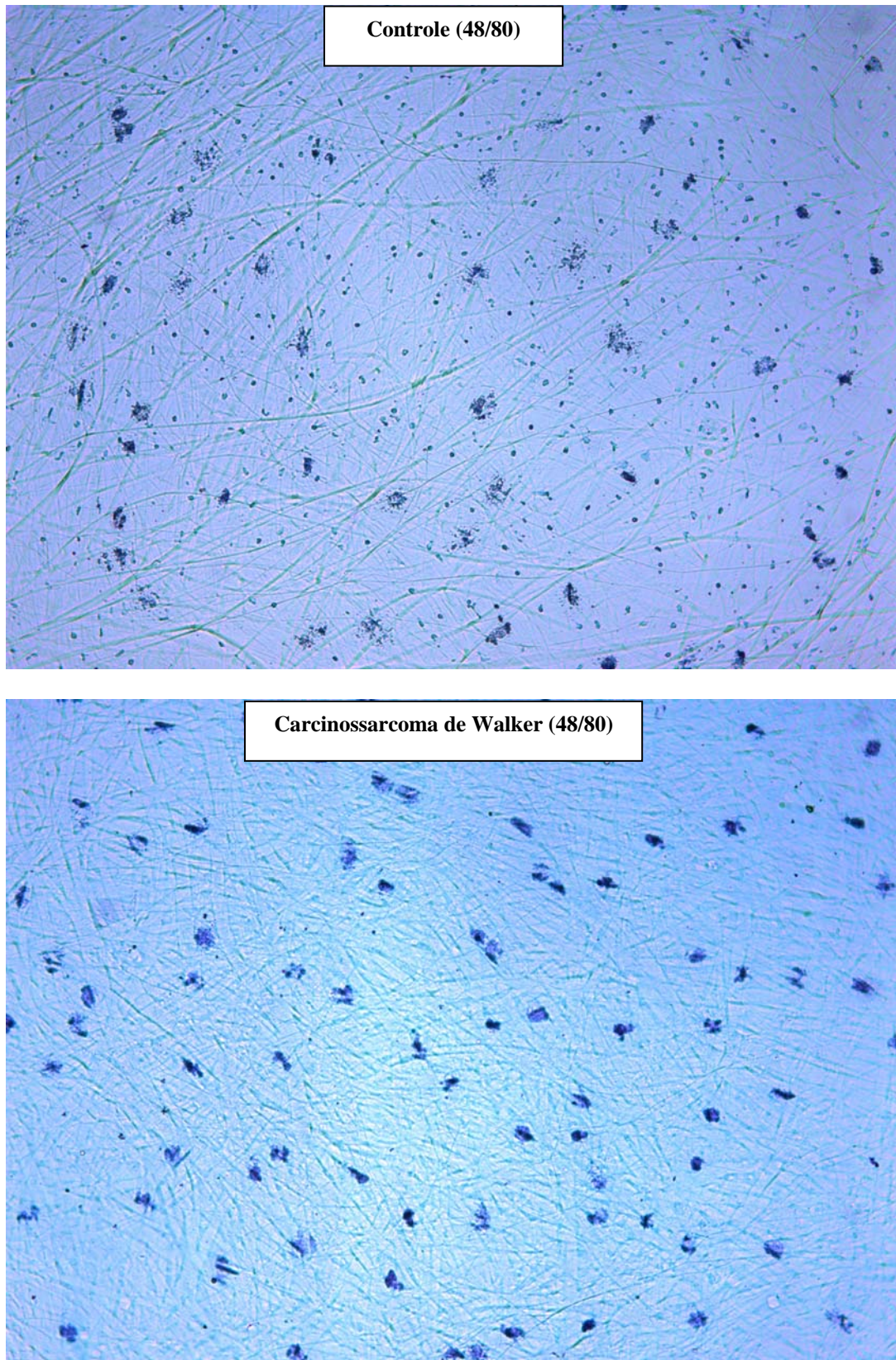


Figura 21. Foto micrografia mostrando a degranulação de mastócitos do mesentério estimulada pelo composto 48/80 em animais controle (sem tumor) ou com tumor inoculado há quatro dias.

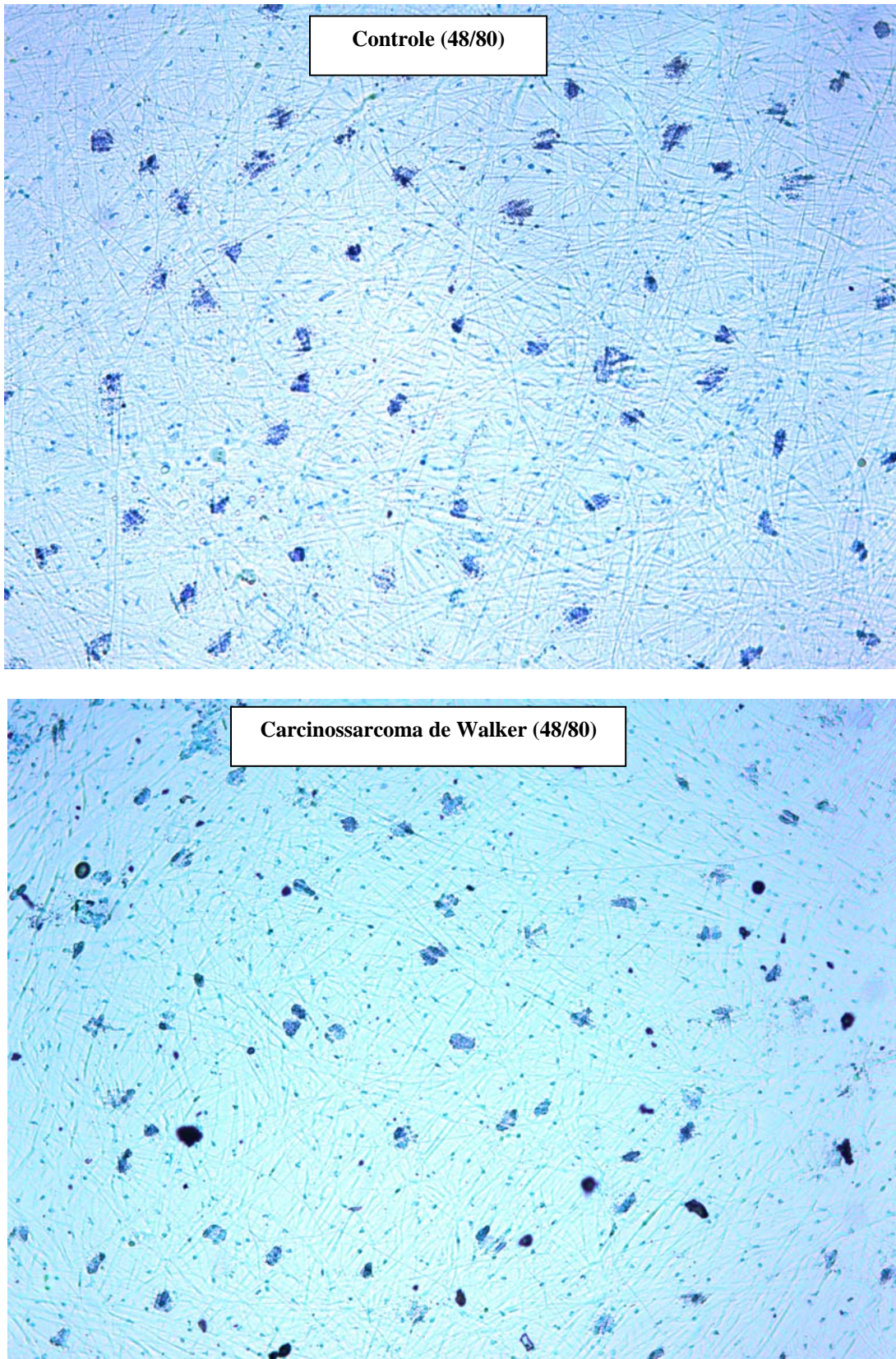


Figura 22. Fotomicrografia mostrando a degranulação de mastócitos do mesentério estimulada pelo composto 48/80 em animais controle (sem tumor) ou com tumor inoculado há sete dias.

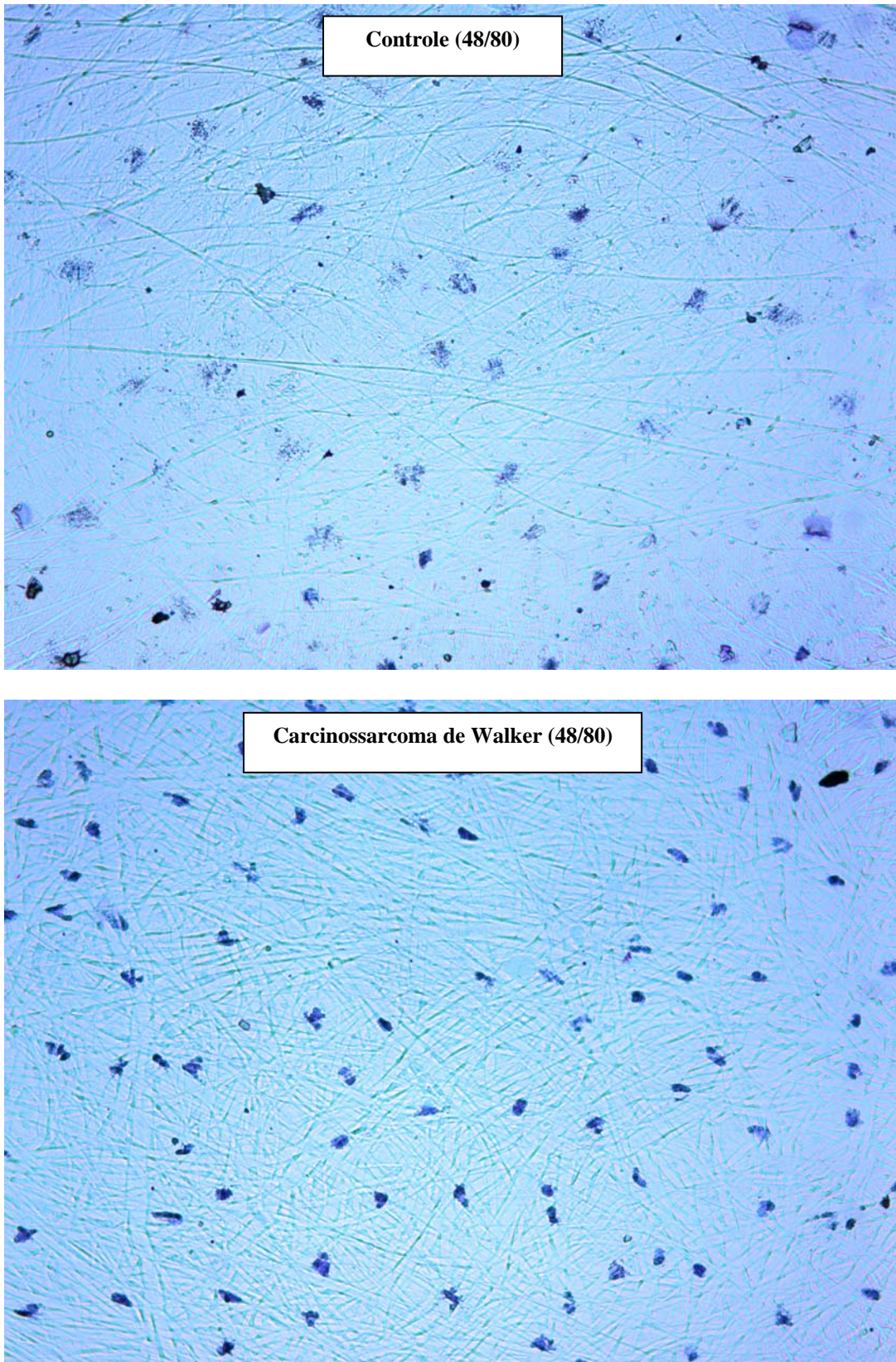


Figura 23. Fotomicrografia mostrando a degranulação de mastócitos do mesentério estimulada pelo composto 48/80 em animais controle (sem tumor) ou com tumor inoculado há dez dias.

V. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS:

Na avaliação da sobrevivência de ratos Wistar onde tinham o Carcinossarcoma 256 de Walker inoculado em suas bexigas observou-se que a sobrevivência desses animais era de 12 dias no mínimo e no máximo 17 dias (DORNELAS, 2006). Em outro trabalho onde o tumor de Walker foi inoculado na cavidade oral a média de sobrevivência foi a mesma (ALVES et al., 2004). Os nossos resultados mostraram que a sobrevivência dos animais, onde o tumor foi inoculado na coxa direita de ratos, foi no mínimo de 10 dias e no máximo de 15. Esse resultado sugere que o carcinossarcoma pode ter sua virulência aumentada e com isso diminuído a média de sobrevivência desses animais. A curva de sobrevivência por nós feita, foi construída com o intuito de avaliar a média de vida dos ratos e a partir da curva de crescimento do volume tumoral fez-se com esta uma intercessão de gráficos, para se determinar grupos experimentais, que iriam ser utilizados na realização dos experimentos.

Na construção da curva do crescimento do volume tumoral, observamos que o crescimento do volume tumoral foi de forma exponencial a partir do quarto dia pós inoculação tumoral chegando ao crescimento máximo no 15º dia pós inoculação. Como o crescimento exponencial começou no quarto dia, esse se tornou o primeiro grupo experimental. O segundo grupo experimental formado foi o 10º dia pós-inoculação tumoral, devido a ser o dia imediatamente anterior ao 11º dia, pois a partir desse dia todos os animais começavam a morrer. O último grupo a ser formado foi 7º dia pós-inoculação tumoral por ser um dia intermediário entre os grupos escolhidos. Todos os experimentos utilizados para se avaliar a resposta inflamatória tiveram como grupos experimentais, animais sem tumor (grupo controle) e animais com o tumor de Walker, onde este estava inoculado em suas patas (4º, 7º e 10º dias pós inoculação do carcinossarcoma).

O edema de pata é um modelo experimental utilizado para se avaliar a resposta inflamatória aguda. Esse sinal cardinal da inflamação pode ser induzido por varias substancias como, por exemplo, Carragenina e Dextran. O presente trabalho demonstrou que o edema de pata induzido por Cg é inibido pelo carcinossarcoma 256 de Walker em todos os tempos (4º, 7º e 10 º dias pós-inoculação do tumor) e na 2ª e 3ª horas do 4º dia. Esse resultado demonstra que essa neoplasia é capaz de diminuir um dos parâmetros da resposta inflamatória aguda. Dados na literatura mostram que o edema de pata gerado por Cg aumenta o volume da pata de uma forma tempo-dependente e essa droga induz edema em duas fases, sendo uma inicial e uma final (VINEGAR et al., 1969). A fase inicial do edema induzido por carragenina é resultante do aumento da concentração de histamina e serotonina liberados por células mastocitárias (KULKAMI et al. 1986). A fase tardia do edema é produzida por citocinas liberadas por células residentes e migração neutrofílica (DiROSA et al., 1971; VINEGAR et al., 1969, 1982; WEDMORE & WILLIANS, 1981). Como o edema de pata induzido por carragenina possui um componente celular, decorrente da migração neutrofílica, e um componente vascular, onde o aumento do volume da pata é decorrente da ação de mediadores (histamina e serotonina) sobre os vasos, realizamos o experimento de edema de pata induzido por dextran, para identificarmos se a diminuição da resposta edematogênica gerada por carragenina foi mediada por um mecanismo celular ou vascular, já que o edema de pata induzido por dextran é mediado por um aumento da permeabilidade vascular, acúmulo de fluidos, por degranulação de mastocitos, pela presença de poucos neutrófilos e proteínas (LO et al., 1982).

Os nossos resultados mostraram também uma diminuição do edema induzido por DXT (7º e 10º dias pós-inoculação), sugerindo assim que a diminuição do curso da resposta edematogênica induzida por carragenina, foi mediada por mediadores que agem sobre os vasos e não por infiltração de células inflamatórias. Na intenção de reforçar nossos achados e

delinearmos qual mecanismo estava envolvido na diminuição da resposta inflamatória aguda, fizemos protocolos experimentais que avaliavam a migração neutrofílica para o local da inflamação aguda. O primeiro deles, descrito por Souza (2003) foi à avaliação da atividade da enzima MPO. Esse método caracteriza ou não a migração de neutrófilos de uma forma indireta. Os nossos resultados demonstraram que não houve diferença na atividade dessa enzima, que é expressa durante a migração de neutrófilos, quando se comparou o grupo controle, que recebeu intraperitonealmente Cg + salina, e os grupos experimentais (4º, 7º e 10º dias pós-inoculação do tumor), que também receberam Cg. Esses resultados denotam preliminarmente a não participação da infiltração neutrofílica na diminuição da resposta inflamatória induzida por Cg. Para reforçar esses dados foram feitos experimentos que avaliam diretamente a migração de células como, por exemplo, a contagem diferencial de células polimorfonucleares, onde se avalia a quantidade específica de neutrófilos que migrou para a cavidade peritoneal de ratos Wistar. Na avaliação da contagem diferencial, os nossos resultados mostraram que no 4º dia pós-inoculação tumoral não ocorreu diminuição da migração neutrofílica quando se comparou os grupos experimentais (animais com tumor) e o grupo controle. Esses mesmos resultados foram observados e 10º dias pós-inoculação tumoral.

Esses resultados descartaram a hipótese de a diminuição da resposta inflamatória observada no edema de pata, ser por um mecanismo celular decorrente da migração neutrofílica, e reforçou a hipótese de ser por um mecanismo vascular, decorrente da liberação de mediadores inflamatórios e ação dessas substâncias sobre os vasos. Os nossos resultados contradisseram os achados de John P. Brozna e Peter A. Ward (1979). Eles mostraram que os animais que tinham o tumor de Walker inoculado apresentavam uma menor migração de neutrófilos para o local onde o processo inflamatório foi induzido em relação aos animais que não tinham tumor. Esses autores descreveram um modelo experimental onde o processo de migração era

induzido pela administração intraperitoneal de caseína na concentração de 12%. Três dias após essa administração, a quantidade de células que haviam migrado foram contadas com o auxílio de microscópio. Outro modelo descrito por eles foi o acúmulo de leucócitos totais dentro de esponjas circulares, onde a solução de Hanks foi o estímulo responsável para se avaliar também a migração de células inflamatórias nesses animais. Essa solução continha fatores quimiotáticos bacterianos. Os resultados obtidos por esses autores divergiram dos nossos talvez pelo desenvolvimento de técnicas não tão específicas e apuradas para se avaliar o processo de migração pós implante do tumor ou talvez pela linhagem tumoral tiver evoluído em termos de sua virulência tornando-se um carcinossarcoma.

Descartando-se a hipótese da diminuição da resposta inflamatória ser mediada por um mecanismo celular, foram realizados experimentos com o objetivo de avaliar se a diminuição da resposta inflamatória se processava por um mecanismo vascular. Um dos protocolos experimentais executados por nós foi à avaliação da permeabilidade vascular induzida por estímulos inflamatórios (histamina 10µg / sitio , bradicinina 2µg / sitio , substancia P 250 ng / sitio, serotonina 1 µg / sitio, capsaicina 250 µg / sitio e 48 / 80 1µg / sitio). Nossos resultados demonstraram que a permeabilidade vascular induzida por bradicinina, serotonina e 48/80 foi reduzida pela presença do carcinossarcoma 256 de Walker (4º e 7º pós inoculação tumoral) em relação ao grupo controle, que foram os animais que não tiveram essa neoplasia inoculada em suas patas.

Estudos na literatura reforçam a participação do aumento da expressão de receptores BI da Bradicinina e aumento da kaliceína tecidual (TK I) em neoplasias malignas, como por exemplo, o câncer esofágico (ROBERTS RA, 1989). Esses receptores só são expressos em processos patológicos (DALE et al. 2003). A bradicinina induz aumento de permeabilidade vascular por potencializar o efeito da PGE2 (DALE et al., 2003). O que podemos inferir é que o micro ambiente tumoral formado pelo carcinossarcoma 256 de Walker pôde produzir

fatores que inibem a kaliceína tecidual, impedindo assim a formação de mais moléculas de bradicinina. Devido a isso, o aumento da permeabilidade vascular induzida vai estar diminuído, pois esse peptídeo plasmático é de fundamental importância para esse efeito a nível vascular, porque produz PGE2 e NO que são responsáveis pelo desenvolvimento do processo inflamatório e aumento da permeabilidade dos vasos. A célula mastocitária também expressa kaliceína tecidual (SAWICKI et al., 2002), principalmente quando faz parte do micro ambiente tumoral.

Estudos da literatura revelam que os mastócitos de ratos são ricos em serotonina (LO et al., 1982). Esse neurotransmissor, muito importante no desenvolvimento do processo inflamatório é produzido por plaquetas, mastocitos e basófilos no local da inflamação (DRAY, 1995). Nossos resultados revelaram uma diminuição da permeabilidade vascular induzida por serotonina. Através desse resultado podemos inferir que o tumor diminui a permeabilidade vascular por inibir a ação do mastócito ou inibir a ação da serotonina sobre os vasos. O composto experimental 48/80 produz degranulação de Mastocitos (LO et al., 1982). As células mastocitárias são essenciais no desenvolvimento do processo inflamatório por aumentar a proliferação dos vasos e vênulas e por aumentar a produção do VEGF (Fator de crescimento derivado do endotélio) (HIROMATSU et al., 2003). A diminuição da permeabilidade vascular induzida indiretamente por 48/80, demonstrada em nossos resultados, reforça ainda mais a possibilidade da diminuição da resposta inflamatória, mediada pela inoculação do tumor de Walker, ser modulada por um mecanismo vascular e possivelmente mediado pela inativação da degranulação de mastocitos, pois tanto a permeabilidade induzida por serotonina quanto por 48/80 foram reduzidas. A permeabilidade vascular induzida por histamina não foi reduzida em nossos experimentos, quando se comparou os grupos com e sem tumor. Receptores de histamina, como por exemplo, receptores H1 e H2 estão presentes no endotélio dos vasos. A ativação dos receptores H1,

aumenta a expressão das moléculas de adesão I-CAM, V-CAM e P-selectina (YAMAKI et al., 1998; KUBES & KANVAR, 1994), indispensáveis para o processo de migração de neutrófilos durante o curso do processo inflamatório. Os receptores H4 da histamina, quando ativados, são responsáveis pelo acúmulo de células inflamatórias, como por exemplo, mastócitos e eosinófilos no local do processo inflamatório (NAKAMURA et al., 2000). A não diminuição da permeabilidade induzida por esse composto poderá implicar na não interferência do micro ambiente tumoral sobre esses receptores. Os resultados obtidos nos protocolos que avaliaram a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos foram reforçados novamente a partir dos resultados de permeabilidade vascular induzida por histamina, pois provavelmente devido ao tumor não interferir na ação dos receptores desse mediador inflamatório, não poderia interferir nos eventos que envolvem a migração de células inflamatórias.

Em nossos resultados a permeabilidade vascular induzida por capsaicina e por substância P, não foi reduzida de forma significativa, quando se comparou o grupo controle e os grupos nos qual o tumor de Walker foi inoculado (4º e 7º dias pós inoculação tumoral). A não diminuição da permeabilidade vascular induzida por substância P, pode ser explicada, provavelmente, pela não atuação de substâncias do micro ambiente tumoral sobre receptores NK1 (WALSH et al., 1995) de substância P. Estudos na literatura revelam a presença desses receptores em tecidos metastáticos humanos e essa presença foi identificada através do uso de imunohistoquímica (GOSO et al., 1994). Essa hipótese reforçou o resultado encontrado na migração celular, pois se o tumor, provavelmente, não influenciou na ação do receptor NK1, o mesmo não poderia exercer nenhuma influência sobre o processo de migração, já que a ativação desse receptor por substância P gera um aumento da migração e acúmulo de células inflamatórias no local da inflamação (WALSH et al., 1995). A não diminuição da permeabilidade vascular induzida capsaicina, pode ser explicada, pela não atuação de

substâncias do micro ambiente tumoral sobre receptores específicos de capsaicina, que tem como exemplo, TRPV1 (CATERINA et al., 2001). Esse receptor quando ativado leva ao desenvolvimento da inflamação neurogênica por estimular fibras nervosas envolvidas com a nocicepção. Outras substâncias também podem atuar sobre esse receptor, causando aumento da sensibilização das fibras nervosas da nocicepção. Um exemplo clássico disso é a ação da bradicinina na promoção da dor neuropática (DALE et al., 2003).

Observou-se que no 10º dia pós-inoculação todos os estímulos que foram utilizados para induzir a permeabilidade vascular foram reduzidos. Um dos fatores envolvidos nesse resultado, talvez fosse à fraqueza na qual estes animais se encontravam. O décimo dia pós inoculação tumoral foi o dia onde o crescimento tumoral atingiu o seu máximo. Nesse período os animais perdiam seu peso, a temperatura corporal estava aumentada e os pêlos já começavam a cair. Esses sintomas denotavam indício de infecção generalizada, com perda da resposta a qualquer tipo de estímulo. Estudos na literatura afirmam que o paciente com câncer pode vir a ficar imunocomprometido, como resultado da própria doença de base ou do próprio tratamento. Por exemplo, algumas neoplasias estão associadas à deficiência imunológica específica que predispõe a infecção por determinados patógenos. Como os linfomas, que alteram a imunidade celular, aumentando o risco de infecções provocadas por vírus ou fungos. De maneira geral, o maior fator de risco para infecções bacterianas e fúngicas graves em pacientes com câncer, após quimioterapia mielossupressora, é a neutropenia, que nada mais é do que diminuição da quantidade de neutrófilos no sangue (MÍMICA et al., 2000). A diminuição da permeabilidade vascular induzida por bradicinina, serotonina também veio contradizer o trabalho realizado por John P. Brozna e Peter A. Ward (1979). Esses autores realizaram experimentos para avaliar a permeabilidade vascular cutânea em ratos. Em animais com ou sem tumor de Walker foi injetada intravenosamente IgG e imediatamente posterior a isso, os animais receberam os estímulos de serotonina e bradicinina intradermicamente.

Decorridos 30 minutos da injeção de IgG, os animais foram sacrificados, as suas peles foram retiradas e no local onde o estímulo inflamatório foi administrado, foram feitos cortes e retirado pedaços de pele com 2 cm de diâmetro cada. A quantidade de IgG, que determinava o aumento da permeabilidade vascular, foi medida por cintilografia. Esses autores tiveram como resultado a não alteração da permeabilidade vascular, quando se comparou os animais com ou sem tumor de Walker.

Mastócitos de ratos são ricos em serotonina. O composto 48/80 é responsável pela degranulação mastocitária induzida (LO et al. 1982). O mastócito expressa calicreína tecidual, principalmente quando faz parte do micro ambiente tumoral (LO et al. 1982). Como o resultado observado no experimento de permeabilidade vascular listava a diminuição da permeabilidade induzida por serotonina, bradicinina e 48/80, procurou-se realizar um protocolo experimental que avaliasse a participação do mastócito nesse fenômeno, já que essas três substâncias são estreitamente relacionadas com a fisiologia mastocitária. Foi feito um modelo experimental onde se testou a degranulação mastocitária induzida por 48/80. Lo e colaboradores observaram que o composto 48/80 induzia a degranulação de cerca de 98% dos mastócitos estimulados. Nossos resultados mostraram que a degranulação mastocitária foi inibida em todos os grupos experimentais (4º, 7º e 10º dias pós inoculação tumoral) em relação ao grupo controle, que foi o grupo que não teve o tumor de Walker inoculado em suas patas. Esse resultado veio confirmar a hipótese sugerida, quando se inferiu que a diminuição da resposta inflamatória não era alcançada por um mecanismo celular e sim por mecanismo vascular, modulada pelo processo de degranulação do mastócito, célula essa que é de fundamental importância para o desenvolvimento da resposta inflamatória e conseqüentemente, importante no combate da proliferação das neoplasias malignas. Estudos de Biologia molecular deverão ser posteriormente realizados com intuito de se observar a nível de receptores que substâncias o microambiente tumoral libera, para interferir no curso

da inflamação e com isso desenvolver novas drogas que fortaleçam a resposta imune no combate ao processo de malignidade e metástase tumoral.

VI. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A partir dos nossos resultados podemos concluir que:

No curso do crescimento do carcinossarcoma 256 de Walker, houve uma diminuição da resposta inflamatória sistêmica. Este efeito foi dependente da diminuição da resposta vascular à mediadores inflamatórios, como bradicinina e serotonina, bem como a uma diminuição da degranulação de mastócitos. Com isso foi observada uma diminuição na resposta edematogênica a estímulos inflamatórios como dextrana e carragenina, por um mecanismo independente da inibição da infiltração de neutrófilos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W. B. Saunders, cap. 84, p. 366, 1994.

AGGARWAL, B.B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. **Cancer Cell**; v.6(3). p.203–208, 2004.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, S. **Cellular and Molecular Immunology**. W. B. Saunders Company. p. 396-317, 1997.

ALVES, A. P. N. NUNES. Modelo experimental de tumor na cavidade **oral** de ratos com carcinossarcoma de Walker 256. **Acta Cir. Bras.**, vol.19, no.4, p.406-414, 2004.

ANGELO, L.S.; TALPAZ, M.; KURZROCK, R.; Autocrine interleukin-6 production in renal cell carcinoma: evidence for the involvement of p53. **Cancer Res**, v. 62(3), p.932–40, 2002.

ATIKINSON, T.P.; WRITE, M. V.; KALINE , M.A. Histamine and serotonin . In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Sniderman, R. **Inflammation: Basic Principles and Critical Correlates**. New York: Raven Press, p. 123-138, 1992.

BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13(2), p.135–41, 2002.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. **Lancet**, v. 357(9255), p. 539–45, 2001.

BALKWILL, F.; COUSSENS, L.M. Cancer: an inflammatory link. **Nature**, v. 431(7007), p.405–406, 2004.

BOADO, R.J.; PARDRIDGE, W.M.; VINTERS, H.V .; Black K .L. Differential expression of arachidonate 5-lipoxygenase transcripts in human brain tumors: evidence for the

expression of a multitranscript family. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89(19), p.9044–9048, 1992.

BARACAT, F.F.; JUNIOR, H.J.F.; DA SILVA, M.J. Cancer e infecção. Cancerologia atual. 1ªed. Editora Roca.. São Paulo, 2000.

BAYRAM, H.; DEVALLA, J.L.; KHAIR, O.A.; ABDELAZIZ, M.M.; SAPSFORD, R.J.; CZARLEWSKI, W.; CAMPBELL, A.M.; BOUSQUET, J.; DAVIES, R.J. Effect of loratadine on nitrogen dioxide-induced changes in electrical resistance and release of inflammatory mediators from cultured human bronchial epithelial cells. **J. Allergy Clin. Immunol**, v.104, p. 93–99, 1999.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p.618-622, 1982.

BROZNA, J. P.; WARD, P. A. Suppression of acute and chronic inflammation in tumor-bearing rats. **J Clin Invest.** , v. 64(1), p. 302–311, 1979.

BUELL , G.; SCHULZ, M. F.; ARKINSTALL , S. J.; MAURY , K.; MISSOTTEN , M . ; ADAMI , N. ; TALABOT , F.; KAWASHIMA , E. Molecular characterisation, expression and localisation of human neurokinin-3 receptor. **FEBS Letters**, v.299 (1), p. 90–95, 1992.

CARVALHO, R. F.; RIBEIRO, R.A.; FALCÃO, R.A.; LIMA, Rodrigo C.; LEITÃO, RENATA F.C.; ALCÂNTARA, CIRLE; SOUZA, M.H.L.P.; CUNHA, F.Q.; BRITO, G.A.C. Angiotensin II potentiates inflammatory edema in rats: Role of mast cell degranulation. **European Journal of Pharmacology**, v. 540, p.175–182, 2005.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINA, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heatactivated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, p.816–824, 1997.

CHARO, I .F.; RANSOHOFF, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Méd**, v. 354(6), p. 610–21, 2006.

COSTA, J.J.; WELLER, D.F.; GALLI, S.J. As células da resposta alérgica: mastócitos, basófilos e eosinófilos. **JAMA Brasil**, v.2 (5), p. 268-278, 1998.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v.420 (6917), p.860–7, 2002.

CRONSTEIN, B.G. & WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v.136 (2), p. 147-157, 1993.

CUNHA, F.Q. & FERREIRA, H.S. The release of neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin ; inhibition by glucorticoides . **Eur. J. Pharmacol**, v. 129, p . 65, 1986.

CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q.; POOLE & H. FERREIRA. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist 1. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 1418 -1424, 2000.

CUNHA, F.Q.; HELUY – NETO, N.E.; KLEIN, A.; SOUZA, G.E.P. ; FERREIRA, H.S. Failure of PAF M- acether to induce *in vivo* neutrophil migration .**Agents and actions**, v.25(1/2): p.191, 1998.

CUNHA, F.Q. & TAMASHIRO, W.M.S.C. Tumor necrosis factor – alpha and interleukin – 8 inhibition neutrophil migration *in vivo* and in vitro. **Mediators of Inflammation**, 1: 397- 401, 1992.

DALSECCO, D.; MOREIRA, A. P.; FREITAS, Andressa; SILVA, J. S.; ROSSI, MARCOS A.; FERREIRA, SÉRGIO H. & CUNHA, F.Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: Role of soluble guanylate cyclase. **Epub**, v.15(1), p.77-86, 2006.

De WEVER, O. & MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **J.Pathol**, v. 200, p. 429–447, 2003.

DIGEL, W.; STEFANIC, M.; SCHONIGER, W.; BUCK, C.; RAGHAVACHAR, A.; FRICKHOFEN, N. Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.73(5), p.1242–1246, 1989.

DIGEL, W.; SCHONIGER, W.; STEFANIC, M.; JANSSEN, H.; BUCK, C.; SCHMID, M. Receptors for tumor necrosis factor on neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia are expressed in vitro but not in vivo. **Blood**, v.76(8), p.1607–1613, 1990.

DIMITRIADOU, V.; ROULEAU, A.; DAM TRUNG TUONG, M.; NEWLANDS, G.J.; MILLER, H.R.; LUFFAU, G.; SCHWARTZ, J.C.; GARBARG, M., Functional relationship between mast cells and C-sensitive nerve fibres evidenced by histamine H3-receptor modulation in rat lung and spleen. **Clin. Sci.**, v. 87, p.151–163, 1994.

DIROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v. 104, p. 15–29, 1971.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth**, v. 75, p. 125–131, 1995.

DORNELAS, C. A. Modelo experimental do carcinossarcoma 256 de Walker em bexiga de ratos. **Acta Cir. Bras.** , vol.21, no.1, p.38-42, 2006.

DVORAK, A.M. New aspects of mast cell biology. **Intern. J. Neuroscience**, v. 59, p. 91, 1991.

EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256 *in vivo* and *in vitro*. **Am. J. Cancer**, v. 24, p. 566-612, 1935.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer.**; v. 2(3), p. 161–74, 2002.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine mediate inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 1, p. 4-6, 1990.

GALLI, S.J.; GORDON, J. R.; WERSHIL, B.K. Citokine production by mast cell and basophils. **Curr. Opin. Immunol.** v.3, p. 865-872, 1991.

GEENAGRE, A.B.; ROCHA, A.C.; RAWLINGSON MEINERIKANDATHEVAN, POSTON, N.; RUIZ, HALLIWELL & D. BRAIN . Protein nitration in cutaneous inflammation in the rat: essential role of inducible nitric oxide synthase and polymorphonuclear leukocytes. **British Journal of Pharmacology**, v.136, p. 985 – 994, 2002.

GERARD, N.P.; BAO, L.; XIAO-PING, H.; GERARD, C. Molecular aspects of the tachykinin receptors. **Regulatory Peptides**, v. 43 (1–2), p. 21–35, 1993.

GERARD, N.P.; EDDY Jr.; SHOWS, R.L.; GERARD, C. The human neurokinin A (substance K) receptor. Molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.265 (33), p. 20455–20462, 1990.

GIRIDK, AGGARWALL B. B. Constitutive activation of NF kappa B causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. **J Biol Chem.**, v. 273(22), p.14008–14014, 1998.

GOSO, C.; POTIER, E.; MANZINI, S.; SZALLASI, A: Comparison of tachykinin NK1 receptors in human IM9 and U373 MG cells, using antagonist (FK888, (+/–)-CP-96,345, and RP 67580) binding. **Eur J Pharmacol**, v. 254, p.221–227, 1994.

GRÜTZAKAU, A.; KRÜGER-KRASAGAKES, S.; BAUMEISTER, H.; SCHWANZ, C.; KÖGEL , H.; WELKER, P.; LIPPER, T.U.; HENZB M.; MÖLLER, A. Synthesis ,storage , and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor(VEGF/VPF) by human mast cells :implications for the biological significance of VEGF.**J. Mol. Biol. Cell.**, v. 4, p. 875-884, 1998.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Substance P. **Int J Biochem Cell Biol**, v.33, p.555–576, 2001.

HIROMATSU, Y.; TODA, S. Mast cells and angiogenesis. **Microsc Res Tech.**, v.60 (1), p. 64-69, 2003.

HUANG, S.; ROBINSON J.B.; DEGUZMAN A.; BUCANA, C.D.; FIDLER, I.J. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. **Cancer Res.**, v. 60(19), p.5334–53399, 2000.

International Agency for Research on Cancer – IARC. GLOBOCAN 2000 –Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. **Banco de Dados**. 2000. Disponível em: <<http://www.dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>>. Acesso em: 6 dez. 2002.

JEANNIN, P.; DELNESTE, Y.; GOSSET, P.; MOLET, S.; LASSALLE, P.; HAMID, Q.; TSICOPOULOS, A.; TONNEL, A.B. Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. **Blood**, v.84, p. 2229–2233, 1994.

KHAN, I.; COLLINS, S.M. Fourth isoform of preprotachykinin messenger RNA encoding for substance P in the rat intestine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 202 (2), p. 796–802, 2002.

KLEIN, B.; ZHANG, X.G.; JOURDAN, M.; CONTENT, J.; HOUSSIAU, F.; AARDEN, L. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. **Blood**, v. 73(2), p.517–26, 1989.

KOIVISTO, T.; KAIHOVAARA, P.; SALASPURO, M. Acetaldehyde induces histamine release from purified rat peritoneal mast cells. **Life Science**, v. 64, p. 183-190, 1999.

KOTHAPALLI, R.; NYLAND, S.B.; KUSMARTSEVA, I.; BAILEY, R. D.; MCKEOWN, T.M.; LOUGHRAN, Jr. T. P. Constitutive production of proinflammatory cytokines RANTES, MIP-1beta and IL-18 characterizes LGL leukaemia. **Int. J. Oncol.**, v.26(2), p. 529–35, 2005.

KRAUSE, J.E.; STAVETEIG, P.T.; MENTZER, J.N.; SCHMIDT, S.K.; TUCKER, J.B.; BRODBECK, R.M.; BU, J.Y.; KARPITSKIY, V.V. Functional expression of a novel human neurokinin-3 receptor homolog that binds [3H]senktide and [125I-MePhe7]neurokinin B, and is responsive to tachykinin peptide agonists. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 94 (1), p. 310–315, 1997.

KUBES, P.; KanWAR, S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. **J. Immunol.**, v.152, p. 3570–3577, 1994.

KULKARNI, S. K.; MEHTA, A.K.; KUNCHANDY, J. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw oedema in rats. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 279, p. 324–334, 1986.

LANDI, S.; MORENO, V.; GIOLA-PATRICOLA, L.; GUINO, E.; NAVARRO, M.; DE OCA, J. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFkB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. **Cancer Res.**, v. 63(13), p. 3560–3566, 2003.

LO, T.N.; ALMEIDA, A.P. and BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J. PET.**, v.221, p. 261-267, 1982.

MANABE, Y.; TODA, S.; MIYASAKI, K. & SUGIHARA, H. M. Adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. **J. Pathol.**, v. 201, p. 221–228, 2003.

MAGHNI, K.; MICHOU, M. C.; ALLES, M.; RUBIN, A.; GOVINDARAJU, V.; MELOCHE, C.; MARTIN, J.G. Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-A gene: regulation by passive sensitization. **American Journal of Respiratory and Cell Molecular Physiology**, v. 28 (1), p.103–110, 2003.

MANTYH, P.W: Substance P and the inflammatory and immune response. **Ann NY Acad Sci**, v. 632, p.263–271, 1991

MANTOVANI, A. Cancer: inflammation by remote control. **Nature**, v. 435(7043), p.752–753, 2005.

McEVER , R. P. Leucocyte –endothelial cell interactions . **Curr. Opnion in Cell Biology**, v. 4, p. 840-849, 1992.

McEVER , R. P. Leucocyte interations mediate by selectins .**Thromb. Haemost**, v. 66, p. 80-87, 1991.

MILLER, J.; NELSON, H.S. Suppression of immediate skin tests by ranitidine. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.84, p.895–899, 1989.

MORAES FILHO, M.O. **Efeitos antineoplásicos do *Croton mucronifolius* Mull. Arg. no carcinossarcoma 256 de Walker**. 1981. 180 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1981.

MOARES FILHO, M.O.; FONTELES, M.C.; MATOS, F.J.A.; MORAES, M.E.A. Atividade antitumoral de plantas do Nordeste Brasileiro. **Ciência e Saúde**, v. 31, n. 7, p. 647, 1980.

MUELLER, M. M.; WERBOWETSKI, T. & DEL MAESTRO, R. F. Soluble factors involved in glioma invasion. **Acta Neurochir**, v.145, p.999–1008, 2003.

MUROHARA, T.; ASAHARA, T.; SILVER, M.; BAUTERS, C.; MASUDA, H.; KALKA, C.; KEARNEY, M.; CHEN, D. J. F. SYMES; FISHMAN, HUANG M. C.; P. L. & ISNER, J.M.. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. **J Clin Invest.**, v.101 (11), p. 2567–2578, 1998.

NAKAE, S.; SUTO, H.; KAKURAI, M.; Sedgwick, J. D.; Mindy Tsai & Stephen J..Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. **PNAS**, vol. 102 no. 18, p. 6467–6472, 2005.

NAKANISHI, S. Mammalian tachykinin receptors. **Annual Review of Neuroscience**, v. 14, p.123–136, 1991.

NAKAMURA, T.; ITADANI, H.; HIDAKA, Y.; OHTA, M.; TANAKA, K. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 279, p. 615–620, 2000.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J**, v.6 (12), p.,3051–64, 1992.

OKAMOTO, M.; KAWAMATA, H.; KAWAY, K.; OYASU, R. Enhancement of transformation in vitro of a nontumorigenic rat urothelial cell line by interleukin 6. **Cancer Res**, v.55 (20), p.4581–4585, 1995.

O'REILLEY, M.; ALPERT, R.; JENKINSON, S.; GLADUE, R.P.; FOO, S.; TRIM, S.; Peter, B.; TREVETHICK, M.; FIDOCK, M. Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils — role in eosinophil chemotaxis. **J. Recept. Signal Transduct. Res**, v. 22, p. 431–448, 2002.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Local hormones, inflammation and immune reactions. In: *Pharmacology*. 5^aed. Churchill Livingstone. Edinburgh, 2003.

RAY, F.E.; CROMER, M.A.; AYCOCK, A.C.; PITZER, N. The selection of gastric carcinogens. **Brit. J. Cancer**, v. 15, p. 816-820, 1961.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMMAR, V. **Pathologic basis of diseases**. Philadelphia:W.B.Saunders Company , cap.3 inflammation and repair, p.1400,1994.

ROCHA & SILVA, M.O. A brief history of inflammation. In: Vane, Jr. & Ferreira, S.H (editors). **Handbook of experimental pharmacology**. Springer – velarg , v.50/1 , p.6-25 , 1978.

ROBERTS, R.A.; GULLICK , W .J. Bradykinin receptor and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis is increased by expression of a mutant ras oncogene. **J. Cell Sci.**, v. 94, p. 527–35, 1989.

SCHAEFER, U.; SCHMITZ, V.; SCHNEIDER, A.; NEUGEBAUER, E. Histamine induced homologous and heterologous regulation of histamine receptor subtype mRNA expression in cultured endothelial cells. **Shock**, v .12, p.309–315, 1999.

SAWICKI, B.; KASACKA, I.; CHYCZEWSKI, I. Preliminary evaluation of mast cells and angiogenesis processes in experimental fibrosarcoma. **Folia Histochem Cytobiol**, v.40, p.197–198, 2002.

SCHMIEGEL, W.; ROEDERC, SCHMIELAU J.; RODECK, U.; KALTHOFF, H. Tumor necrosis factor alpha induces the expression of transforming growth factor alpha and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90 (3), p.863–867, 1993.

SCHREK, R.; AVERY, R.C. Histological observation on transplantable rat and rabbit tumors cultivated in the chorio-allantoic membrane of chick embryos, with special reference to the Walker rat tumor 256. **Am. J. Path.**, v. 13, p.45-41, 1937.

STETLER-STEVENSON, W. G. & YU, A. E. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. **Semin. Cancer Biol**, v.11, p.143–152, 2001.

SHISHODIA, S.; AGGARWALL, B .B. Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer? **Biochem Pharmacol**, v.68 (6), p.1071–1080, 2004.

SIMONS, F.E.R.; SIMONS, K.J. The pharmacology and use of H1-receptor antagonist drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 330, p.1663–1670, 1994.

SIMONS, F.E.R.; SIMONS, K.J. Peripheral H1-blockade effect of fexofenadine. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 79, p.530–532, 1997.

SMITH, W. L.; DeWITT, D. L. & GARAVITO, R.M..Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem**, v. 69, p.145–182, 2000.

SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p.97–103, 1985.

SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F Q.; MELO, R.; FERREIRA, S.H. Neutrophil migration induced by inflammation stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and Actions**. v. 24 (3/4), p. 377, 1988.

STEWART, H.L.; SVELL, K.C.; DUHAM, L.J.; SCHLYEN, M.S. Transplantable and transmissible tumors of animals. 1st ed., **Washington: Armed Forces Institute of Pathology**, 1959.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**, v. 51, p.159–212, 1999.

TAKAHASHI, K.; TANAKA, A.; HARA, M.; NAKANISHI, S. The primary structure and gene organization of human substance P and neuromedin K receptors. **European Journal of Biochemistry**, v. 204 (3), p. 1025–1033, 1992.

TAKEDA, Y.; CHOU, K. B.; TAKEDA, J.; Sachais, B.S.; KRAUSE , J.E. Molecular cloning, structural organization and functional expression of the human substance P receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v .179 (3), p. 1232–1240, 1991.

TAKEDA, Y.; TAKEDA, J.; SMART, B. M.; KRAUSE, J. E. Regional distribution of neuropeptide gamma and other tachykinin peptides derived from the substance P gene in the rat. **Regulatory Peptides**, v. 28 (3), p. 323–333, 1990.

TALALAY, P.; TAKANO, E. M. V.; Hughins, P. Studies on the Walker tumor. I. Standardization of growth of a transplantable tumor. **Cancer Res**, v. 12, p. 834-837, 1952.

VALENT, P.; ASHMAN, L. K.; HINTERBERGER, W.; ECKERSBERGER, F.; MAJDIC, O.; LECHNER, K. & BETTELHEIM, P. **Blood**, v. 73, p.1778-1785, 1989.

VAN't VEER, L. J. ; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y.D.; HART, A. A. ; MAO, M. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415(6871), p.530–536, 2002.

VAN FURTH, R. Mononuclear phagocytes in inflammation . In: VANE , J. R. & FERREIRA , S. H. (editors).**Handbook of experimental Pharmacology** .Springer-verlag . 50/I: 68, 1978

VANHAMME, L.; MARSHALL, G.M.; SCHUH, A.C.; BREITMAN, M. L.; VOGT, P.K. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 alpha induce anchorage independence in v-jun transgenic murine cells. **Cancer Res**, v.53(3), p.615–21, 1993.

VARKI, A. Selectins and other mammalian sialic-acid binding lectins . **Curr. Opin . Cell . Biol**, v. 4, p . 257-266, 1992.

VOORZANGER, N.; TOUITOU, R.; GARCIA, E.; DELECLUSE, H. J.; ROUSSET, F.; JOAB, I. Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced in vivo by non-Hodgkin's lymphoma cells and act as cooperative growth factors. **Cancer Res**, v. 56(23), p. 5499–505, 1996.

WALSH, D.T.; WEG, V.B.; WILLIAMS, T. J.; NOURSHARGH, S. Substance P induced inflammatory responses in guinea-pig skin: the effect of specificNK1 receptor antagonists and the role of endogenous mediators. **Br J Pharmacol**, v. 114, p.1343–1350, 1995.

WERNER, S. & GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev**, v. 83, p. 835–870, 2003.

YAMAKI, K.; THORLACIUS, H.; XIE, X.; LINDBOM, L.; HEDQVIST, P.; RAUD, J. Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. **Br. J. Pharmacol**, v. 123, p.390–399, 1998.

YU, Y.; MOULTON, KAREN S.; KHAN, MOHAMED K.; VINEBERG, S.; BOYE, E.; DAVIS, V. M.; O'DONNELL, PETER E.; BISCHOFF, J.; MILSTONE, D. S. E-selectin is required for the antiangiogenic activity of endostatin. **PNAS**, v.101, p. 8005-8010, 2004

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; CHOUDHURI R. ; ZHANG, H.T.; DONNINII, 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. **J Clin Invest**, v.99(11), p. 2625–2634, 1997.

ZHU, Y.; MICHALOVICH, D.; WU, H.; TAN, K.B.; DYTOKO, G.M.; MANNAN, I. J.; Boyce, R.; ALSTON, J.; TIERNEY, L.A.; LI, X.; HERRITY, N.C.; VAWTER, L.; SARAU, H.M.; AMES, R.S.; DANEVPORT, C.M.; WERNER, H.; S. & GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev**, v. 83, p.835–870, 2003.

VIII. ANEXOS

**TUMOR BEARING DECREASES SYSTEMIC ACUTE INFLAMMATION IN RATS -
ROLE OF MAST CELL DEGRANULATION.**

André Luiz dos Reis Barbosa, Cleiton Araújo Pinheiro, Graciela Josué de Oliveira, Manoel Odorico de Moraes, Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, Mariana Lima Vale, Marcellus Henrique Loiola Ponte Souza.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, 60.430-270, Fortaleza-CE, Brazil.

Corresponding author:

Professor Marcellus Henrique Loiola Ponte Souza, MD, PhD

Centro de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Address for reprint requests: Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE, Brazil, CEP: 60.430-270, Fone: +55-85-33668588, Fax: +55-85-33668333. e-mail: souzamar@ufc.br

Running head: Tumor bearing decreases systemic acute inflammation.

Key words: Cancer, inflammation, mast cell.

Abstract:

Objective and design: To investigate the effect of experimental tumor bearing in acute inflammation models in rats. Material or subjects: After 4th and 7th days of Walker tumor implantation in right armpit, carrageenan or dextran– induced edema in contralateral paw, carrageenan induced neutrophil migration into peritoneal cavities, cutaneous vascular permeability induced by bradykinin, histamine, serotonin, substance P, capsaicin or 48/80 compound, and mesentery mast cell degranulation induced by 48/80 compound were evaluated. Control group did not receive tumor implantation. Statistical analysis was performed using one way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test. Results: In the 7th day after tumor inoculation, there were significant decrease in both carrageenan and dextran-induced paw edema. Tumor bearing did not change the neutrophil infiltration induced by carrageenan. There were decreases in cutaneous vascular permeability induced by 48/80 compound, serotonin or bradykinin, but not induced by histamine, substance P. In the mast cell degranulation, it was observed a significant inhibition of mesentery mast cell degranulation induced by 48/80 compound, in the 4th and 7th day after tumor inoculation. Conclusion: Tumor bearing could narrow mast cell function and vascular events in acute systemic inflammation in rats, without changes in neutrophil migration.

1. Introduction

Several inflammatory mediators, such as cytokines, metalloproteinases, lipoxygenase and cyclooxygenase products, are part of the tumor microenvironment, and are important factors in tumoral growth [1-2]. It's been recently suggested that **cancer can induce** immunosuppression, which evolves in an immunosuppressive network extending from a primary tumor site to secondary lymphoid organs and peripheral vessels, and is affected by several mediators, such as interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor- β (TGF- β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) [3].

Mast cell accumulation in peritumoral inflammatory infiltrate contributes to a permissive microenvironment during tumor growth [4-6]. There is no evidence that a decrease in mast cell function could be associated to cancer immunosuppression. [7]

Walker 256 tumor is widely utilized in experimental cancer research, due to its easy transplantation, lack of regression or strain specificity and rarity of spontaneous metastases, as well as its successful transposition to tissue culture [8]. Brozna & Ward demonstrated in 1979 that both acute and chronic cellular inflammatory reactions were suppressed in rats bearing Walker 256 tumor [9]. However, the mechanisms through which Walker 256 tumor induces a decrease in rat systemic inflammation were not elucidated.

The main goal of the present study is to investigate the effects of experimental tumor bearing in classical acute inflammation models in rats, and evaluate the influence of mast cell degranulation inhibition in these events.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats weighing 180–200 g were housed in temperature-controlled rooms and received water and food *ad libitum* until use. All experiments were conducted in accordance to NIH standards and approved by the Committee of Ethics in Animal Research and Care of the Federal University of Ceará.

2.2. Drugs.

Carrageenan, dextran, bradykinin, serotonin, substance P, histamine, capsaicin and 48/80 compound were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Vehicle solutions consisted of PBS buffer or saline.

2.3. Tumor inoculation.

Tumor nodules from tumor bearing rats were excised, gently homogenized in a hand-operated tissue grinder, suspended in sterile actated ringer's with gentamicin and adjusted to a concentration of 10^6 viable tumor cells/mL. The tumor was implanted by intramuscular injections of 10^6 tumor cells into the right armpit [10]. Animals were housed in cages with food/mineral water *ad libitum*. In preliminary experiments, tumor growth was observed, starting from the 4th day (329.3 ± 86.1 mm³), continuing to the 7th day (2892.0 ± 614.8 mm³), and reaching maximum growth in the 15th day (16390.0 ± 3050.0 mm³) after tumor inoculation. We also observed that after 15 days of tumor inoculation, animal mortality reached 100%. In this study we evaluated tumor bearing effects after 4th and 7th days of tumor implantation.

2.4. Carrageenan- and dextran-induced paw edema.

Paw edema was induced by subplantar injection of carrageenan (300 µg/paw ; **0.1 mL**) or dextran (500 µg/paw ; **0.1 mL**). This edema was evaluated in the tumor contralateral hind paw. Animals with tumor (4th, 7th days after tumor inoculation) or without tumor (control group) received the same inflammatory stimulus. Paw volume was measured with a plethysmometry (Ugo-Basile 7140 Plethysmometer) immediately before (basal volume) and at 1,2, 3 and 4 h after carrageenan administration or 30', 1 2, 3 and 4h after dextran administration. Results were expressed as paw volume variation (mL), calculated by subtracting paw basal volume from the hydroplethysmometer.

2.5. Stimulation of neutrophil migration into peritoneal cavities.

Carrageenan (300 µg/1,0 mL) or saline (1,0 mL) were injected intraperitoneally (i.p.) in rats with tumor (4th, 7th after tumor inoculation) or without it. Three hours after carrageenan injection, animals were sacrificed and peritoneal fluid was collected. Total and differential cell counts were performed as described elsewhere [11].

2.6. Myeloperoxidase activity assays.

Carrageenan (Cg;300 µg/paw) was administrated into the left hind paw in animals with tumor (4th and 7th and day after tumor inoculation) or without it. Four hours after carrageenan administration, animals were sacrificed and the whole plantar region left paw skin was harvested. After homogenization and centrifugation (4500 rpm, 20 min), myeloperoxidase activity, an enzyme found in azurophil neutrophil granules, was established through a previously described colorimetric method and expressed as units of myeloperoxidase activity per mg of tissue [12].

2.7. Cutaneous vascular permeability.

In the 4th and 7th day after tumor inoculation, rats with or without tumor were divided into six groups and stimulus injections (bradykinin, histamine, serotonin, substance P, capsaicin or 48/80 compound) were administered intradermally **into shaved dorsal skin**. Immediately after stimulus, Evans blue dye was administered (25 mg/kg, i.v., 100 μ l/100 g of body weight). Thirty minutes later, the blue area was collected and soaked with 1 ml of formamide for 48 hrs at 37° C. Supernatant absorbance was measured by spectrophotometry (630nm). Supernatant dye content was calculated according to the Evans Blue standard curve and values were expressed with μ g of Evans blue per mg of tissue [13].

2.8. Mast cell degranulation in mesentery tissue.

Animals with tumor (4th, 7th day after tumor inoculation) or without it were sacrificed. **Mesenteric tissues were** collected from the respective groups and disposed into each of the Petri dishes containing Ringer Locks fluid (10 ml). Mast cell degranulation was induced by incubation of dishes containing mesenteric tissue collected from animals with or without tumor with compound 48/80 (final concentration, 0.8 μ g/mL) for 30 min and disposed on microscopic slides. Hydrated tissue sections were immersed in a 0.1% toluidine blue solution (in 0.9% sodium chloride) for 60 s, followed by extensive rinsing in deionised water as previously described [14]. The percentage of degranulated mast cells was determined by counting one hundred stained cells per tissue section.

2.9. Statistical analysis.

Results were presented as means and standard errors of the mean for groups of six animals each. Differences between experimental groups were compared by Analysis

of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's t-test. Significance level was set at $p < 0.05$ and $p < 0.001$.

3. Results

3.1 Effects of tumor bearing on carrageenan or dextran - induced paw edema.

In figure 1, we can observed that from the 7th day after tumor inoculation on, there was significant decrease in both carrageenan (panel A) and dextran (panel B) - induced paw edema in all intervals. However, in the 4th day after tumor inoculation, we observed a decrease in paw edema with carrageenan (panel A), but not with dextran (panel B).

3,2 Effect of tumor bearing on carrageenan - induced neutrophil infiltration.

Figure 2 demonstrated that neither the 4th nor the 7th day after tumor inoculation presented any changes in carrageenan - induced peritoneal neutrophil infiltration. Furthermore, in figure 3, we also observed that tumor bearing did not change MPO activity growth induced by carrageenan in the paw.

3.3 Effect of tumor bearing on the increase in cutaneous vascular permeability induced by bradykinin, serotonin, substance P, histamine, capsaicin and compound 48/80.

In figure 4, we can observed that in the 4th and 7th day after tumor inoculation, there was a decrease in cutaneous vascular permeability induced by 48/80 compound (panel A), serotonin (panel B) or bradykinin (panel D), but not induced by histamine (panel C). Tumor bearing did not change cutaneous vascular permeability induced by capsaicin (panel E) and substance P (panel F).

3.4 Effects of tumor bearing in 48/80 compound - induced mesentery mast cell degranulation.

Figure 5 showed a significant inhibition of mesentery mast cell degranulation induced by 48/80 compound, in the 4th and 7th day after tumor inoculation when compared to the control group (saline).

4. Discussion

Only a few findings in literature have shown the interference of tumoral microenvironment on acute systemic inflammatory response. Previous studies had shown that Walker tumor, when inoculated in rats, reduces inflammatory parameters, as a result of vascular permeability induced by histamine and neutrophil migration induced by polyvinyl sponges [9]. However, this study had not defined mechanisms by which Walker tumor decreases the systemic acute inflammatory process. Our results demonstrated that tumor bearing reduces carrageenan and dextran paw edema; serotonin, bradykinin and compound 48/80 provoke cutaneous vascular permeability, and decrease mesentery mast cell degranulation induced by 48/80 compound, with no changes in neutrophil migration induced by carrageenan. Therefore, we can infer that tumor bearing could decrease mast cell function and vascular events in acute systemic inflammation.

Our results demonstrated that Walker tumor inoculation decreases paw edema induced by carrageenan and dextran. Evidence found in literature demonstrates that carrageenan - induced paw edema has two phases. The early phase is the result of increase histamine and serotonin in extracellular space [15]. The late edema phase is known to be dependent on cytokine production by resident cells and neutrophil infiltration [16 -18]. On the other hand, paw edema induced by dextran is only mediated by an increase in vascular permeability, through fluid accumulation and mast cell degranulation [19]. Our results show that tumor bearing reduced both the early and late phases of carrageenan - induced paw edema, and also decreased

dextran - induced paw edema. Therefore, we can infer that at least the vascular component of the edema is reduced in tumor bearing.

In order to study cellular component participation in systemic acute inflammation reduction during tumor bearing, we evaluated neutrophil infiltration in two classical models. Contrary to literature, our results showed that neither peritoneal nor paw tumor bearing changed neutrophil infiltration induced by carrageenan. Brozna & Ward demonstrated that 2×10^7 Walker tumor inoculation cells reduced neutrophil migration induced by implanted polyvinyl sponges after 16- 24 hours [9]. Compared to our model, there are some important differences. Firstly, Brozna & Ward inoculated more tumor cells; secondly, polyvinyl sponges induced chronic inflammation.

In an attempt to identify possible mediators involved in Walker tumor anti-edematogenic activity, we evaluated cutaneous vascular permeability for some important inflammatory stimuli. Our results demonstrated that tumor bearing diminished bradykinin and serotonin- induced vascular permeability, but not histamine- induced vascular permeability. Bradykinin is formed in the plasma in response to inflammatory processes and improves vascular permeability and edema formation by NO production, and it also activates potassium channels [20 – 23]. Serotonin is a mediator found in large amounts in mast cells, participates in the genesis of acute inflammatory vascular events and in various stages of the immune response [24 - 26]. Serotonin receptors 5-HT1 and 5-HT3 have also been associated to mast cell degranulation modulation [27 - 28]. The effect of Walker tumor inoculation in serotonin - induced vascular permeability could be explained at least in two ways: (1) Walker tumor could produced serotonin receptor antagonists located in the peripheral microvasculature, (2) Walker tumor could interfered with serotonin's

autocrine effect in mast cells, thus preventing degranulation. However our results do not rule out the possibility that other mechanisms could be involved.

Our results have demonstrated that tumor bearing does not change capsaicin and substance P - induced vascular permeability. Capsaicin and substance P stimulate peripheral terminals of C-fibers, causing the release of neuropeptides (such as tachykinins), thus initiating the cascade of neurogenic inflammation with a growth in vascular cutaneous permeability [29 – 31]. According to this data, we can infer that Walker tumor doesn't inhibit vascular permeability growth induced by neurogenic inflammation.

In order to study if tumor bearing prevents mast cell degranulation, we utilized a pharmacological approach using 48/80 compound, a substance that degranulates mast cells and promotes content release. Our results demonstrated that vascular permeability and mast cells degranulation induced 48/80 compound decrease in tumor bearing. These findings point towards the hypothesis that tumor bearing interferes in mast cell function, which is responsible for the inflammatory vascular permeability and the edema [18]. Both histamine and serotonin can be released by mast cells. Our results demonstrated that in contrast to serotonin, histamine does not seem to influence the tumor-induced vascular permeability. One possible explanation is that histamine is the single amine known to be stored in human mast cells and rodent mast cells store more serotonin than histamine [19].

have in minor concentration in mast cells of rodents when compared with the level of serotonin [19].

To summarize, our results demonstrated that tumor bearing reduces carrageenan and dextran paw edema, serotonin, bradykinin and compound 48/80 - induced cutaneous vascular permeability, and also diminishes mesentery mast cell

degranulation induced by 48/80 compound, without changes in neutrophil migration induced by carrageenan. Therefore, we can infer that tumor bearing could narrow mast cell function and vascular events in acute systemic inflammation.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Maria Silvandira Freire França. Grants from CNPq (Brazil) supported this work. Dr. Ribeiro, Dr. Moraes and Dr. Souza are recipients of a CNPq fellowship.

References

1 Digel W, Stefanic M, Schoniger W, Buck C, Raghavachar A, Frickhofen. Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1989; 73:1242–46.

2 Schmiegel W, Roederer Schmielau J, Rodeck U, Kalthoff H. Tumor necrosis factor alpha induces the expression of transforming growth factor alpha and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 863–7.

3 Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology* 2006; 119: 254–264.

4 Coussens LM, Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different. *J Exp Med* 2001; 193: 23 – 26.

5 Nakayama T, Yao L, Tosato G. Mast cell-derived angiopoietin-1 plays a critical role in the growth of plasma cell tumors. *J Clin Invest* 2004; 114: 1317–25.

6 Kulkarni SK, Mehta AK, Kunchandy J. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw edema in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986; 279: 324–334.

7 Church M, Levi-Schaffer F. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:155–160.

8 Meyers R. Studies on tumor antigens of the Walker 256 carcinosarcoma. *Immunochemistry* 1974;12: 589–95.

9 Brozna JP , Ward PA. Suppression of acute and chronic inflammation in tumor-bearing rats. *J Clin Invest* 1979; 64: 302–311.

10 Silva SL, Silva SF, Cavalcante RO, Mota RS, Carvalho RA, Moraes MO, Campos HH, Moraes ME. Mycophenolate mofetil attenuates Walker's tumor growth when used alone, but the effect is lost when associated with cyclosporine. *Transplant Proc* 2004; 36:1004-6.

11 Souza GEP, Ferreira SH. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions* 1985; 17: 97–103.

12 Bradley PP, Robert D. Christensen, and Gerald Rothstein. Cellular and Extracellular Myeloperoxidase in Pyogenic Inflammation. *Blood* 1982; 60: 618-622.

13 Brito GA, Souza MH, Melo-Filho AA, Hewllet EL, Lima AA, Flores CA, Ribeiro RA. Role of Pertussis Toxin A Subunit in Neutrophil Migration and Vascular Permeability. *Infection and Immunity* 1997; 65: 1114-1118.

14 Oliveira FA, Lima-Junior RC, Cordeiro WM, Vieira-Júnior GM, Chaves MH, Almeida FR, Silva RM, Santos FA, Rao VS. Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacol Biochem Behav.*2004; 78(4):719-725.

15 Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Voelker FA. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. *Fed Proc* 1982; 41: 2588-95.

16 Kulkarni SK, Mehta AK, Kunchandy J. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw oedema in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986; 279: 324–334.

17 DiRosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on acute inflammatory response mediators induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 1971; 104: 15–29.

18 Vinegar, R., Schreiber,W., Hugo, R, Biphasic development of carrageenan edema in rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1969; 166: 96–103.

19 Metcalfe DD., Baram D, Mekori Y A. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77: 1033-1079.

20 Chao J, Chao L, Swain CC, Tsai J, Margolius HS. Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology* 1987; 120: 475–482.

21 Raidoo DM, Sawant S, Mahabeer R, Bhoola KD. Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells. *Immunopharmacology* 1999; 43: 255 – 263,

22 Scicli AG, Forbes G, Nolly H, Dujovny M, Carretero OA. Kallikrein–kinins in the central nervous system. *Clin Exp Hypertens* 1984; 6: 1731–1738.

23 Walker K, Perkins M, Dray A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 1995; 26: 1–16.

24 Dey RD, Hoffpaur J. Ultrastructural immunocytochemical localization of 5-hydroxytryptamine in gastric enterochromaffin cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1984; 32: 661-666.

25 Nagata K, Fujimiva M, Sugiura H, Uehara M. Intracellular localization of serotonin in mast cells of the colon in normal and colitis rats. *Histochem J* 2001; 33: 559–568.

26 Mossner R, Lesch KP. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun* 1998; 12: 249–271.

27 Castex N, Fioramonti J, Fargeas MJ, More J, Bueno L. Role of 5-HT₃ receptors and afferent fibers in the effects of mast cell degranulation on colonic motility in rats. *Gastroenterology* 1994; 107:976–984.

28 Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L. Mast cell degranulation induces delayed rectal allodynia in rats: role of histamine and 5-HT. *Digest Dis Sci* 1998; 43:727–737.

29 Jancsó G, Kiraly E, Janksor-Gabor A.. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 1977; 270 : 741–742.

30 Holzer P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 5–11.

31 Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 839–845.

Legends

Figure 1 – Effect of tumor bearing on carrageenan or dextran - induced paw edema. Carrageenan (300 μ g/paw) and dextran (500 μ g/paw) were injected and paw volume was measured after 0, 1, 2, 3 and 4 hs for Carrageenan and after 30min, 1, 2, 3 and 4 hs for dextran. A: Evaluation of paw edema induced by Carrageenan after 1h, 2h, 3h and 4h in the 4th and 7th day after tumoral inoculation. B: Evaluation of paw edema induced by dextran, after 30min, 1, 2, 3 and 4 hs in the 4th and 7th day after tumoral inoculation. (*) p <0.05 compared to control group (ANOVA / Bonferroni).

Figure 2 - Effect of tumor bearing on carrageenan - induced neutrophil infiltration. In the 4th (panel A) or 7th day (panel B) after tumor inoculation, carrageenan (300 μ g) or saline solution was injected in rat peritoneal cavity with or without Walker tumor. Three hours after saline or carrageenan injection, rats were sacrificed and neutrophil migration was evaluated. Bars represent the mean \pm **SEM** of 10³ \times neutrophil/mL for 6 rats of each group. Didn't differences statistically significant between the groups Cg (without or with tumor). (**) p<0.01 compared to saline group (ANOVA/Bonferroni).

Figure 3 – Effect of tumor bearing in MPO activity. Carrageenan - induced growth in MPO activity did not change during tumor bearing (4th, 7th day after inoculation). Columns represent the mean \pm **SEM** of MPO group units. Saline (sal, n = 6),

Carrageenan (n = 6), Carrageenan + Tumor (n = 6). (**) $p < 0.001$ compared to saline (sal) group. (ANOVA/ Bonferroni).

Figure 4 – Effect of tumor bearing on the increase in cutaneous vascular permeability induced by 48/80 compound, serotonin, histamine, bradykinin, capsaicin or substance P. The 48/80 compound (panel A), serotonin (panel B), histamine (panel C), bradykinin (panel D), Capsaicin (panel E) and substance P (panel F) were injected in rats with tumor (4th, 7th day after inoculation). Control group was composed by rats without tumor (control). After 1 h, animals were sacrificed and skins removed. Skin permeability was evaluated by the amount of Evans blue extravasated measured in spectrofotometry at 600nm. Bars represent the mean \pm **SEM** μ g of Evans blue for mg of tissue. (*) $p < 0, 05$ compared to control group. (ANOVA/ Bonferroni).

Figure 5 - Effect of tumor bearing in 48/80 compound induced mesentery mast cell degranulation. Animals with tumor (4th, 7th day after tumor inoculation) or without it (control group) were sacrificed. Mesentery tissue was harvested and fixed with animal albumin. Tissue samples were rinsed in PBS or 48/80 compound (0.8 μ g/mL). Afterwards, tissue fixed sections were immersed in a solution of 0.1% toluidine blue. Percentages of degranulated mast cells were determined by counting one hundred stained cells in different fields ($\times 400$). **Bars represent** the mean \pm **SEM** of mast cell degranulation percentage. (*) $p < 0.001$ compared to control group (ANOVA / Bonferroni).

Histamine is the single amine known to be stored in human mast cells, although mast cells of other species are known to store additional amines. For instance, rodent mast cells also store serotonin.

Figure 1

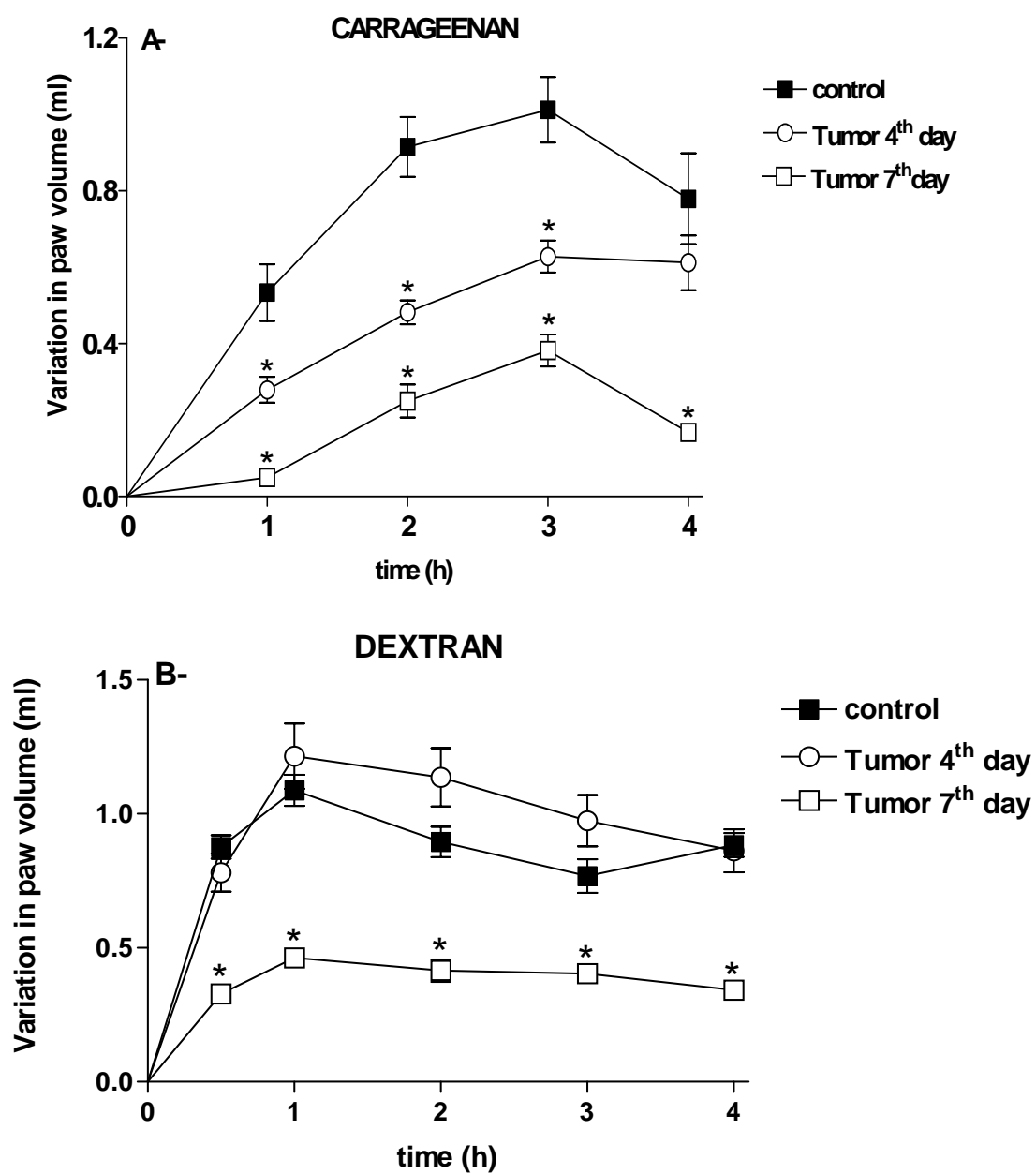


Figure 2

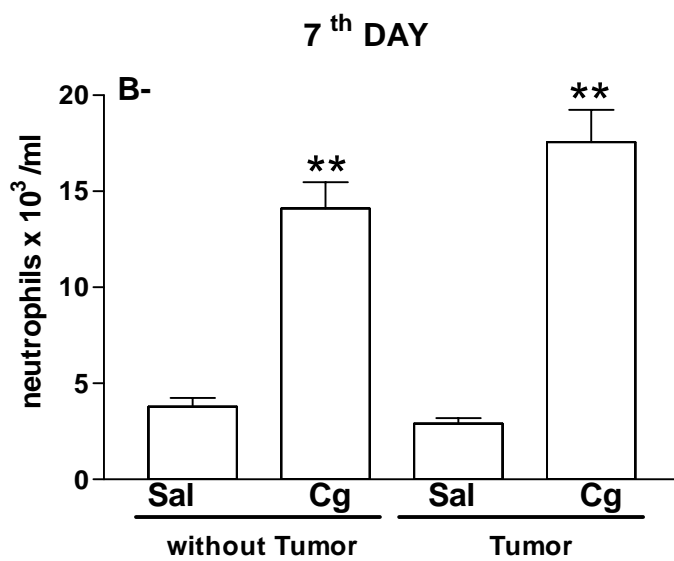
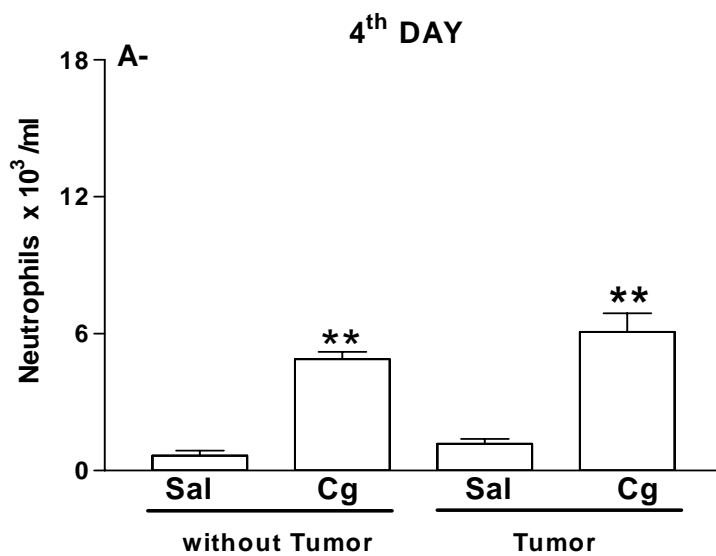


Figure 3

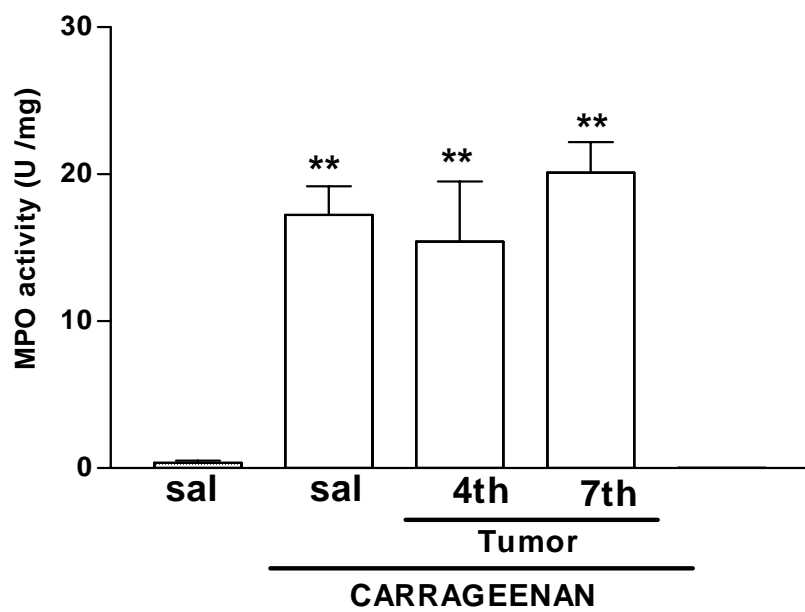


Figure 4

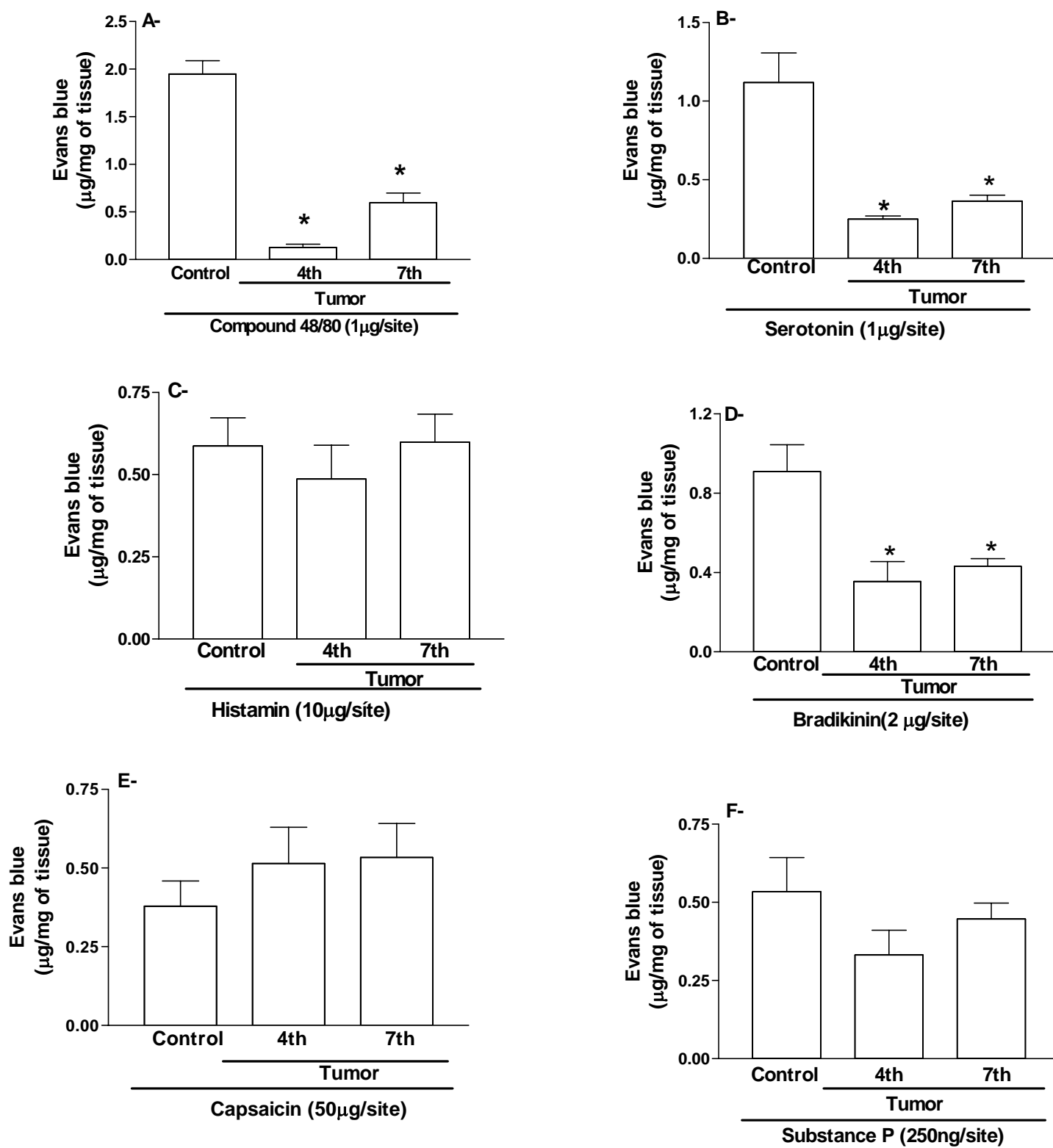


Figure 5

