

**ANA PAULA ADRY DE OLIVEIRA**

**POTENCIAL METASTÁTICO E RECONHECIMENTO DA E-SELECTINA EM  
CULTURAS E EM TECIDOS COLONIZADOS PELO  
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48p  
2005

Oliveira, Ana Paula Adry de, 1974-

Potencial metastático e reconhecimento da E-selectina em culturas e em tecidos colonizados pelo tumor ascítico de Ehrlich / Ana Paula Adry de Oliveira. – Viçosa : UFV, 2005.

xv, 64f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 54-61

1. Tumor ascítico de Ehrlich. 2. Neoplasias das glândulas mamárias. 3. Metástase. 4. Inflamação.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.08945999

*A **Deus**, pela presença em todos os momentos da minha vida,  
Aos meus pais **Robério e Helena**, pelo amor e atenção,  
A minha querida vó **Edith**, pelo exemplo de vida,  
Ao **Fernando**, pelo carinho e dedicação,*

*dedico este trabalho,*

## AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade do curso de Mestrado.

A orientadora, Prof<sup>ta</sup>. Marlene Isabel Vargas Vilorio, pela confiança, pela orientação, pela serenidade e incentivo durante a execução dos trabalhos, principalmente pela amizade, paciência e carinho.

Ao Prof. Marcelo José Vilela, pela atenção, pelo fornecimento do tumor de Ehrlich, pelas críticas construtivas mesmo que distante, pela utilização do Laboratório do Câncer, pela confiança e amizade que estiveram sempre presentes na nossa convivência. Meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, pelo apoio, dedicação, paciência, pelas discussões que contribuíram para a realização deste trabalho e principalmente pela permissão em utilizar o Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários.

Aos meus pais Maria Helena Adry de Oliveira e Robério Barroso de Oliveira pelo incentivo, compreensão, por acreditarem em mim e principalmente pelo exemplo de vida e formação que me deram. O que sou devo a eles.

Aos meus irmãos, Américo e Robério, que sempre torceram por mim, vibrando com os meus sucessos.

A todos da minha família, pelo carinho.

A Débora e Isis, minhas irmãs de coração, obrigada pelo carinho e pela torcida.

À colega e amiga Liza Helena, pelo apoio no trabalho, e principalmente pelas discussões que foram muito válidas.

Ao Prof. Eduardo Paulino, pelas aulas de estatística e pelas críticas construtivas durante as disciplinas de seminários.

Ao médico patologista José do Carmo Lopes Moreira, pela paciência e imensa ajuda na análise histológica das lâminas.

Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta, por colocar à disposição o Laboratório de Histologia (Biologia Geral), pela atenção, e principalmente pelas discussões que me fizeram enxergar o necessário.

Aos professores Cláudio Fonseca e João Carlos Pereira pela disponibilidade.

Ao Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária, onde foi processado todo o material, e principalmente aos funcionários Cláudio e Adão.

A Rosi, pela atenção e principalmente pela amizade.

Aos funcionários Marquinho, Lucinda, Márcio Mendes, Sr. Adão e Juliano pela ajuda.

Ao Luiz pela ajuda com os animais, e principalmente ao Fabrício, pela preciosa ajuda no suporte laboratorial.

A amiga Yasmine pela torcida.

Aos colegas e amigos Larissa, Cristina, Luiz, Breno, Ferdinan, Carlos, Carol, Carla, Flaviana, Irma, Policarpo, Sidimar, Bruno, Marcelo e Renner, simplesmente pela amizade. Afinal, a união faz a força.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,  
mas na intensidade com que acontecem.  
Por isso existem momentos inesquecíveis,  
coisas inexplicáveis  
e pessoas incomparáveis”*

*(Fernando Pessoa)*

## **BIOGRAFIA**

ANA PAULA ADRY DE OLIVEIRA, filha de Robério Barroso de Oliveira e Maria Helena Adry de Oliveira, nasceu em Itabuna, BA, em 25 de novembro de 1974.

Concluiu o curso de graduação em Biomedicina na Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus, BA), em janeiro de 2002.

Atuou na área de análises clínicas e físico-químicas da água por um ano e meio.

Em março de 2003 foi aceita no programa de Pós-Graduação do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, onde deu início aos trabalhos do mestrado na área de Patologia e Biologia Molecular.

## CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Câncer.....	4
3.2. Tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	7
3.3. Metástases.....	9
3.4. Matriz extracelular.....	11
3.5. Moléculas de adesão celular.....	12
3.5.1. Estrutura e distribuição.....	13
3.6. Correlação da molécula de adesão estudada e o câncer.....	14
3.6.1. E-selectina.....	14
3.6.1.1. Ligantes de carboidratos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Animais.....	18

4.2. Obtenção e manutenção do tumor ascítico de Ehrlich.....	18
4.3. Preparo das células tumorais para inoculação.....	19
4.4. Inoculação dos animais.....	20
4.5. Crescimento celular do tumor ascítico de Ehrlich <i>in vitro</i> .....	20
4.6. Avaliação macroscópica e microscópica.....	21
4.7. Anticorpo utilizado.....	21
4.8. Análise imunohistoquímica.....	22
4.8.1. Identificação de E-selectina em amostras de tecidos.....	22
4.8.2. Identificação de E-selectina em cultura de células endoteliais estimuladas com líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich .....	23
4.9. Adesão de células do tumor ascítico de Ehrlich em células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVEC's).....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Crescimento celular do tumor ascítico de Ehrlich <i>in vitro</i> .....	26
5.2. Análise macroscópica e microscópica do TAE.....	29
5.2.1. Inoculação no coxim plantar.....	29
5.2.2. Inoculação intramuscular.....	30
5.2.3. Inoculação intravenosa.....	31
5.3. Análise imunohistoquímica.....	43
5.3.1. Identificação de E-selectina em amostras de tecidos.....	43
5.3.2. Identificação de E-selectina em culturas de células endoteliais estimuladas com líquido ascítico de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.....	44
5.4. Adesão de células do tumor ascítico de Ehrlich em células endoteliais (BUVEC's).....	48
6. CONCLUSÕES.....	52
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXO.....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura dos antígenos sialyl Lewis <sup>a</sup> (A) e sialyl Lewis <sup>x</sup> (B).....	17
Figura 2	Curva de crescimento <i>in vitro</i> do tumor ascítico de Ehrlich.....	27
Figura 3	Células do tumor ascítico de Ehrlich em cultura mostrando intenso pleomorfismo e presença de tipos celulares diferentes (seta). Contraste de fase. 400x.....	27
Figura 4	Coxim plantar inoculado com células do tumor ascítico de Ehrlich, mostrando crescimento exuberante da massa tumoral. A: região plantar, B: região dorsal.....	36
Figura 5	Crescimento do tumor ascítico de Ehrlich no coxim plantar mostrando infiltrado inflamatório (seta) e massa tumoral (MT) invadindo a derme (D). HE. 200x.....	36
Figura 6	Linfonodo poplíteo de animal 30 dias pós-inoculação com células do tumor ascítico de Ehrlich. M: metástase em seio subcapsular. HE. 200x.....	37
Figura 7	Linfonodo poplíteo de animal 30 dias após inoculação com células do tumor ascítico de Ehrlich. M: Metástase; N: área de necrose. HE. 400x.....	37
Figura 8	Massa tumoral intramuscular desenvolvida 30 dias pós-inoculação mostrando ulceração na pele (seta). A: face medial e B: face lateral.....	38
Figura 9	Animal inoculado com células do tumor ascítico de Ehrlich por via intramuscular. Massa tumoral muito desenvolvida (*), vascularização intensa próxima a linfonodos regionais com hiperplasia de linfonodos inguinal (seta preta) e poplíteo (seta amarela).....	38
Figura 10	Tumor ascítico de Ehrlich intramuscular, mostrando alterações histológicas semelhantes ao coxim plantar. MT: massa tumoral, F: feixe muscular. HE. 200x.....	39

Figura 11	Linfonodo inguinal de animal 30 dias pós-inoculação mostrando área de colonização por células do tumor ascítico de Ehrlich (*), TL: tecido linfóide. HE. 200x.....	40
Figura 12	Linfonodo inguinal de animal 30 dias após inoculação. Intenso pleomorfismo e numerosas figuras mitóticas (seta). HE. 400x.....	40
Figura 13	Fígado de animal controle (A) e de animal 30 dias pós-inoculação do tumor ascítico de Ehrlich por via intravenosa (B) mostrando hematopoiese extramedular (seta). HE. A: 400x, B: 200x.....	41
Figura 14	Baço de animal controle (A) e de animal 30 dias pós-inoculação do tumor ascítico de Ehrlich por via intravenosa (B) mostrando hematopoiese extramedular e presença de megacariócitos (seta). HE. A e B: 200x .....	42
Figura 15	Células do tumor ascítico de Ehrlich <i>in vitro</i> . A cor marrom indica imunomarcagem positiva para o anticorpo anti E-selectina. Ipx. 400x.....	43
Figura 16	Esfregaço de líquido ascítico mostrando células do tumor ascítico de Ehrlich. Instant Prov. 1000x.....	47
Figura 17	Número de médio de células do tumor ascítico de Ehrlich aderidas em 100 células endoteliais.....	48
Figura 18	Controle positivo de células BUVEC's estimuladas com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias, mostrando imunomarcagem pelo anticorpo anti E-selectina (A) e controle negativo sem estímulo mostrando ausência de imunomarcagem (B). Ipx. 1000x.....	50
Figura 19	Teste de adesão de células do tumor ascítico de Ehrlich em células endoteliais (BUVEC's) estimuladas com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias. As setas indicam a adesão. Instant Prov. 1000x.....	51
Figura 20	Teste de adesão de células do tumor ascítico de Ehrlich em células endoteliais (BUVEC's) sem estímulo, mostrando ausência de adesão. Instant Prov. 1000x.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Esquema de inoculação.....	20
Tabela 2	Tratamentos utilizados para estímulo de células endoteliais.....	25
Tabela 3	Imunomarcção da molécula de adesão E-selectina em células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVEC's), estimulada com líquido ascítico.....	44

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

µg: micrograma

µl: microlitro

Ca<sup>2+</sup>: cálcio

CD: cluster of differentiation

cm: centímetro

CTLs: linfócitos T citotóxicos

DAB: diaminobenzidina

dL: decilitro

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

g: grama

GAGs: glicosaminoglicanos

IM: intramuscular

IV: intravenoso

ICAM: molécula de adesão intracelular

IFN-γ: interferon gama

IL: interleucina

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Ipx: imunoperoxidase

LFA: antígeno associado à função leucocitária

M: molar

mg: miligrama

MHC: complexo maior de histocompatibilidade

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

ng: nanograma

NK: natural killer

PBS: phosphate buffer saline

PECAM: molécula de adesão plaqueta-célula endotelial

rpm: rotação por minuto

SC: subcutâneo

SFB: soro fetal bovino

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

U: unidade

VCAM: molécula vascular de adesão celular

## RESUMO

OLIVEIRA, ANA PAULA ADRY DE. M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Potencial metastático e reconhecimento da E-selectina em culturas e em tecidos colonizados pelo tumor ascítico de Ehrlich.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Conselheiros: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, João Carlos Pereira da Silva.

O presente trabalho objetivou avaliar o envolvimento da molécula de adesão E-selectina no processo de metastatização do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), com o intuito de esclarecer alguns aspectos relacionados ao potencial invasivo, inflamação e adesão celular. Para tanto, camundongos BALB/c foram inoculados com  $2 \times 10^6$  células do tumor ascítico de Ehrlich pelas vias intramuscular, intravenosa, e também subcutânea no coxim plantar. Decorridos 15 e 30 dias da inoculação, os camundongos foram eutanasiados para análise histológica, e de imunohistoquímica pelo método da imunoperoxidase indireta para detecção da molécula E-selectina em tecidos com metástases. Os grupos controle foram constituídos de animais não portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Os resultados obtidos demonstraram que a E-selectina não é a principal molécula envolvida na migração das células do tumor nos períodos estudados (15 e 30 dias). Entretanto, mostrou através de testes *in vitro*, que há uma adesão intensa de células deste tumor a células endoteliais ativadas com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias. Líquido ascítico de animais inoculados intraperitonealmente com  $2,5 \times 10^6$  células do tumor foi coletado em diferentes períodos da evolução tumoral (5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 12<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias). Porém, ele não foi capaz de ativar células endoteliais, mostrando que este tumor não desencadeia uma reação inflamatória intensa, isso leva a crer que este pode ser um mecanismo de defesa do hospedeiro contra a disseminação tumoral.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, ANA PAULA ADRY DE. M.S., Universidade Federal de Viçosa, february 2005.

**Metastatic potencial and recognition of E-selectin in cultures and in tissues colonized by the Ehrlich ascitic tumor.** Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Committe members: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, João Carlos Pereira da Silva.

The objective of this study was to evaluate the involvement of the adhesion molecule E-selectin in the process of metastasis of the Ehrlich ascitic tumor (EAT) and to clarify some aspects related to the invasive potential, inflammation and cellular adhesion. BALB/c mice were inoculated with  $2 \times 10^6$  of the Ehrlich ascitic tumor cells by intramuscular or endovenous route, and also subcutaneous in the footpad. 15 and 30 days after inoculation the mice, they were euthanased for histological analysis. Indirect immunoperoxidase for detection of E-selectin in tissues with metastasis was used. The control groups were constituted by animals free from the Ehrlich ascitic tumor. The results demonstrated that the E-selectin is not main molecule involved in the migration of the cells in the different periods studied (15 and 30 day). However, *in vitro* test, there is an intense adhesion of cells of this tumor in the activated endothelial cells by plasm containing pro-inflammatory cytokine. Ascitic liquid of the animals inoculated intraperitoneally with  $2,5 \times 10^6$  cells of the tumor was collected in different stages of the tumoral development day 5, 7, 8, 10, 11, 12 and 14. However it was not capable to activate endothelial cells, showing that this tumor is not unleash in inflammatory reaction and maybe, this aspect can be a mechanism of defense of the host against the tumoral dissemination.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer está entre as doenças que mais causam mortes no mundo. Segundo dados do INCA<sup>1</sup> (2004), as neoplasias constituem a segunda maior causa de morte no Brasil, precedida somente por doenças cardiovasculares. Estima-se para 2005, aproximadamente 467 mil novos casos por câncer, sendo o câncer de pele não-melanoma o mais incidente seguido pelo câncer de mama feminino e pelo câncer de próstata. A elevada incidência da doença é o principal motivo pelo qual a oncologia é um dos ramos mais estudados do mundo.

Todos os tecidos no organismo podem gerar malignidade, sendo que alguns tecidos podem produzir vários tipos de neoplasias. Apesar disso, cada tipo de câncer tem características únicas, mas os processos básicos que dão origem aos tumores parecem ser bastante semelhantes (WEINBERG, 1996). Neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede aquele dos tecidos normais, e persiste da mesma maneira excessiva após o término do estímulo que induziu a alteração, privando o hospedeiro do seu suprimento de energia e substrato nutricional (COTRAN et al., 2000). As características de cada câncer refletem a sua origem e mesmo que um câncer se torne metastático, sua origem pode geralmente ser determinada como sendo de um tumor primário originado em um determinado órgão e, conseqüentemente, derivado por divisão de uma única célula que sofreu mutação, crescendo excessivamente mais que as células normais (ALBERTS et al., 1997).

Dentro do processo de progressão tumoral, as células neoplásicas passam a adquirir características como: crescimento celular mesmo na ausência ou presença de sinais que estimulem esse fenômeno; imortalidade efetiva; habilidade para estimular a formação de vasos sanguíneos (GIBBS, 2003); desenvolvimento de mecanismos de evasão ou resistência às respostas do sistema imunológico do hospedeiro (ABBAS et al., 2003); alteração e desregulação das moléculas de adesão celular, favorecendo a invasão e metástase (MACKAY

---

<sup>1</sup> BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2005: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA. 2004. 94 p.

& IMHOF, 1993; ALBERTS et al., 1997; THIERY, 2003). Muitos fatores interferem nos fenômenos de invasão e metástase, dentre eles o grau de malignidade do tumor, e a presença exacerbada ou mesmo a ausência de algumas moléculas de adesão.

As moléculas de adesão pertencem a um grupo de glicoproteínas associadas à membrana das células que promove a adesão célula-célula sem necessariamente exigir associação com especialização morfológica (HARNDEN & MCGEE, 1992) e podem estar relacionadas com as metástases causadas pelo câncer. Alterações na constituição das moléculas de adesão podem representar um risco maior para o potencial invasivo das células tumorais (KOHN, 1991; HENRICKS & NIJKAMP, 1998; THIERY, 2003).

O surgimento da oncologia experimental constitui um grande avanço na cancerologia, cuja existência se deu pelo desenvolvimento dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis, que são tumores de animais mantidos em laboratórios pelo transplante de células tumorais a hospedeiros susceptíveis (DAGLI, 1989) o que facilitou o estudo da evolução tumoral por muitos pesquisadores. O tumor de Ehrlich é um dos primeiros tumores transplantáveis descritos na literatura.

O presente trabalho utilizou como modelo experimental um adenocarcinoma de mama de camundongo, conhecido como tumor ascítico de Ehrlich que é um tumor transplantável muito utilizado em estudos experimentais. Descrito em 1906 ele foi inicialmente desenvolvido na forma sólida no músculo e no tecido subcutâneo de camundongos, e posteriormente convertido para a forma ascítica através da passagem seriada de fluido ascítico de animais inoculados intraperitonealmente com células tumorais.

Poucos trabalhos relatam o envolvimento das moléculas de adesão no processo de disseminação hematogênea do tumor de Ehrlich. Com o intuito de contribuir com as pesquisas que estudam a relação entre moléculas de adesão e migração tumoral, este projeto teve como finalidade demonstrar a expressão da molécula de adesão E-selectina em tecidos com metástases e em culturas, na tentativa de esclarecer alguns aspectos associados à predileção do crescimento tumoral (metástases) em alguns órgãos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão da molécula de adesão E-selectina em tecidos de camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich e em culturas celulares.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar macroscopicamente a presença de nódulos em animais inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich;
- Verificar histologicamente o aparecimento de metástases nos animais inoculados com tumor ascítico de Ehrlich pelas vias intramuscular e subcutânea (coxim plantar), e a presença de colonizações pela via hematogênica;
- Avaliar a adesão de células do tumor ascítico de Ehrlich em células endoteliais de veia umbilical bovina após estímulo com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias;
- Detectar a presença da molécula de adesão E-selectina em células endoteliais de veia umbilical bovina, estimulada com líquido ascítico coletado em diferentes períodos de desenvolvimento do tumor.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. CÂNCER

O câncer pode ser genericamente definido como *tumor* ou *neoplasma*. *Neoplasma* (do grego *neos*: novo, e *plasma*: algo formado) significa “novo crescimento” (HARNDEN & MCGEE, 1992). As neoplasias são consideradas proliferações locais de clones celulares atípicos, cuja reprodução foge ao controle normal, e tendem para um tipo de crescimento autônomo e progressivo para a perda da diferenciação, para a destruição do tecido normal circunjacente e para a disseminação (metástases) em todo o organismo (BOGLIOLO et al., 1987). As neoplasias são classificadas de acordo com a origem embrionária dos tecidos dos quais são derivados: os *carcinomas* são originários de células epiteliais, derivadas de qualquer uma das três camadas germinativas (ectodérmica, mesodérmica e endodérmica). Logo, os carcinomas com padrão microscópico de crescimento glandular são definidos como *adenocarcinomas*. Os sarcomas são derivados de tecido mesenquimatoso como osso, cartilagem e gordura. Os *linfomas* são neoplasias originárias de tecido linfóide, enquanto que as *leucemias* são de células hematopoéticas de origem medular que se mantêm em suspensão (BOGLIOLO et al., 1987; COTRAN et al., 2000).

Vários fatores favorecem o aparecimento do câncer: influências ambientais, como agentes físicos (raio ultravioleta, radiação ionizante), químicos (aflatoxinas) e biológicos (vírus); e também as influências culturais (alimentação, estresse, tabagismo), raciais (possivelmente genéticos), e principalmente fatores como a idade e a hereditariedade que podem culminar em sucessivas mutações contribuindo para o aparecimento de diversas neoplasias (COTRAN et al., 2000).

A principal causa relacionada ao desenvolvimento neoplásico é o funcionamento inadequado de genes reguladores da proliferação das células transformadas. Em condições normais, o crescimento celular é controlado por duas classes de genes os proto-oncogenes e os genes supressores. Entretanto, estes mesmos genes que são responsáveis pelo controle da proliferação ou diferenciação após mutação, podem resultar na formação em excesso de proteínas ou hiperatividade das mesmas (ganho de função) caracterizando, dessa forma, a transformação do fenótipo celular. As mutações ocorrem em proto-oncogenes, que são normalmente expressos durante o desenvolvimento embrionário e também em células maduras, e em genes supressores tumorais, geralmente por perda de função e inativação de alelo (ALBERTS et al., 1997; BROOKS et al., 2000; JORD et al., 2000), favorecendo a ativação dos oncogenes, que são os responsáveis diretos pelo desenvolvimento da doença. Este mecanismo desempenha papel-chave na progressão da maioria dos cânceres humanos (COTRAN et al., 2000).

O câncer, caracterizado por ser uma doença de acúmulo clonal de células tumorais (ANDREEFF et al., 2000), possui a habilidade de apresentar extensa proliferação devido à superexpressão de fatores de crescimento e esta proliferação começa quando receptores da membrana celular reconhecem seus próprios fatores de crescimento (ADAM et al., 2003). A taxa de proliferação celular de algumas populações celulares depende de três parâmetros: (a) taxa de divisão celular; (b) fração de células dentro de uma população que sofre divisão (fração de crescimento); e (c) taxa de perda de células de uma população devido à diferenciação terminal ou morte celular (ANDREEFF et al., 2000). Quanto mais avançado ou complexo é o estado de diferenciação, menor é a taxa de reprodução. As células neoplásicas perdem progressivamente as características de diferenciação e se tornam atípicas, além de mostrarem alterações intrínsecas nos mecanismos regulatórios de multiplicação, adquirirem autonomia de crescimento e se tornarem independentes dos controles externos. Pode-se, então, dizer que nas neoplasias o metabolismo celular é desviado da diferenciação para a proliferação (BRASILEIRO FILHO et al., 1998).

A maioria, se não todas as células neoplásicas, mostram anomalias na diferenciação que são caracterizadas por alterações morfológicas e funcionais. A anaplasia de tumores pode prover uma compreensão dentro da sua etiologia, grau de malignidade, prognóstico e sensibilidade a intervenções terapêuticas por agentes que induzem a diferenciação ou maturação. Normalmente, a diferenciação começa logo após as primeiras divisões celulares que sucedem a fertilização. Ao longo do desenvolvimento, e em organismos adultos, a habilidade de uma célula proliferar está intimamente ligada ao seu estado de diferenciação.

Tecidos adultos geralmente expressam uma variedade de fatores que agem para manter a proliferação e o estado de diferenciação. Estes fatores podem ser moléculas secretadas, receptores transmembrana, moléculas de sinalização intracelular e fatores de transcrição que atuam em genes específicos e que podem ser inibidores potentes de proliferação (ANDREEFF et al., 2000).

Alguns fatores contribuem para a progressão e desenvolvimento do câncer, dentre eles a apoptose, que é conhecida como morte celular programada. Ela é regulada por oncogenes, pelo gene supressor tumoral e por uma família de genes conhecida como bcl-2, que fazem da apoptose um mecanismo necessário complementar à proliferação, e que garante a homeostase de todos os tecidos. A apoptose representa o fim da cascata de eventos moleculares, iniciados por diversos estímulos que resultam na ativação de enzimas proteolíticas que culminam na morte celular. Este processo precisa estar altamente regulado, já que defeitos na maquinaria apoptótica aumentam a sobrevivência da célula e podem contribuir para a expansão de células anormais, criando um ambiente permissivo para a instabilidade genética, pelo acúmulo de mutações, e para a resistência à quimioterapia, radiação e destruição imuno-mediada (ANDREEFF et al., 2000; COTRAN et al., 2000; DUKE et al., 1996). Outro fator, senão o mais importante, é a angiogênese, que Kohn (1991) destaca como um importante processo para a sobrevivência e progressão da neoplasia. A vascularização é requerida para que o tumor primário se mantenha vivo e, principalmente, para a disseminação de metástases. A angiogênese é necessária no início e no fim da cascata metastática. O processo de formação do vaso sanguíneo é funcionalmente similar à invasão por células tumorais e pode ser considerado como uma forma de invasão regulada, com eventos independentes de adesão, proteólise e migração, que caracterizam a propagação de células neoplásicas. Esses eventos também são exibidos por células endoteliais ativadas (FOLKMAN, 1976; LIOTTA & KOHW, 2000).

As moléculas de adesão celular que são a chave de um evento fisiológico fundamental acoplado a quatro outros processos celulares importantes: proliferação, migração, diferenciação e morte. Qualquer mudança nas moléculas de adesão celular pode levar a conseqüências importantes para o comportamento da célula, e pode resultar até mesmo na indução de morte celular ou contribuir para as metástases do câncer (THIERY, 2003).

As células neoplásicas podem estimular a resposta imune. Esse sistema é capaz de detectar uma variedade de antígenos produzidos por vários cânceres, até mesmo aqueles induzidos por carcinógenos químicos. Uma das evidências para esse fato está na observação histológica, onde são encontrados infiltrados mononucleares de células T, células NK e

macrófagos circundando muitos tumores. A conexão entre inflamação e câncer existe desde 1863, quando Rudolf Virchow observou leucócitos em tecidos neoplásicos. Por sua vez os macrófagos associados a tumores são os principais componentes presentes no infiltrado inflamatório. Muitos tumores produzem fatores estimuladores de colônias, e estes, por sua vez, prolongam a sobrevivência dos macrófagos associados a tumores (BALKWILL & MONTOVANI, 2001). Outra evidência da estimulação do sistema imune é o frequente achado de proliferação linfocitária (hiperplasia) nos linfonodos que drenam os locais de crescimento tumoral. No geral, os tumores malignos podem desenvolver mecanismos de evasão ou resistência às respostas do sistema imune do hospedeiro (ABBAS et al., 2003). Há evidências que a resposta imune em camundongos portadores de células do TAE é do tipo humoral, sendo discreta nas etapas mais tardias do desenvolvimento do tumor (RIZZO, 2000). Entretanto, a capacidade dos anticorpos eliminarem células tumorais tem sido demonstrada na maioria das vezes *in vitro*, visto que existem poucas evidências quanto a uma imunidade humoral específica contra tumores (ABBAS et al., 2003).

O estudo imunohistoquímico da expressão de constituintes protéicos em tecidos normais ou neoplásicos é caracterizado pela utilização de anticorpos que reagem com as estruturas desejadas. Cassali (2000) ressalta a importância do estudo da expressão de marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama em mulheres através de imunohistoquímica, com o intuito de auxiliar no diagnóstico e na pesquisa, definindo muitas vezes a conduta terapêutica. A imunohistoquímica é comumente utilizada para auxiliar no diagnóstico em neoplasias malignas indiferenciadas e para detectar o sítio primário em neoplasias metastáticas (CASSALI, 2000; AMSTALDEN, 2003).

### **3.2. O TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE)**

O tumor de Ehrlich foi desenvolvido por Paul Ehrlich<sup>2</sup> em 1896 e descrito em 1906 como um adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária originário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932 o tumor foi convertido para a

---

<sup>2</sup> EHRLICH, P. Experimentelle karzinomstudium na maüsen. **Arb. Inst. Exp. Ther.**, v.1, p.77-92, 1906.

forma ascítica (DAGLI, 1989). O tumor na forma ascítica é intensamente utilizado em sistemas experimentais, uma vez que facilita a definição da quantidade de células que serão transplantadas, o que permite certo grau de controle. O tumor desenvolve-se na forma sólida desde que seja inoculado por via subcutânea ou intramuscular em camundongos (MATSUZAKI et al., 2003) e cresce na forma ascítica quando inoculado por via intraperitoneal (DAGLI, 1989; RIZZO, 2000; BERGAMI-SANTOS et al., 2004; MATSUZAKI et al., 2004). O termo ascite (do grego *askites*, que significa bexiga, barriga ou bolsa) é definido como sendo o acúmulo de líquido na cavidade peritoneal (HAUSBERGER et al., 2001).

O tumor ascítico geralmente cresce em 100% dos animais inoculados, não regredindo espontaneamente. Após inoculação de fluido ascítico fresco contendo cerca de um milhão de células neoplásicas, os camundongos acumulam cerca de 5 a 20 mL de líquido ascítico viscoso e às vezes hemorrágico em 7 a 14 dias, morrendo em 10 a 20 dias (DAGLI, 1989). Segundo Sugiura<sup>3</sup> (1965, apud GENTILE, 2001), não há ocorrência de metástases no coração, rins, adrenais, fígado ou baço. Além disso, é sabido que as células do tumor de Ehrlich podem ser inoculadas intravenosamente sendo de grande utilidade nos estudos sobre migração de células e desenvolvimento de metástases, visto que na forma sólida não há ocorrência de crescimento secundário (RIZZO, 2000). Dentre outros modelos, o tumor ascítico de Ehrlich é utilizado para auxiliar na investigação de novas modalidades terapêuticas em biologia tumoral (SAAD-HOSSNE, 2002), e principalmente na fisiopatologia do câncer e das metástases.

O tumor ascítico de Ehrlich pode ser transplantado para qualquer linhagem de camundongo, provavelmente devido à perda da expressão do MHC. Esta característica exclui o principal papel do linfócito T citotóxico durante o desenvolvimento do tumor, indicando que talvez a imunidade celular não seja o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o tumor ascítico de Ehrlich (BERGAMI-SANTOS et al., 2004).

Este modelo é utilizado para o estudo de metástases pulmonares tendo como via a disseminação hematogênica (RIZZO, 2000). Entretanto, Cotran et al. (2000) ressaltam a probabilidade de haver uma interconexão entre o sistema vascular e o linfático, podendo ocasionar um aumento em linfonodos tanto por disseminação e crescimento de células neoplásicas quanto por hiperplasia reativa.

Em avaliação histopatológica, o tumor de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose, oriundas da morte de células neoplásicas, bastante intensas já na primeira semana

---

<sup>3</sup> SUGIURA, K. Tumor transplantation. In: GAY, W.L. **Methods of Animal Experimentation**. Acad. Press NY and London. 1965, v. 2, cap. 3, p. 171-222.

pós-inoculação. O tumor apresenta células com intensa atipia, possui poucas células inflamatórias, estroma escasso, e alto índice mitótico (DAGLI, 1989).

Estima-se que 10% de todos os casos de ascite em humanos, são de origem neoplásica, sendo a maioria destas provenientes de tumores gastrointestinais e ovarianos (SAAD-HOSSNE et al., 2004). Várias doenças estão associadas à ascite, dentre elas a carcinomatose peritoneal que é responsável por causar uma exsudação de fluido proteináceo das células tumorais, fazendo com que o líquido extracelular entre na cavidade peritoneal para restabelecer o balanço osmótico. Em metástases maciças no fígado e no carcinoma hepatocelular ocorre hipertensão portal secundária, desencadeando um mecanismo semelhante ao da cirrose que ocasiona aumento dos níveis de óxido nítrico, causando uma vasodilatação que simula um decréscimo no volume arterial efetivo e possivelmente leva ao aumento do hormônio retentor de sódio, diminuindo a filtração renal. A ascite quilosa secundária ao linfoma maligno aparece como consequência da obstrução dos linfonodos pelo tumor e pela ruptura dos vasos linfáticos (HAUSBERGER et al., 2001);

### **3.3. METÁSTASES**

As metástases são os aspectos mais insidiosos e ameaçadores do câncer, sendo a principal causa de morbidade, mortalidade e de falhas em tratamento de pacientes com neoplasia, uma vez que a cada dez mortes pela doença nove são resultado de metástases (GIBBS, 2003). A expressão “metástase” foi criada por Joseph Claude Recamier, um médico francês que foi o primeiro a prover evidência anatômica de que as metástases eram causadas por células malignas que entram na circulação e migram para locais distantes no organismo (LIOTTA, 1992; VAN KEMPEN & COUSSENS, 2002). Cerca de 30% dos pacientes com diagnóstico de tumores malignos sólidos (com exceção do câncer de pele não-melanoma) desenvolve metástases, fato que reduz acentuadamente a possibilidade de cura (COTRAN et al., 2000).

A metástase constitui um processo multietapas, caracterizado por interações entre as células neoplásicas, as células do hospedeiro e a matriz extracelular. Enzimas proteolíticas possuem papel fundamental na degradação da matriz extracelular, sendo necessárias para que o tumor ultrapasse a barreira tecidual, tais como membrana basal e a própria matriz

extracelular (WANG et al., 1996). Outro fator importante para a circulação de células neoplásicas dentro do organismo é a atividade do citoesqueleto, particularmente a formação, desintegração, contração e relaxamento de géis de actina e feixes de filamentos de actina, associados a ela existem diferentes proteínas que na maioria das vezes é regulada diretamente por concentrações de  $Ca^{2+}$  ou indiretamente via calmodulina (ROOS, 1984).

Para produzir lesões clinicamente relevantes, células metastáticas precisam completar todos os passos de progressão tumoral, até atingir o crescimento para a formação da massa tumoral em sítios distantes do tumor primário. Esta, por sua vez, tem que alcançar 1 mm de diâmetro para que estimule a angiogênese pela secreção de fatores pró-angiogênicos e pela inibição de fatores anti-angiogênicos (FIDLER, 2002).

Alterações genéticas influenciam a adesividade celular, favorecendo o desprendimento das células do tumor primário, além da neovascularização que não só serve para manter as necessidades metabólicas inerentes ao desenvolvimento do tumor, como também para prover uma rota de “fuga” pela qual as células neoplásicas podem deixar o tumor primário (TANAKA et al., 2002) e adentrar o sistema linfático ou circulatório, caracterizando a disseminação linfática e hematogênica, respectivamente (CNAMBERS et al., 2002). As células neoplásicas que sobrevivem, multiplicam-se e extravasam para o parênquima dos órgãos formando novos focos tumorais (RIZZO, 2000), constituem o fenômeno conhecido como metástase. Segundo Donenko et al. (1992), o crescimento metastático depende do aspecto das células tumorais, e este mecanismo é controlado em parte pelo organismo do hospedeiro.

O aumento da atividade angiogênica das células tumorais e a proteção destas células contra apoptose ocorre devido à expressão de oncogenes (*ras*, *K-ras*, *H-ras*, *bcl-2*) e devido a mutações no gene supressor tumoral p53 (FOLKMAN, 2003).

A invasão e a metástase matam o hospedeiro por dois processos: invasão local e danos em órgãos distantes. Geralmente, a invasão local pode comprometer a função dos tecidos envolvidos, seja por compressão, destruição local ou impedimento da função do órgão. O ponto decisivo mais significativo na doença é o estabelecimento da metástase. Neste estágio, o paciente não pode mais ser curado por terapia local, sucumbindo a injúrias causadas pela disseminação do tumor (BOGLIOLO et al., 1987).

Tumores histologicamente comparáveis podem ter potencial metastático extremamente divergente, dependendo do genótipo e influências ambientais locais. O potencial metastático é influenciado pelo micro-ambiente local, angiogênese, interações

tumor-estroma, elaboração de citocinas pelo tecido local, e mais significativamente por seu genótipo molecular (LIOTTA & KOHW, 2000).

Modelos animais para o estudo das metástases têm auxiliado na fabricação de drogas e na identificação de genes que promovem ou suprimem as metástases, novos alvos para o desenvolvimento de novas terapias. A análise destes modelos tem sido necessárias para o entendimento da complexidade de processos importantes da doença (ROSOL et al., 2003).

### **3.4. MATRIZ EXTRACELULAR**

A matriz extracelular (MEC) é formada por um complexo de macromoléculas relativamente estáveis que são secretadas por fibroblastos. Ela está presente em todos os tecidos e é mais abundante nos tecidos conjuntivos. É formada por componentes fibrilares estruturais (colágeno e elastina) e adesivos (fibronectina e laminina) e por componentes não-fibrilares constituídos por cadeia de polissacarídeos conhecidos como GAGs, geralmente encontrados em ligação covalente com proteínas na forma de proteoglicanos. A MEC exerce importante papel na junção celular como também no desenvolvimento, polaridade e comportamento das células, além de estabelecer a modulação da estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos (ALBERTS et al., 1997; SANTOS & CARVALHO, 2001).

A MEC é considerada desde muito tempo como um “cimento” que confere propriedade mecânica e características estruturais aos tecidos. Diferenças na expressão de proteínas da MEC são responsáveis por proporcionar um ambiente específico que modula o fenótipo celular durante o desenvolvimento, por remodelar tecidos (cicatrização) e estar envolvida em situações patológicas como invasão tumoral (SID et al., 2004).

A interação das células neoplásicas com a MEC parece ser um dos mais importantes mecanismos do processo de metástase. Os componentes desta matriz são responsáveis por inúmeras atividades que vão desde o preenchimento do espaço intersticial até a adesão celular. Tem sido demonstrado que células tumorais que exibem receptores de superfície para laminina e fibronectina têm alto potencial metastático se comparado com aquelas que possuem níveis mínimos destes receptores. As células tumorais produzem enzimas proteolíticas (uroquinase, catepsina B e D, ativador de plasminogênio e várias metaloproteases) que são indispensáveis no processo de desenvolvimento das metástases por

degradarem a matriz extracelular. Outro passo importante no processo de metastatização é o envolvimento das células neoplásicas com os componentes da matriz (laminina e fibronectina), que favorecem a migração das células até os vasos sanguíneos (AMSTALDEN, 2003).

### 3.5. MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR

Segundo Albelda & Buck<sup>4</sup> (1990, apud AMARAL, 1999), as moléculas de adesão celular (*cell adhesion molecules* – CAM's) ou receptores de adesão são, em geral, glicoproteínas sintetizadas pelo retículo endoplasmático rugoso (RER) e possuem grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos. Estes aminoácidos constituem o sinal reconhecido pelas organelas celulares, para que possa ocorrer distribuição e localização apropriada das moléculas na membrana celular.

As moléculas de adesão celular participam da interação células-célula e célula-matriz e também da migração destas em condições fisiológicas e patológicas, como em doenças inflamatórias, autoimunes e neoplásicas, principalmente por estarem diretamente ligadas aos processos de invasão e metástase (ALBERTS et al., 1997; MACKAY & IMHOF, 1993).

Existem algumas evidências de que adesão é afetada durante a transformação das células malignas, e que a desregulação de vários mecanismos de adesão está claramente associada com a progressão de tipos diferentes de cânceres com fenótipo maligno (THIERY, 2003).

As moléculas de adesão podem ser divididas em diferentes famílias baseadas em suas propriedades químicas e estruturais. Elas incluem a superfamília das imunoglobulinas, integrinas, caderinas e selectinas (BRAYTON et al., 1998).

---

<sup>4</sup> ALBELDA, S.M.; BUCK, C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. **Faseb Journal**, v. 4, n. 11, p. 2868-2880, 1990.

### 3.5.1. ESTRUTURA E DISTRIBUIÇÃO

De acordo com Alberts et al. (1997), a superfamília das imunoglobulinas (Igs) são moléculas protéicas responsáveis pela adesão célula-célula independente de  $Ca^{2+}$ , possui um ou mais domínios *Ig-semelhantes*, característicos dos anticorpos. Algumas dessas moléculas são expressas em células endoteliais ativadas que se ligam às integrinas na superfície dos leucócitos contribuindo, para o fenômeno de transmigração para os sítios de inflamação. A superfamília das imunoglobulinas inclui moléculas que participam da imunidade celular, transdução de sinais, regulação da expressão de genes, migração de células durante o desenvolvimento e interações de leucócitos; algumas dessas moléculas são restritas a leucócitos e outras são expressas por células endoteliais, células neurais e células neoplásicas. Dentre essas moléculas estão algumas como ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1 (BRAYTON et al., 1998; HENRICKS & NIJKAMP, 1998; CAVALLARO et al., 2004). Alguns estudos indicam que as moléculas ICAM, VCAM e PECAM estão envolvidas na adesão de células malignas ao endotélio e parecem ter papel importante na formação de metástases (BRASILEIRO FILHO et al., 1998).

As integrinas são glicoproteínas transmembrana compostas por dois heterodímeros associados não-covalentemente conhecidos como subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . São expressas pelos leucócitos e seus domínios intracitoplasmáticos ligam-se ao citoesqueleto. As principais moléculas de adesão das células T são a integrina  $\beta_1$  conhecida como antígeno VLA, e a integrina  $\beta_2$  conhecida como LFA-1, que é expressa em mais de 90% dos timócitos e das células T maduras, dos granulócitos e monócitos. A VLA possui como ligante específico a VCAM-1 ou CD106, expressa nas células endoteliais ativadas por citocinas; ligam-se também à fibronectina e a laminina que são proteínas presentes na matriz extracelular. A LFA-1 possui como ligante específico a ICAM-1 ou CD54, expressa em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas, incluindo células T e B, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (HENRICKS & NIJKAMP, 1998; ABBAS et al., 2003). Segundo Keely et al. (1998), a maior complexidade da biologia das integrinas é que elas possuem níveis de afinidades diferentes com os seus ligantes. Logo, se uma célula tumoral fosse modificar a afinidade de suas integrinas, poderia haver um maior impacto nas interações entre células e matriz extracelular, na motilidade, invasividade, metástase e possivelmente controle de crescimento. Thiery (2003) relata que dependendo do modelo celular ou do tipo de tumor, certas integrinas tem

demonstrado uma alta ou baixa regulação. A integrina  $\alpha 1\beta 1$  é expressa especificamente na camada de células basais em epitélio de mama normal, mas é ausente em carcinoma de mama.

Caderinas são moléculas de adesão dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . A maioria das caderinas são glicoproteínas transmembrana e possuem importância fundamental na regulação da morfogênese e organização dos tecidos, interagindo diretamente com o citoesqueleto das células. As caderinas foram primeiramente encontradas em tecidos epiteliais, sendo denominadas de E-caderinas. Logo, outras moléculas foram descobertas e associadas aos tecidos em que foram encontradas, como a N-caderina em células do sistema nervoso, musculares e conjuntivas, e a P-caderina nas células da placenta e epiderme. A baixa regulação da E-caderina está diretamente associada aos carcinomas, já que 90% são originárias de células epiteliais (THIERY, 2003).

As selectinas são proteínas de adesão que promovem interação do tipo célula-célula, responsáveis por mediar as interações entre leucócitos e células endoteliais ou plaquetas (CROSS & BURY, 2003).

### **3.6. CORRELAÇÃO DA MOLÉCULA DE ADESÃO ESTUDADA E O CÂNCER**

#### **3.6.1. E-SELECTINA**

A família das selectinas é composta por três membros: E-, P- e L-selectina. A E-selectina é induzivelmente expressa em células endoteliais, a P-selectina está presente em plaquetas, e a L-selectina é expressa constitutivamente sobre leucócitos (KANNAGI et al., 2004). As selectinas são proteínas ligadas a carboidratos cuja função regula a migração dos leucócitos para os tecidos (ABBAS et al., 2003). Os três tipos de selectinas estão envolvidos em metástases do câncer (KANNAGI et al., 2004).

A E-selectina é também conhecida por molécula de adesão leucocitária endotelial 1 (ELAM-1) e responsável pela regulação dos primeiros processos na cascata de adesão, ligação e rolamento de leucócitos ao endotélio. A forma solúvel dessa molécula é detectada em pacientes com certos tipos de câncer como por exemplo o câncer de mama (VAN KEMPEN & COUSSENS, 2001).

A adesão de células neoplásicas circulantes ao endotélio vascular constitui um importante suporte para a formação de metástase dos tumores malignos (ALEXIOU et al., 2003). Então, Matsuura et al. (1997) detectaram em pacientes com câncer de mama um aumento de E-selectina que era expressa na superfície de células endoteliais; estimulada por liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e seguido de um aumento na concentração dos ligantes de carboidrato que são antígenos conhecidos como sialyl Lewis<sup>x</sup>. Esses antígenos são expressos na superfície e no citoplasma de células neoplásicas. O aumento da síntese de sialyl Lewis<sup>x</sup> está associado a carcinogênese do câncer de mama e outros tipos de câncer. E-selectina e sialyl Lewis<sup>x</sup> são encontrados em níveis aumentados no soro de pacientes com câncer avançado ou recorrente, e principalmente com metástases distantes.

### **3.6.1.1. LIGANTES DE CARBOIDRATOS**

Os carboidratos estão presentes nas membranas e correspondem às porções glicídicas de suas glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídios. Dentre os carboidratos são encontrados glicose, galactose, manose, frutose, N-acetilgalactosamina e ácido N-acetilneuramínico ou ácido siálico. Os carboidratos possuem grande importância para a fisiologia das membranas por ocuparem espaços relevantes em sua superfície. Esse revestimento celular é conhecido como glicocálix, cuja principal função é o reconhecimento de moléculas o que permite a comunicação intracelular (SANTOS & CARVALHO, 2001). A superfície das células do tumor ascítico de Ehrlich apresentam carboidratos que são reconhecidos pelo anticorpo monoclonal da classe IgM conhecido como A10. Este, por sua vez, reage com vários adenocarcinomas mas não com tecidos normais (MEDINA et al., 1999). Epítomos de carboidratos são expressos em mamíferos e estão presentes tanto em glicoproteínas quanto em glicolipídios. Entretanto, sabe-se que os carboidratos das membranas das células passam por certas mudanças durante a transformação celular (SONG et al., 1993).

O ácido siálico geralmente ocorre no final de cadeias de carboidratos comumente em  $\alpha$ -2,3- ou  $\alpha$ -2,6- ligados a galactose (Gal) ou em resíduos de proteínas como N-acetil-D-galactosamina (GalNAc). A presença do ácido siálico sobre carboidratos está associada a uma variedade de interações biológicas como em estímulo e mascaramento antigênico. Mudança

na quantidade de ácido siálico e/ou tipos específicos de ligação com outros glicoconjugados de superfície celular tem sido observadas em invasão e metástase causadas pelo câncer (MOSTAFAPOUR & GOLDSTEIN, 1993).

O antígeno do grupo sanguíneo Lewis é biosintética e estruturalmente associado a carboidratos, e é usado como marcador de desenvolvimento embrionário e diferenciação celular. Em adultos, a sua presença não é limitada somente a eritrócitos, mas também pode ser encontrado em diferentes tecidos. A transformação neoplásica está freqüentemente associada com uma glicosilação anormal, resultando na expressão alterada de determinados carboidratos. Normalmente, o aumento ocorre durante a progressão tumoral. Os antígenos de carboidratos associados a tumores são duas estruturas de carboidratos conhecidas como sialyl Lewis<sup>a</sup> e sialyl Lewis<sup>x</sup> (Figura 1) (UGORSKI & LASKOWSKA, 2002; KANNAGI et al., 2004).

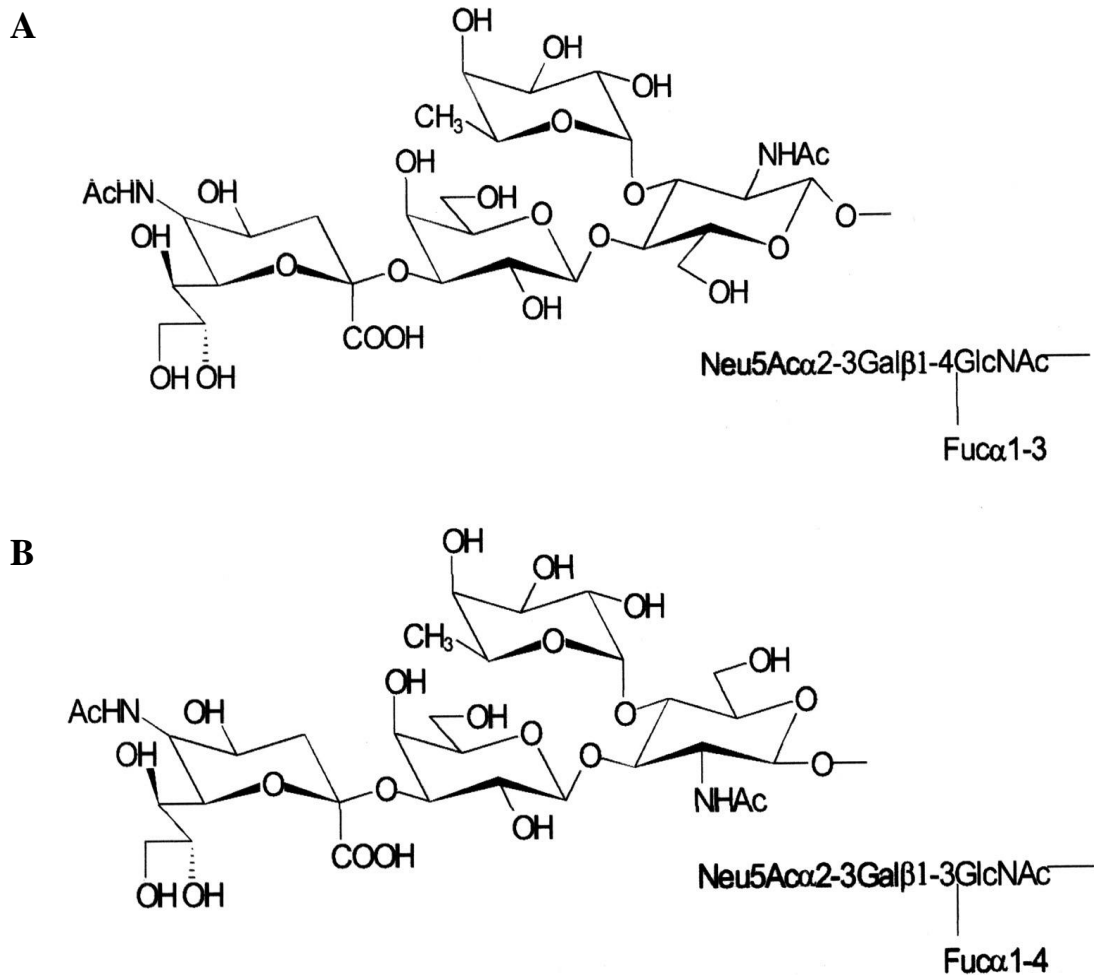
Estudos demonstram que sialyl Lewis é um ligante para E-selectina e possui um importante papel na metástase tumoral (KIJIMA et al., 2003). Sialyl Lewis<sup>a</sup> desempenha um papel essencial na adesão ao endotélio de células do câncer, derivadas de órgãos digestivos como cólon, reto, pâncreas e trato biliar, enquanto o sialyl Lewis<sup>x</sup> desempenha papel na adesão com células do câncer derivadas da mama, ovário e pulmão. Estes resultados levantaram a possibilidade de que a adesão das células do câncer ao endotélio é mediada pela E-selectina e ligantes de carboidratos específicos que podem estar envolvidos na metástase hematogênica do câncer (KANNAGI et al., 2004).

O antígeno sialyl Lewis<sup>a</sup> foi descoberto por Koprowski et al.<sup>5</sup> em 1979 com o uso do anticorpo monoclonal 19-9. Com o uso deste anticorpo foi observado uma elevada expressão na superfície de células do câncer humano de pâncreas, cólon e estômago *in vitro*, como também em adenocarcinoma humano de cólon, estômago, pâncreas e vesícula biliar (UGORSKI & LASKOWSKA, 2002).

Kannagi et al. (2004) relatam que o Japão é o país que mais aplica a rotina para diagnóstico de marcadores de carboidrato tumoral em pacientes com câncer, por acreditarem que esses antígenos estão associados à natureza maligna das células tumorais e intimamente envolvidos com as metástases hematogênicas e com a angiogênese tumoral.

---

<sup>5</sup> KOPROWSKI, H.; STÉPLEWSKI, Z.; MITCHELL, K.; HERLYN, M.; HERLYN, D.; FUHRER, J.P. Colorectal carcinoma antigen detected by hybridoma antibodies. **Somat Cell Genetic**, v. 5, p. 957-72, 1979.



**Figura 1.** Estrutura dos antígenos sialyl Lewis<sup>a</sup> (A) e sialyl Lewis<sup>x</sup> (B) (UGORSKI & LASKOWSKA, 2002).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. ANIMAIS**

Para a realização do presente estudo, foram utilizados 42 camundongos BALB/c, fêmeas, com 6-8 semanas de idade, e pesando de 20 a 24 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante o período de experimentação, os animais permaneceram no referido biotério, recebendo água e ração comercial balanceada *ad libitum*.

### **4.2. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

As células do tumor ascítico de Ehrlich encontravam-se congeladas em nitrogênio líquido e foram cedidas pelo Laboratório de Biologia do Câncer do Departamento de Biologia Animal da UFV.

Após o descongelamento das células inoculou-se intraperitonealmente, com auxílio de seringas de insulina, 0,3 mL da suspensão destas células em PBS em camundongos receptores.

Para a manutenção do tumor foram colhidos, de animais portadores, cerca de 0,3 mL de fluido ascítico contendo aproximadamente  $10^8$  células tumorais e inoculados intraperitonealmente em camundongos receptores. Esse procedimento foi repetido a cada 10 dias durante 30 dias.

### 4.3. PREPARO DAS CÉLULAS TUMORAIS PARA INOCULAÇÃO

Com o auxílio de seringas e de agulhas descartáveis estéreis, foram colhidos cerca de 3,0 mL de fluido ascítico de camundongo inoculado há 10 dias com o tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal. A suspensão celular do fluido ascítico foi centrifugada<sup>6</sup> a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em tubos de centrífuga<sup>7</sup> com solução salina tamponada, sendo este procedimento repetido por três vezes. Quando necessário, era utilizada a lise de hemácias, por 2 vezes.

Foram feitas contagens, teste de viabilidade das células pelo método de exclusão com azul de tripano a 0,4%, utilizados na proporção 1:1. Para a contagem das células, utilizou-se Hemocítômetro de Neubauer, contando as células dos quatro quadrados externos, ou quadrados brancos.

As células que apresentavam a coloração azul eram consideradas inviáveis levando em consideração a viabilidade maior que 90%. O número de células presentes na suspensão foi ajustado para  $2 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ .

---

<sup>6</sup> Centrifuga BR4i – JOUAN

<sup>7</sup> Corning – 14 mL

#### 4.4. INOCULAÇÃO DOS ANIMAIS

Os camundongos foram eutanasiados com superdosagem de anestésico e com auxílio de seringa e agulha descartáveis estéreis, recebiam 0,1, 0,05 e 0,05 mL de suspensão, contendo  $2 \times 10^6$  células tumorais por via intravenosa (veia da cauda), via subcutânea (coxim plantar esquerdo) e intramuscular (músculo vasto lateral direito) respectivamente, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Esquema de inoculação

Tratamentos	Qtd.	Vias de inoculação	Inóculo	Qtd. total
I A (controle)	4	IV	PBS – 0.1 mL	
I B (15 dias)	5	IV	TAE/PBS – 0,1 mL	14
I C (30 dias)	5	IV	TAE/PBS – 0,1 mL	
II A (controle)	4	IM	PBS – 0,05 mL	
II B (15 dias)	5	IM	TAE/PBS – 0,05 mL	14
II C (30 dias)	5	IM	TAE/PBS – 0,05 mL	
III A (controle)	4	SC	PBS – 0,05 mL	
III B (15 dias)	5	SC	TAE/PBS – 0,05 mL	14
III C (30 dias)	5	SC	TAE/PBS – 0,05 mL	

#### 4.5. CRESCIMENTO CELULAR DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH *IN VITRO*

Para o estabelecimento da curva de crescimento da linhagem de células do adenocarcinoma estudado utilizou o item 4.3, onde foram inicialmente plaqueadas  $5 \times 10^5$  células em meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA<sup>®</sup>) completo. Posteriormente, as células foram cultivadas em placas de vinte e quatro poços<sup>8</sup> em estufa<sup>9</sup> de CO<sub>2</sub> a 5%, umidade 95% e

<sup>8</sup> Nunclon

<sup>9</sup> CO<sub>2</sub> Incubator NU4750 - NUAIRE

temperatura de 37°C. A intervalos regulares de 24 horas até as 96 horas, as células contidas em cada poço foram contadas utilizando o método de exclusão pelo azul de tripano. Esse experimento foi feito em duplicata e teve como controle positivo a utilização do mitógeno concanavalina A (Con A) na concentração de 5 µg/mL.

#### **4.6. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA**

Os camundongos foram eutanasiados 15 e 30 dias após a inoculação. Dos grupos II e III coletaram-se amostras dos linfonodos poplíteo, inguinal, braquial e axilar, e do grupo I, além dos linfonodos poplíteo, inguinal, braquial e axilar coletou-se também o pulmão, baço e fígado. Alterações macroscópicas como presença de nódulos, cápsulas e angiogênese foram observadas. Estes fragmentos foram fixados em formol tamponado 10%, processados pelas técnicas histológicas usuais de desidratação, diafanização e inclusão em parafina, cortados com 4 micrômetros, e corados pela hematoxilina-eosina para estudo em microscópio de luz. Levou-se em consideração na análise a observação de índices mitóticos, pontos de necrose, infiltrados inflamatórios, presença de metástases ou colonizações. Parte desse material foi também utilizado para a realização da técnica de imunohistoquímica (item 4.8.1).

#### **4.7. ANTICORPO UTILIZADO**

O anticorpo policlonal monoespecífico antimolécula de adesão<sup>10</sup> (anti E-selectina) com reatividade conhecida para humano, bovino e ovino, usado no presente estudo, foi diluído numa concentração de 1:80 em solução de PBS pH 7,2.

---

<sup>10</sup> Neo Markers ®

## 4.8. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

### 4.8.1. Identificação de E-selectina em amostras de tecidos

A identificação da molécula de adesão foi realizada pela técnica de Ipx indireta, segundo protocolo utilizado por Sanabria (2002), com algumas modificações, tais como: mudança na inclusão das amostras, onde se substituiu Tissu Freezing Médium<sup>®</sup> por inclusão em parafina e fixação em solução de paraformaldeído por formol tamponado 10%.

Foram utilizadas amostras de tecidos que apresentaram metástases. Fragmentos de tecidos processados por técnicas histológicas de rotina e seccionados com 4 µm de espessura foram desparafinizados durante 24 horas (56°C) e diafanizados em dois banhos de xilol por 30 minutos cada. A seguir, hidratação em dois banhos com álcool absoluto, álcoois 95%, 80% e 70% por cinco minutos cada. As lâminas foram lavadas em água destilada por dez minutos e posteriormente submersas em tampão PBS pH 7,2 durante cinco minutos. Posteriormente, foram incubadas com PBS-glicina 0,1 M durante 10 minutos para bloquear os radicais aldeídos e lavadas duas vezes com PBS 7,2 durante 5 minutos cada. As amostras foram incubadas em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30v a 4,0% em PBS, pH 7,2, durante 20 minutos, para bloquear a peroxidase endógena. Após 3 lavagens com PBS 7,2 durante 5 minutos cada, as ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS contendo 10% de soro equino, durante 30 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada. As lâminas foram incubadas com o anticorpo policlonal monoespecífico antimolécula de adesão E-selectina (CD62-E) durante 24 horas a 37°C. Após três lavagens com PBS durante 5 minutos cada, o material foi incubado com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com peroxidase (SIGMA<sup>®</sup>) diluída 1:300, durante 50 minutos a 37°C em câmara úmida. Depois de 2 lavagens por 5 minutos cada com PBS pH 7,2, realizou-se a revelação com cromógeno (0,025% de DAB – SIGMA<sup>®</sup> e 3,0% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30v em PBS pH 7,2) durante 15 minutos no escuro, seguindo-se 2 lavagens por 5 minutos cada com PBS pH 7,2 e contracoloração com Hematoxilina de Harris 1:3 por 3 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água destilada deionizada durante 5 minutos, secas, montadas com Entellan<sup>®</sup> e observadas em microscópio de luz.

Os resultados foram avaliados mediante presença (+) ou ausência (-) de imunomarcacão.

#### **4.8.2. Identificacão de E-selectina em cultura de células endoteliais estimuladas com líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich**

Para a inoculacão utilizou-se suspensão celular com  $2,5 \times 10^6$  células do TAE, por via intraperitoneal. A coleta do líquido ascítico (LA) foi feita no 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 12<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias pós-inoculacão. Centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, o líquido ascítico foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVEC's) da 12<sup>a</sup> passagens, foram cultivadas em placas de 24 poços, nas quais foram colocadas lamínulas de vidro redondas em cada poço. Após formacão de monocamada foi adicionado sobre elas 50  $\mu\text{L}$  do líquido ascítico nos diferentes tempos de coleta dos animais portadores do TAE com 1,0 mL de meio RPMI 1640 em pH 7,2 (RPMI 1640, HEPES 25 mM, 1% albumina sérica bovina). Foram utilizados como controle, o meio RPMI 1640 (1,0 mL) e o mesmo meio (1,0 mL) com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias (10  $\mu\text{L}$ ). As células endoteliais foram estimuladas com essas soluçōes por um período de 2 horas.

Após o tempo de estímulo, as lamínulas foram lavadas com PBS e, em seguida fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 minutos, e lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada. A realizacão da técnica de imunoperoxidase indireta para detecção da molécula de adesão E-selectina e a avaliacaão da presença de imunomarcacão foi conduzida conforme o item 4.8.1., com a seguinte modificacão: a incubacão das células com anticorpo policlonal monoespecífico antimolécula de adesão E-selectina (CD62-E) foi feita durante 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , ao invés de  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.9. ADESÃO DE CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL BOVINA (BUVEC'S)**

As células endoteliais obtidas de veia umbilical bovina (BUVEC's) encontravam-se congeladas em nitrogênio líquido e foram cedidas pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários (Bioagro/UFV).

Para realizar a adesão, células endoteliais foram colocadas sobre lamínulas de vidro redondas<sup>11</sup> acondicionadas em placas de 24 poços, utilizando meio RPMI 1640 completo (10 % soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 1% antibiótico/antimicótico). O procedimento foi feito em duplicata. Após formação de monocamada, o meio RPMI foi substituído pelo tampão de adesão (RPMI 1640, HEPES 25 mM, 1% albumina sérica bovina pH 7,2) e pelo tampão de adesão com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias conforme tratamentos demonstrados na Tabela 2. Posteriormente, incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, umidade 95% e temperatura de 37°C. Após duas horas, os poços foram lavados por duas vezes com meio RPMI 1640 incompleto. Para confirmação da expressão da E-selectina, utilizou a técnica de Ipx indireta. Células do tumor ascítico de Ehrlich foram obtidas de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich, conforme item 4.3. Foram feitas contagem e ajuste das células do TAE que estavam em suspensão (2,5 x 10<sup>5</sup> células do TAE em 0,5 mL de meio de cultura). Posteriormente, foram colocadas sobre as células endoteliais e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, umidade 95% e temperatura de 37°C, durante 90 minutos. Após o tempo de incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS pH 7,2 sob agitação, por três vezes durante cinco minutos cada e coradas com corante panóptico<sup>12</sup>, de acordo com instruções do fabricante e montadas com lamínulas e Entellan®. O número de células do TAE aderidas em 100 células endoteliais, em cada lamínula, foi contado em microscópio de luz utilizando-se o aumento de 1000x.

O resultado do teste foi expresso como número médio de células aderidas em 100 células endoteliais. O restante das células do tumor ascítico de Ehrlich foi colocado em garrafas e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, umidade 95% e temperatura de 37°C por 2 dias. Posteriormente, após separação dos dois tipos celulares o procedimento de adesão foi repetido somente com células que aderiam ao substrato.

---

<sup>11</sup> Chance propper LTDA – 13 mm de diâmetro

<sup>12</sup> Instant Prov®, Newprov.

Tabela 2 – Tratamentos utilizados para estímulo de células endoteliais.

	Tratamentos	Tempo de estímulo (h)	Quantidade
1	Plasma contendo citocinas pró-inflamatórias + tampão de adesão	2	10 µl de plasma + 1,5 mL de tampão
2	Tampão de adesão	2	1,5 mL

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CRESCIMENTO CELULAR DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich *IN VITRO*

A dinâmica do crescimento celular permitiu avaliar, no período entre 24 a 96 horas, a multiplicação celular e formação de monocamada (Figura 2). Levando-se em consideração que existiam dois tipos celulares nesta linhagem, uma parte das células aderiu ao substrato, e a outra parte permaneceu em suspensão. As células aderentes começaram a formar monocamada a partir de 24 horas, sem no entanto chegar a confluir ao final das 96 horas, mostrando que a maior parte das células permaneceu em suspensão. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Song et al. (1993) e Roth et al. (1994) que constataram a presença de tipos celulares diferentes em relação a forma, a capacidade de aderência ao substrato, bem como em relação às características morfológicas e químicas diferentes.

As células deste tumor apresentaram um elevado grau de pleomorfismo celular, o qual estava relacionado também com a variação no tamanho dos núcleos. Esta afirmativa pode ser confirmada pelas observações de Dagli (1989) que relacionou estas alterações ao grau de diferenciação das células e ao potencial metastático. Segundo o mesmo autor, o volume menor do núcleo estaria associado a uma maior quantidade de DNA.

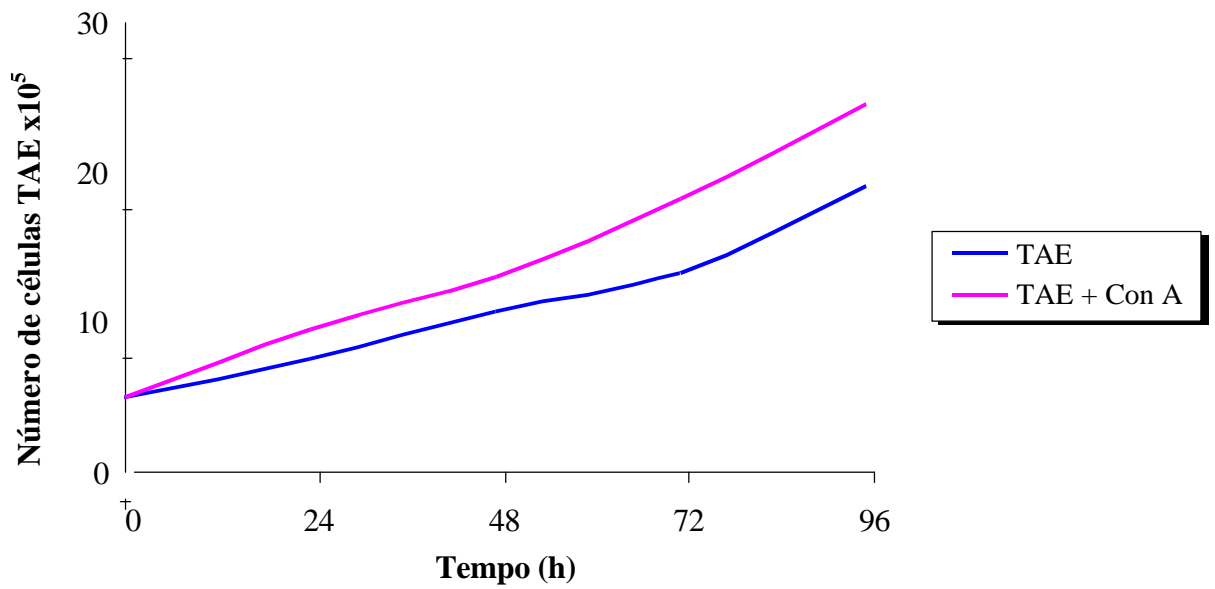
Esse grau de pleomorfismo celular parece estar relacionado ao comportamento *in vitro*, e que define a sua forma, ou seja, as células que estavam em suspensão apresentavam formas arredondas ou ovaladas, e aquelas que aderiam ao substrato apresentavam-se estreladas e fusiformes (Figura 3). Estes dois tipos celulares possuíam núcleo bastante volumoso e de contorno irregular com nucléolos exuberantes, concordando com os achados

de Roth et al. (1994) que estudaram três variantes do TAE, as quais apresentaram diferenças na morfologia e no comportamento *in vitro*.

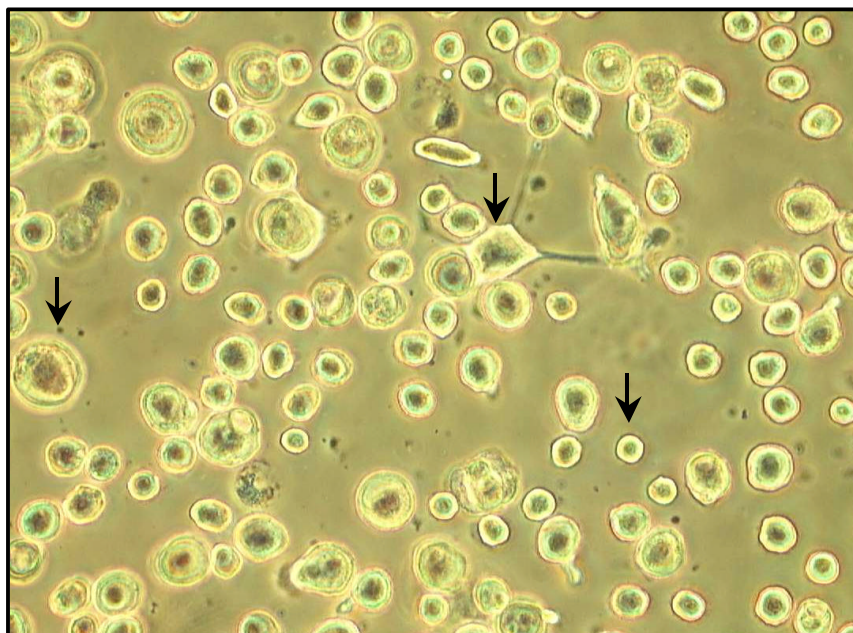
Estas diferenças presentes na linhagem de células do tumor ascítico de Ehrlich não representaram limitações ao estudo, apenas determinaram a necessidade de separar as células que aderem ao substrato daquelas que ficam em suspensão com a finalidade de realizar o teste de aderência em células endoteliais, para poder determinar a capacidade de adesão dos dois tipos celulares.

O controle positivo que se usou foi o mitógeno Con A, que é uma proteína globular de origem vegetal obtida a partir do feijão *Canavalia ensiformis* e que, devido a suas propriedades bioquímicas, é considerada uma lectina que tem capacidade de induzir mitose em células de origem linfocítica.

A eficiência na multiplicação celular que foi observada com o uso do mitógeno Con A deve estar relacionada com a presença de receptores para este mitógeno na superfície da membrana das células do TAE. Esta afirmativa pode ser sustentada já que Rittenhouse et al. (1976) haviam sugerido que na superfície das células do tumor ascítico de Ehrlich localizavam-se no mínimo seis receptores individuais para esse mitógeno. Por outro lado, a ligação da Con A ocorre através de interações com a porção de carboidrato das glicoproteínas presentes na membrana das células (PODOLSKY et al., 1974) e as células do tumor ascítico de Ehrlich apresentam carboidratos na superfície das membranas que se expressam de formas diferentes, dependendo do tipo celular ser aderente ou não-aderente (SONG et al., 1993; ROTH et al., 1994).



**Figura 2.** Curva de crescimento *in vitro* do tumor ascítico de Ehrlich.



**Figura 3.** Células do tumor ascítico de Ehrlich em cultura mostrando intenso pleomorfismo e presença de tipos celulares diferentes (setas). Contraste de fase. 400x.

## 5.2. ANÁLISE MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DO TAE

### 5.2.1. Inoculação no coxim plantar

Em nenhum dos animais-controle se observou o desenvolvimento de nódulos tumorais ou alterações microscópicas aos quinze e trinta dias após a inoculação com PBS.

Os animais que receberam a suspensão de células tumorais por via subcutânea no coxim plantar apresentaram edema considerável desta região aos quinze dias pós-inoculação, que se tornou mais intenso após trinta dias (Figura 4), não se observando ulceração da pele. A massa tumoral possuía tamanho irregular, superfície lisa, e algumas vezes apresentava pequenas nodulações. A superfície de corte mostrava coloração esbranquiçada, sendo possível visualizar um aporte sanguíneo aumentado próximo à periferia do tumor, não se observando o mesmo no centro da massa tumoral. O linfonodo poplíteo, que drena a região, apresentou aumento de volume de seis a sete vezes o tamanho normal comparado com aos animais-controle, enquanto que o linfonodo inguinal esquerdo encontrava-se aumentado de quatro a cinco vezes.

Microscopicamente notou-se crescimento exuberante da massa tumoral que invadia a derme (Figura 5). A neoplasia infiltrava feixes musculares, apresentando extensas áreas de necrose localizadas na região central da massa tumoral. A massa tumoral gera uma pseudocápsula que apresentava células grandes, núcleos com cromatina condensada e nucléolos evidentes, algumas das quais eram gigantes e multinucleadas. No geral, apresentavam elevado pleomorfismo celular, além de numerosas figuras mitóticas, algumas atípicas e bizarras. O tumor possuía estroma escasso com pouca substância intercelular. Também se observou reação inflamatória moderada na derme papilar e o infiltrado predominantemente composto por células mononucleares.

Nos linfonodos poplíteos observou-se hiperplasia reacional. Nesta fase, havia numerosos nódulos linfóides bem desenvolvidos, mostrando centros germinativos em crescimento além de hiperplasia da região paracortical e dos cordões medulares. No seio subcapsular de 40% dos linfonodos poplíteos do grupo de trinta dias foram observados focos de crescimento tumoral que comprimiam e afastavam o tecido linfóide subjacente invadindo-o (Figura 6), além de apresentar áreas de necrose (Figura 7). Este crescimento apresentava

características histológicas semelhantes às massas tumorais que se desenvolveram no coxim plantar.

Na avaliação dos linfonodos inguinais, observou-se hiperplasia reacional semelhante ao que foi constatado no linfonodo poplíteo; porém, não se observou nenhum crescimento neoplásico secundário.

### **5.2.2. Inoculação intramuscular**

Nos animais-controle não foram observadas alterações macroscópicas nem microscópicas após inoculação com PBS, aos quinze ou aos trinta dias.

Nos animais que receberam a suspensão de células tumorais observou-se, aos quinze dias, edema do membro pélvico direito. Este edema foi mais intenso aos trinta dias pós-inoculação (Figura 8).

Macroscopicamente, detectou-se ulceração na pele somente no grupo de trinta dias. Havia hiperplasia dos linfonodos poplíteos e inguinais, os quais mostravam aumento da vascularização em ambos os grupos (Figura 9). A massa tumoral possuía características macroscópicas semelhantes às desenvolvidas no coxim plantar dos animais, notando-se também a formação de novos focos tumorais próximos ao tumor primário.

O aspecto histológico do tumor desenvolvido no tecido muscular apresentou características semelhantes às aquelas do tumor no coxim plantar. A massa tumoral cresceu de forma intensa, invadindo os feixes musculares (Figura 10), mostrou elevado índice mitótico e infiltrado inflamatório próximo à pseudocápsula que recobre a massa tumoral. Observou-se foco de crescimento metastático em apenas 20% dos linfonodos poplíteos analisados. A metástase comprometeu o linfonodo em sua cápsula, preenchendo o seio subcapsular em uma das faces do linfonodo. Não houve crescimento tumoral nos linfonodos inguinais; porém, observou-se aumento de volume dos linfonodos poplíteos e inguinais, e em alguns casos estendendo-se aos axilares.

Os linfonodos regionais apresentaram uma hiperplasia reacional semelhante a ocorrida nos animais inoculados no coxim plantar. Embora os centros germinativos fossem proeminentes, eles apresentavam numerosos macrófagos, os quais mostravam corpúsculos cromófilos no citoplasma. Havia também histiocitose sinusal. O tecido adiposo periganglionar

apresentava aumento de vascularização acompanhado de infiltrado inflamatório intenso, composto por linfócitos, histiócitos, mastócitos e plasmócitos.

### 5.2.3. Inoculação intravenosa

Nos animais-controle não foram observadas alterações macro nem microscópicas em nenhum dos órgãos analisados após inoculação com PBS.

Nos animais que receberam a suspensão de células tumorais não foram observadas, macroscopicamente, nódulos nos órgãos analisados. Entretanto, em um animal observou-se crescimento tumoral no local da inoculação (cauda), o que pode ter ocorrido por um possível extravasamento de células tumorais.

A análise histológica das amostras dos órgãos coletados aos quinze dias não mostrou a presença de células tumorais indicativa de colonização pelo tumor ascítico de Ehrlich, enquanto que aos trinta dias foram detectadas colonizações em 40% dos linfonodos inguinais analisados (Figura 11) e em 20% dos linfonodos braquiais. Os focos de crescimento iniciavam-se no seio subcapsular invadindo o tecido linfóide, porém sem apresentar áreas de necrose. As células tumorais presentes nos linfonodos mostravam-se bastante pleomórficas com elevado índice mitótico (Figura 12).

O fígado de todos os animais mostrou aglomerados de células blásticas disseminadas por todo o parênquima hepático (Figura 13), expandindo espaços porta e sinusóides, além da presença de alguns megacariócitos. O baço aparentemente mostrou aumento do número de megacariócitos em relação ao baço dos animais do grupo-controle (Figura 14).

O crescimento de células *in vivo* após inoculação intramuscular e no subcutâneo (coxim plantar) dos camundongos resultou na formação de massa tumoral sólida local e de metástases em linfonodos regionais, e pela via hematogênica ocorreu migração de células e colonização em linfonodos. Assim, o modelo proposto mostrou-se adequado devido ao crescimento tumoral em todos os animais inoculados, não regredindo espontaneamente. Entretanto, o modelo de disseminação hematogênica não favoreceu a metástase em pulmão como descrito por Rizzo (2000) e sim o desenvolvimento de colonização em linfonodos inguinais e braquiais. O crescimento rápido, que é uma característica do tumor ascítico de Ehrlich, não depende somente da sua localização anatômica, mas pode estar relacionada ao

número de células utilizadas na transplantação uma vez que Guerra (1983) obteve taxas diferentes de crescimento, de acordo com diluições das células do tumor ascítico de Ehrlich inoculadas no coxim plantar, o que segundo esse mesmo autor poderia permitir uma resposta de evasão tumoral. A este respeito, Abbas et al. (2003) consideraram que o crescimento tumoral rápido pode permitir o estabelecimento de tumores imunologicamente resistentes antes do desenvolvimento de uma resposta imune efetiva, denominada “penetração furtiva” segundo o qual a transplantação de pequenas quantidades de células tumorais pode levar ao desenvolvimento de tumores letais, enquanto transplantes maiores do mesmo tumor são rejeitados. Ainda a este respeito, o mesmo autor explica que a resposta imune pode também estar relacionada com a seleção de células tumorais mutantes que perderam a expressão das proteínas imunogênicas, especialmente se estas forem críticas para o fenótipo maligno do tumor.

Segundo Rizzo (2000) os pulmões são sítios preferenciais de nidação do tumor de Ehrlich; entretanto, neste estudo, não se observou metástase pulmonar em nenhum dos animais quando inoculados por via intravenosa. Este fato pode ser justificado pela quantidade de células inoculadas e por alguns fatores mecânicos que as células tumorais podem sofrer quando entram em contacto com o fluxo sanguíneo. Além disso, muitas células sofrem lise devido a atuação do sistema imune. Ainda, deve ser levado em consideração o procedimento utilizado para inoculação intravenosa, como a tripsinização, que segundo Subiza et al. (1987) removeria proteínas antigênicas modificando a membrana das células, o que concorda com Rizzo (2000) quando afirma que para reproduzir metástases experimentais devem ser tomados cuidados especiais para não alterar as características da membrana celular, pois estas alterações podem reduzir a capacidade metastática das células tumorais. Segundo Fidler<sup>13</sup> (1970, apud RIZZO, 2000) vale ressaltar que apenas 1% das células tumorais inoculadas intravenosamente sobrevivem para formarem nódulos tumorais metastáticos.

A disseminação linfática utilizada por células do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos constitui um modelo adequado para investigação da migração destas células. Com base nos resultados deste trabalho os grupos de inoculação de células tumorais no coxim plantar e intramuscular representaram de forma contundente a comprovação de que células do tumor de Ehrlich migram por via linfática, concordando com as pesquisas de Dagli (1989) e Rizzo (2000).

---

<sup>13</sup> FIDLER, I.J. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125I-5-Iodo-2-deoxyuridine. **Journal Nat. Cancer Inst.**, v. 45, p. 773-82, 1970.

Segundo Cotran et al. (2000) existem três vias de disseminação tumoral: implantação direta, disseminação linfática e hematogênica, sendo que as duas últimas vias assumem grande importância por serem as mais comuns, e por isso mais discutidas. Bogliolo et al. (1997) e Brasileiro Filho et al. (1998) afirmam que a via linfática é a preferencial dos carcinomas. Então, considerando que o TAE é um adenocarcinoma de mama, justifica-se o aparecimento de metástases nos linfonodos regionais que drenam a região, confirmando que o TAE também usa preferencialmente a via linfática.

No TAE há perda de expressão do MHC, razão pelo qual o tumor cresce em várias linhagens de camundongos (BERGAMI-SANTOS et al., 2004) e, portanto, tem a capacidade de metastatizar por via linfática e hematogênica. Segundo Hart (1989), em vários tumores murinos examinados, existe uma concordância entre o aumento da habilidade para metastatizar e a perda da expressão de moléculas do MHC de classe I. Abbas et al. (2003) mostraram que, ao analisar tumores que são transplantados seriadamente de um animal para outro, ocorre perda de antígenos reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos tumor-específicos, havendo uma correlação com o aumento do crescimento, invasividade e potencial metastático. Então, pelos resultados obtidos no presente estudo é possível sugerir que as células do tumor ascítico de Ehrlich que foi utilizado nesta pesquisa podem ter perdido ou modificado os antígenos reconhecidos pelos linfócitos T-citotóxicos, o que explicaria a invasividade que se observou quando estas células foram inoculadas via intramuscular ou no coxim plantar.

A drenagem por linfonodos regionais resultou em metástases no seio subcapsular de alguns destes linfonodos, além de causar hiperplasia da rede nodal. O seio subcapsular foi a área onde se desenvolveram as metástases, e isto se deve ao fato de que os vasos linfáticos aferentes despejam a linfa nesta região. Já as áreas de necrose coagulativa observadas nos linfonodos poplíteos foram consequência da falta de suprimento sanguíneo, o que pode ter sido ocasionado por obstrução dos vasos, seja por êmbolos neoplásicos ou pelo crescimento rápido e agressivo deste tumor.

A hiperplasia reacional ocorreu em 100% dos linfonodos regionais concordando com os resultados obtidos por Dagli (1989) que estudou a disseminação linfática do TAE. Conforme Cotran et al. (2000), a hiperplasia reativa ocorre devido a processos inflamatórios que ativam células B ou, simplesmente, é uma resposta do hospedeiro à drenagem de células tumorais e/ou seus produtos.

Outros linfonodos da rede nodal que não o linfonodo regional não desenvolveram metástases, provavelmente devido ao fator tempo, embora tenham sido visualizadas células

tumorais isoladas em vários linfonodos da rede nodal. Este achado pode ser explicado pelo fato de que os linfonodos regionais são responsáveis pela importante função de criar uma barreira efetiva, porém temporária, contra as células neoplásicas (BOGLIOLO, 1987).

Ainda, no grupo inoculado via intramuscular, foi detectado que alguns linfonodos axilares mostraram hiperplasia reacional acompanhada de uma reação inflamatória discreta com presença de mastócitos. Segundo alguns pesquisadores, este fato estaria relacionado, à presença de câncer de mama (THORESEN et al., 1982; DAGLI, 1989; NAIK et al., 1997). No entanto, a presença de células tumorais só poderia ser confirmada com o uso de métodos imunohistoquímicos, mediante a utilização do anticorpo monoclonal A10 que detecta epítomos de natureza glicídica das células do tumor ascítico de Ehrlich (RIZZO, 2000). Por outro lado, esta hiperplasia reacional pode ser em decorrência da resposta imune a antígenos originários das células neoplásicas, já que é no linfonodo que se inicia a resposta imune adaptativa (ABBAS et al., 2003).

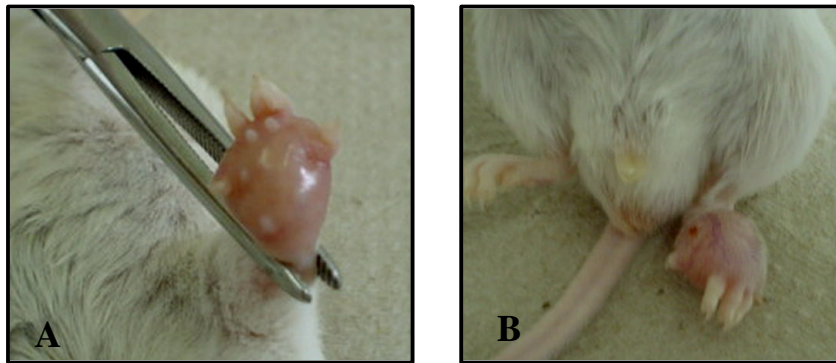
Diferentemente de Dagli (1989) que relatou a ocorrência de metástases em 80% dos linfonodos subseqüentes ao regional quando células tumorais foram inoculadas no coxim plantar, no presente estudo não se constatou formação de crescimento metastático em linfonodos subseqüentes ao regional embora células suspeitas isoladas, semelhantes às tumorais tenham sido encontradas em linfonodos inguinais, segundo o mesmo autor estas células passariam diretamente para esses linfonodos após inoculação. Entretanto, Cotran et al. (2000) esclarecem que linfonodos regionais podem ser preservados para dar lugar às chamadas “metástases em salto”, decorrentes de anastomoses venolinfáticas, ou por obstrução de canais por inflamação ou radiação.

Uma analogia feita por Rizzo (2000) à frase de Zetter<sup>14</sup> (1990), caracteriza de forma interessante o crescimento de focos secundários: “Quando uma planta é semeada, suas sementes são carregadas em todas as direções; porém, só sobrevivem e crescem aquelas que encontram um solo com condições favoráveis”, onde o desenvolvimento do arbusto por intermédio de sementes relaciona-se ao crescimento de células tumorais (sementes) e seus sítios de metastatização (solo fértil). Acredita-se que células tumorais podem se manter viáveis, porém quiescentes, em órgãos distantes, geralmente isoladas, sem desenvolver metástase e que “despertam” em alguma fase do desenvolvimento tumoral. Donenki et al. (1992) detectaram que depois de retirada cirúrgica de tumores localizados no músculo de camundongos, houve recidiva do tumor e aparecimento de metástases.

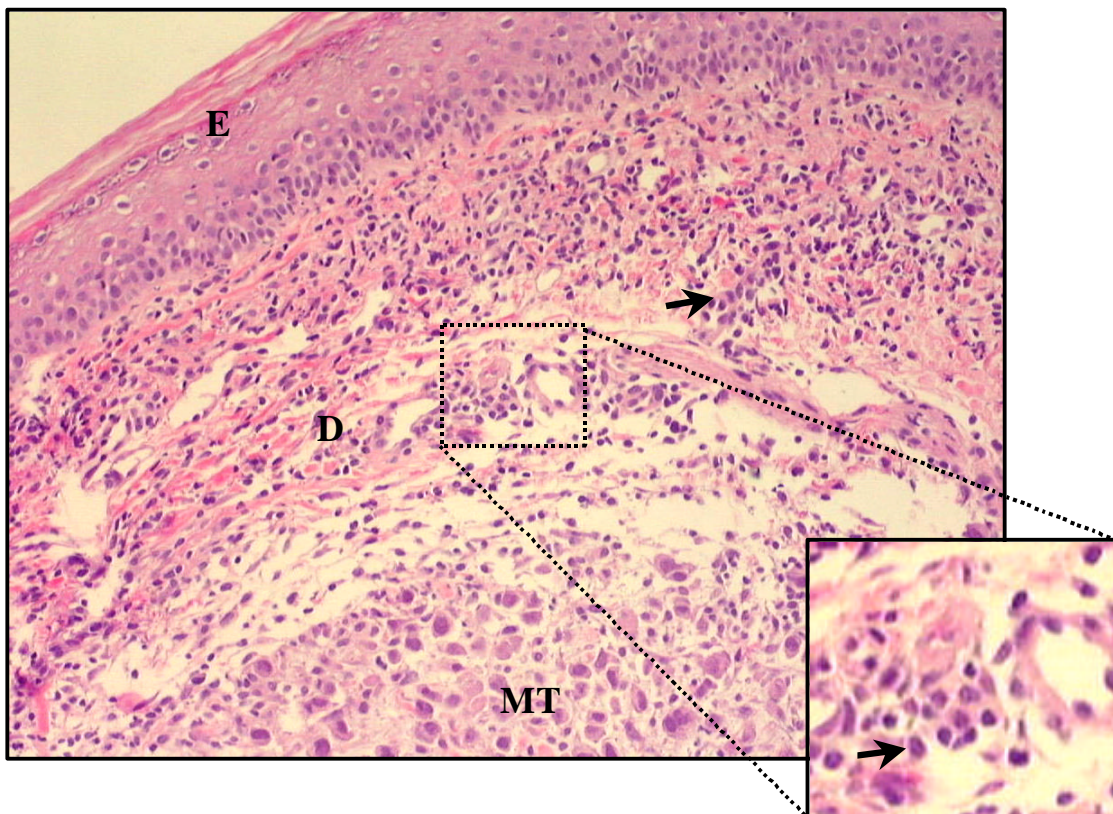
---

<sup>14</sup> ZETTER, B.R. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. **New Engl. J. Med.**, v. 322, n. 9, p. 605-12, 1990.

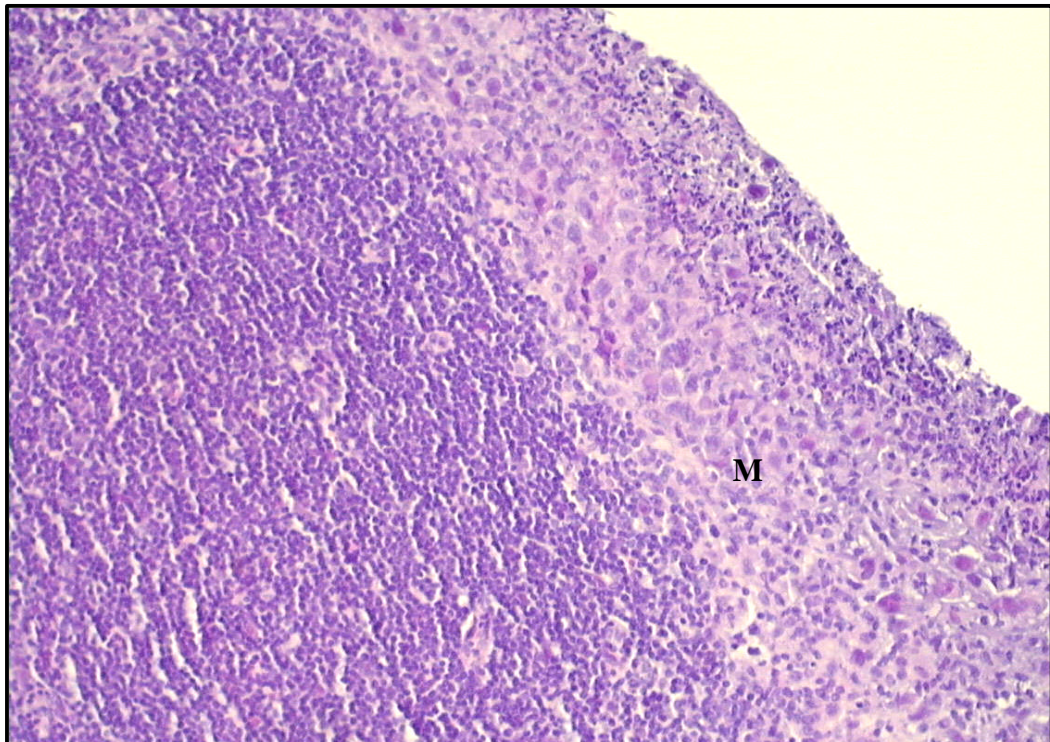
Quando da inoculação intravenosa observou-se hematopoiese extramedular intensa, com aglomerados de células blásticas do tipo linfocítica disseminados por todo o parênquima hepático e esplênico, sugerindo comprometimento da medula óssea, o que também foi citado por Rizzo (2000) que considera este local um foco de nidificação preferencial das células tumorais. Este achado pode ser explicado pelo fato de que o crescimento tumoral geralmente está associado a uma mudança da resposta imune e da hematopoiese, já que segundo alguns autores pode ocorrer neutrofilia, trombocitose e hematopoiese extramedular, a qual pode ser favorecida pelo fator estimulador de colônias que é liberado pelas células do tumor de Ehrlich (KUSMARTSEV et al., 1999; RUIZ DE MORALES et al., 1999). O fator estimulador de colônias regula o crescimento e diferenciação de células hematopoéticas, incluindo macrófagos e granulócitos (BRASILEIRO FILHO et al., 1998), e aumenta a atividade de células supressoras, as quais são detectadas inicialmente na medula óssea, e posteriormente no baço e na massa tumoral. As células supressoras são capazes de inibir a resposta proliferativa e funcional de linfócitos T (KUSMARTSEV et al., 1999; RIZZO, 2000).



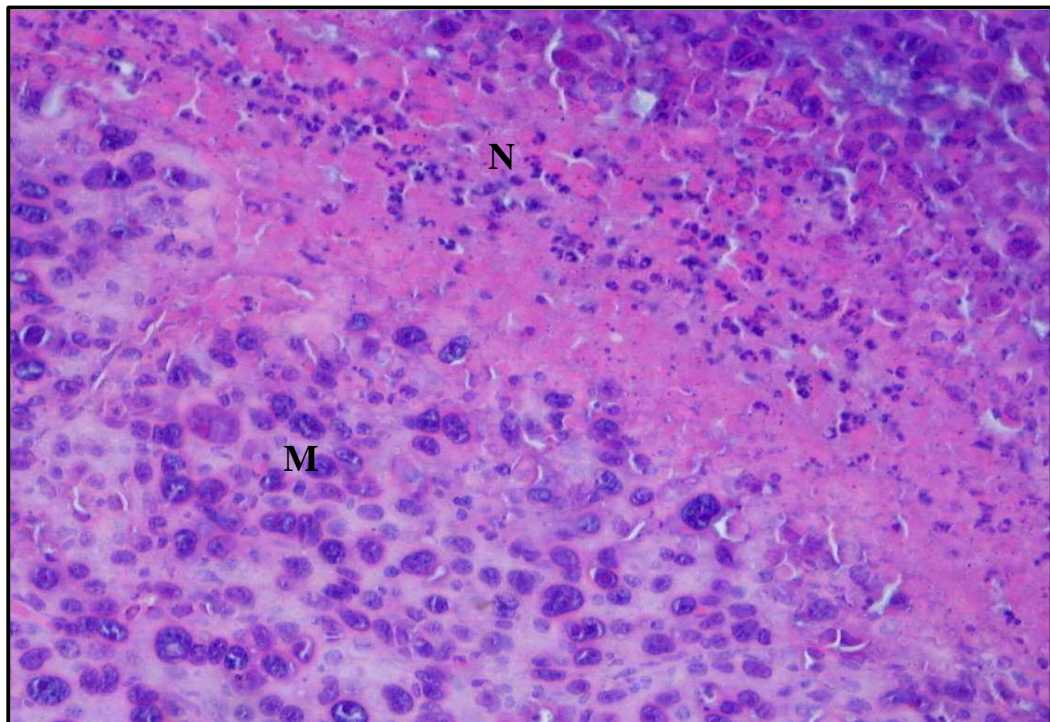
**Figura 4.** Coxim plantar inoculado com células do tumor ascítico de Ehrlich, mostrando crescimento exuberante da massa tumoral. A: região plantar, B: região dorsal.



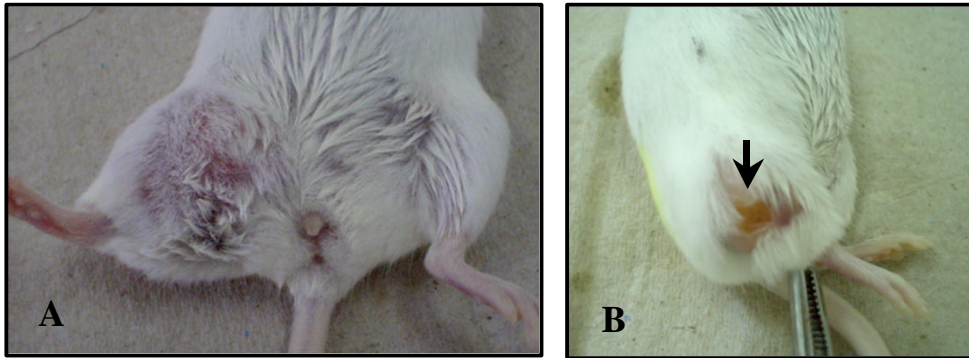
**Figura 5.** Crescimento do tumor ascítico de Ehrlich no coxim plantar, mostrando infiltrado inflamatório (seta) e massa tumoral (MT) invadindo a derme (D). HE. 200x.



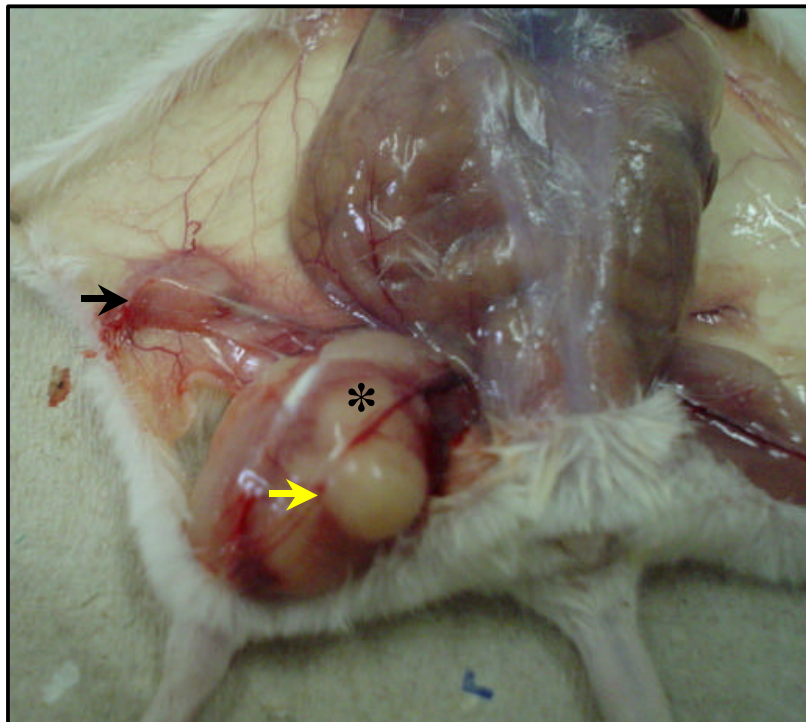
**Figura 6.** Linfonodo poplíteo de animal 30 dias pós-inoculação com células do tumor ascítico de Ehrlich. M: Metástase em seio subcapsular. HE. 200x.



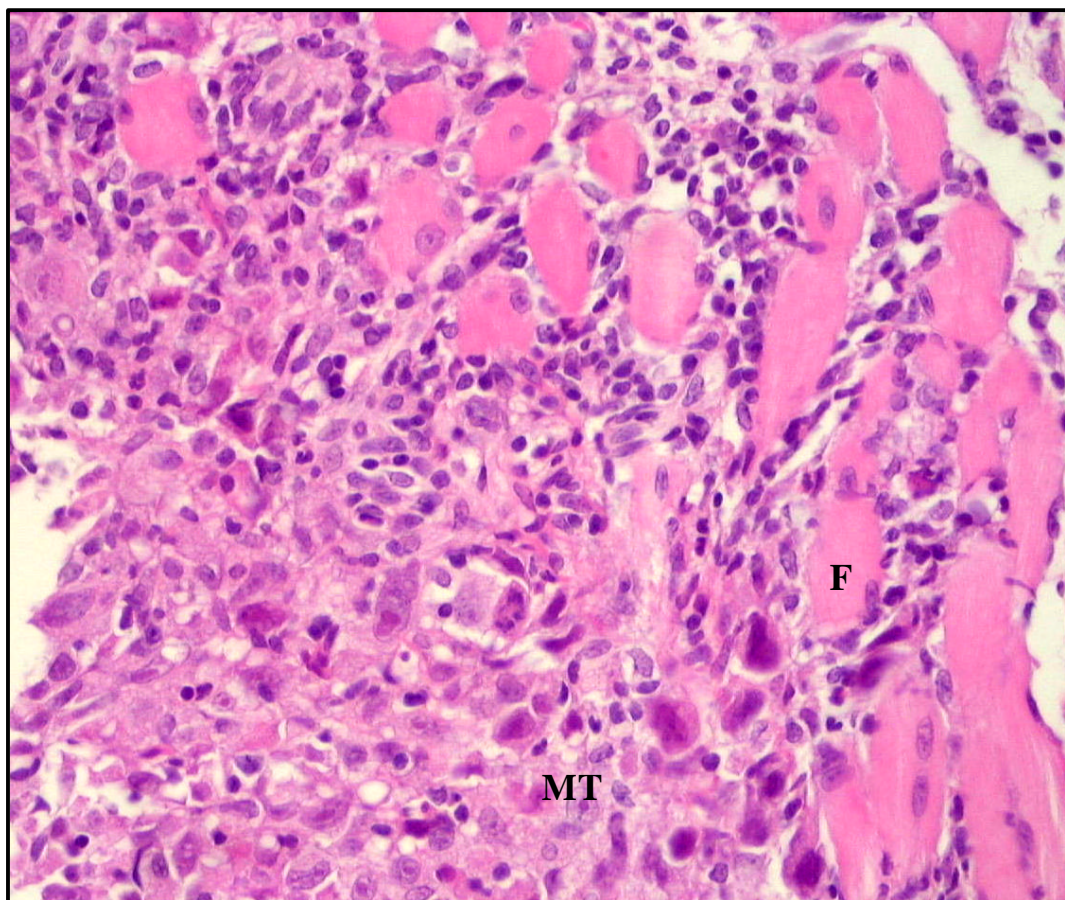
**Figura 7.** Linfonodo poplíteo de animal 30 dias pós-inoculação com células do tumor ascítico de Ehrlich. M: Metástase. N: área de necrose. HE. 400x.



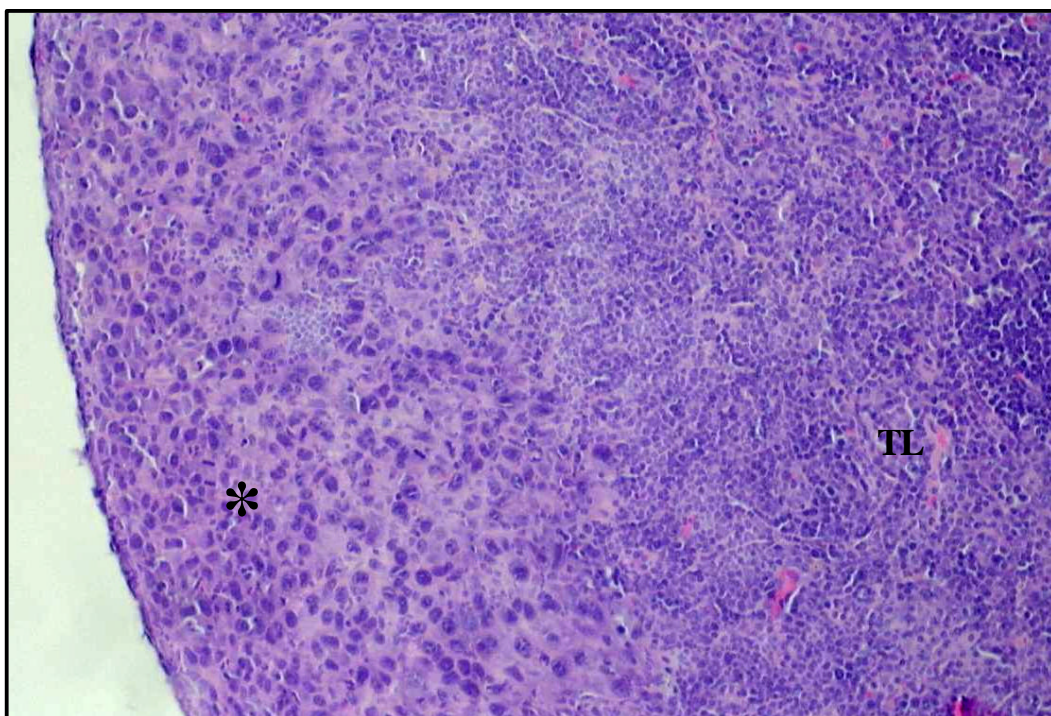
**Figura 8.** Massa tumoral intramuscular desenvolvida 30 dias após a inoculação, mostrando ulceração na pele (seta). A: face medial e B: face lateral.



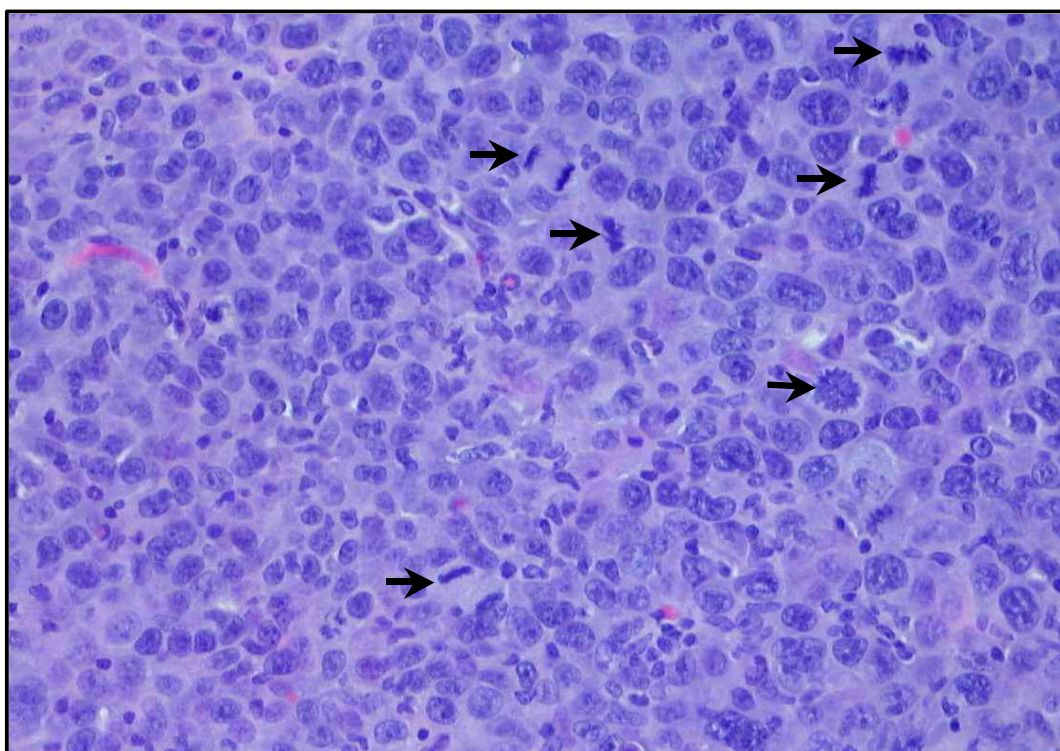
**Figura 9.** Animal inoculado com células do tumor de Ehrlich por via intramuscular. Massa tumoral muito desenvolvida (\*), vascularização intensa próxima ao linfonodo regional com hiperplasia de linfonodos inguinal (seta preta) e poplíteo (seta amarela).



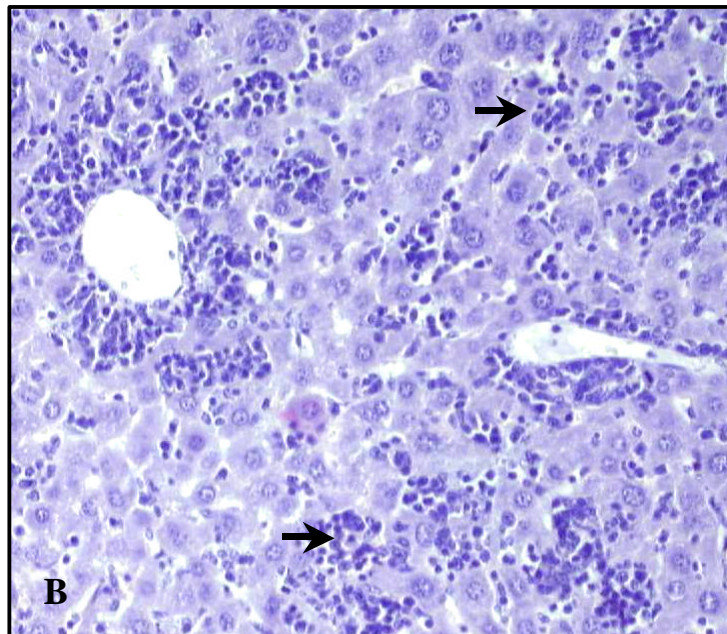
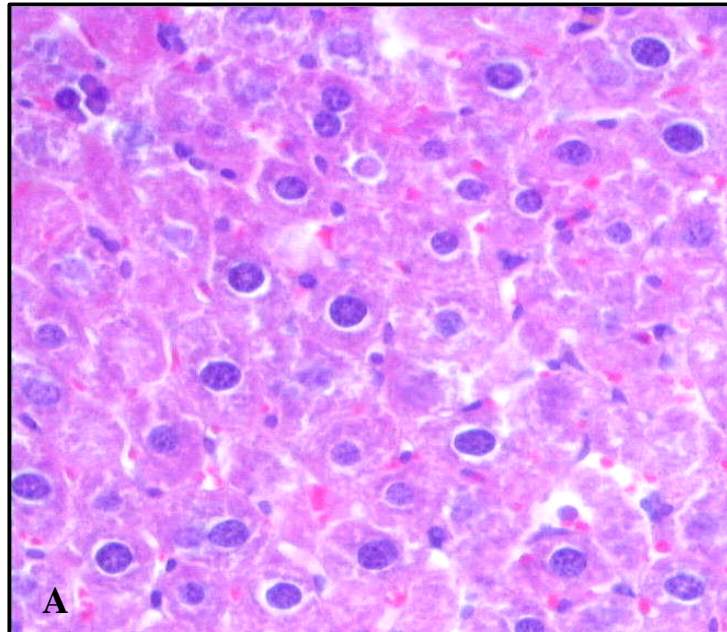
**Figura 10.** Tumor ascítico de Ehrlich intramuscular mostrando alterações histológicas semelhantes ao coxim plantar. MT: massa tumoral, F: feixe muscular. HE. 400x.



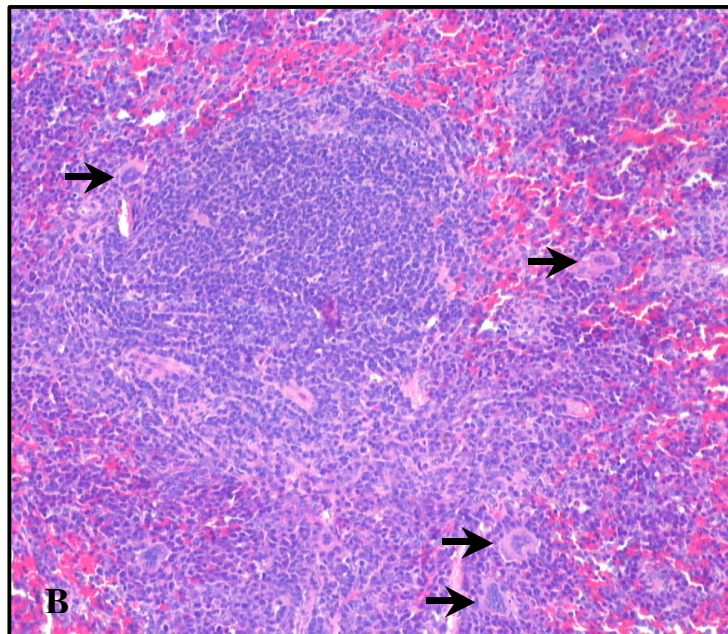
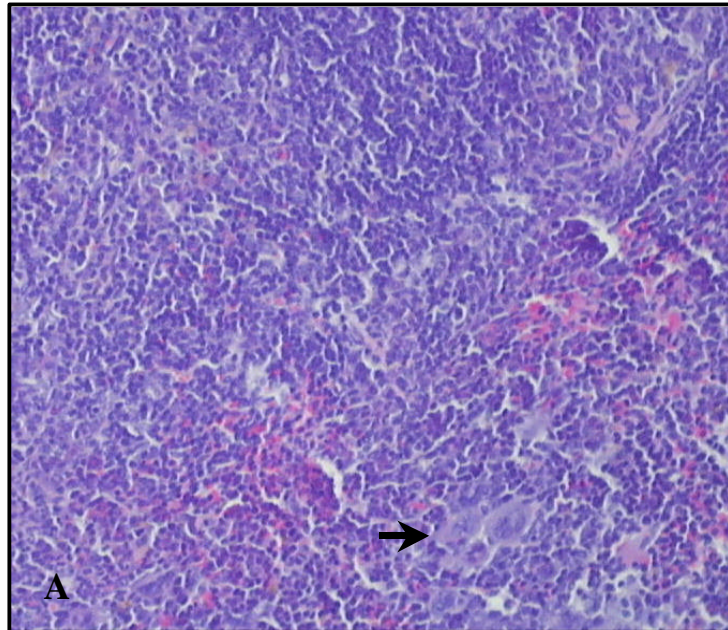
**Figura 11.** Linfonodo inguinal de animal 30 dias após a inoculação mostrando área de colonização por células do tumor ascítico de Ehrlich (\*). TL: tecido linfóide. HE. 200x.



**Figura 12.** Linfonodo inguinal de animal 30 dias após inoculação. Intenso pleomorfismo e numerosas figuras mitóticas (seta). HE. 400x.



**Figura 13.** Fígado de animal controle (A) e de animal 30 dias após inoculação do tumor ascítico de Ehrlich por via intravenosa (B) mostrando hematopoiese extramedular (seta). HE. A: 400x, B: 200x e C: 400x.

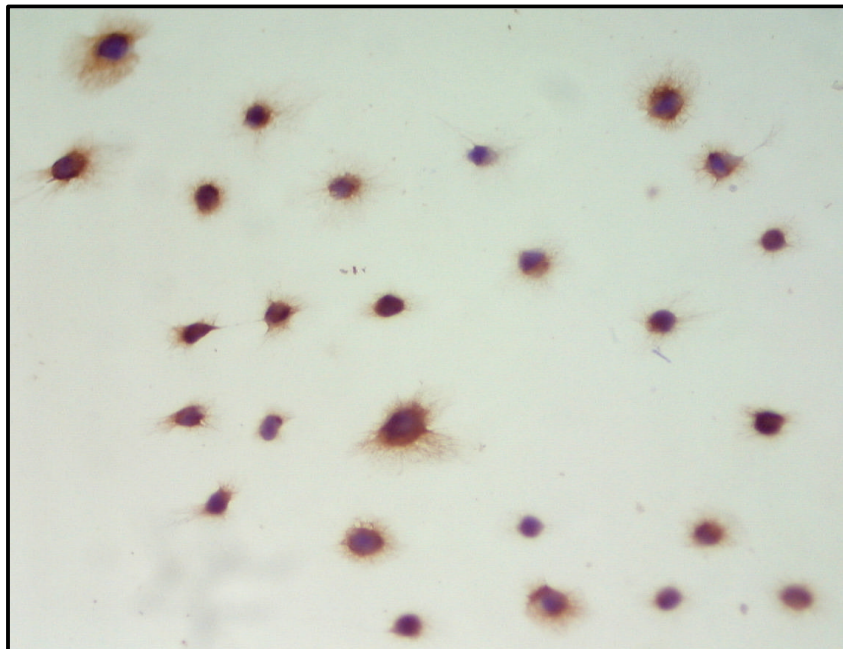


**Figura 14.** Baço de animal controle (A) e de animal 30 dias após inoculação do tumor ascítico de Ehrlich por via intravenosa (B) mostrando hematopoiese extramedular com presença de megacariócitos (seta). HE. A e B: 200x.

### 5.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

#### 5.3.1. Identificação de E-selectina em amostras de tecidos

A análise microscópica das amostras de pulmão, fígado, baço e dos linfonodos dos animais inoculados por via intravenosa com células tumorais 30 dias pós-inoculação, submetidas à técnica de imunoperoxidase para detectar a molécula de adesão E-selectina, não mostraram reação positiva. Entretanto, é importante citar que quando se realizou a mesma análise de imunoperoxidase em células tumorais aderidas *in vitro*, observou-se uma imunomarcacão intensa nestas células (Figura 15), o que indica que esta reação pode ser devido à presença de receptores para isoformas da E-selectina com afinidade pelo anticorpo policlonal monoespecífico contra E-selectina.



**Figura 15.** Células do tumor ascítico de Ehrlich *in vitro*. A cor marrom indica imunomarcacão positiva para o anticorpo anti E-selectina. Ipx. 400x.

### 5.3.2. Identificação de E-selectina em cultura de células endoteliais estimuladas com líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich

Todos os animais inoculados intraperitonealmente com  $10^6$  células do tumor ascítico de Ehrlich apresentaram ascite, com líquido amarelado de consistência viscosa, e em alguns casos hemorrágico (hemácias + + +), com densidade de 1,025, pH alcalino (8,0), proteínas totais (4,0 g/dL) e contagem global de células de 250.000/mm<sup>3</sup>. A análise do esfregaço mostrou uma população celular abundante com predominância de células neoplásicas e presença de raras células inflamatórias dentre elas neutrófilos, linfócitos e macrófagos. Não se observou fungos nem bactérias (Figura 16).

Os resultados da imunoperoxidase indireta, utilizando o anticorpo policlonal monoespecífico contra E-selectina, mostrou que quando as células endoteliais foram estimuladas com líquido ascítico não se observava imunomarcção para esta molécula (-). Entretanto, a imunomarcção era positiva nas células estimuladas com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias (+) e negativa em células endoteliais sem estímulo (-) conforme tabela 3.

Tabela 3. Imunomarcção da molécula de adesão E-selectina em células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVEC's), estimulada com líquido ascítico.

	Tratamentos	Imunomarcção
1	LA do 5 <sup>o</sup> dia + meio RPMI 1640	-
2	LA do 7 <sup>o</sup> dia + meio RPMI 1640	-
3	LA do 8 <sup>o</sup> dia + meio RPMI 1640	-
4	LA do 10 <sup>o</sup> dia + meio RPMI 1640	-
5	LA do 11 <sup>o</sup> dia + meio RPMI 1640	-
6	LA do 12 <sup>o</sup> dia + meio RPMI 1640	-
7	LA do 14 <sup>o</sup> dia + meio RPMI 1640	-
8	Meio RPMI 1640	-
9	Plasma contendo citocinas	+

(+), imunomarcção positiva

(-), imunomarcção negativa

Embora o modelo experimental tenha se mostrado adequado para avaliar a migração de células e a formação de focos secundários, ficou evidenciado que aparentemente não há relação entre as metástases e a expressão da molécula de adesão E-selectina, pelo menos nos períodos de coleta do líquido ascítico. Isto possivelmente seja devido à ausência de citocinas pró-inflamatórias capazes de induzir a expressão desta molécula no endotélio, corroborando os achados de Gentile (2001) quando afirma que somente IL-2 e IL-6 estão presentes em alguma fase do desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich na cavidade peritoneal, sendo necessárias as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$  para desencadear o processo de estímulo às células endoteliais (SANABRIA, 2002).

As citocinas fazem parte de uma família complexa de mediadores inflamatórios que influenciam muitos aspectos da biologia celular tumoral (GENTILE, 2001), dentre eles o favorecimento da migração de células tumorais (BALKWILL & MONTOVANI, 2001), fenômeno auxiliado pela presença de moléculas de adesão expressas no endotélio vascular.

Baseado no que foi anteriormente descrito, pode-se sugerir que este seja um dos mecanismos que dificultaram a migração das células do tumor ascítico de Ehrlich para formação de focos secundários nos órgãos estudados.

Segundo Brasileiro Filho et al. (1998), o processo inflamatório é um fenômeno essencialmente dinâmico e, desta forma, seu aspecto morfológico se modifica com o tempo. Com isto, pode-se supor que em alguma fase do desenvolvimento tumoral pode ter havido presença de E-selectina, mesmo que em pequena quantidade, contribuindo para a disseminação do tumor. Entretanto nos períodos estudados (15 e 30 dias) não houve a expressão desta molécula. Por outro lado, Matsuura et al. (1997) consideraram que a presença de E-selectina no endotélio e no soro de pacientes com neoplasia de mama constituem um importante passo para a disseminação, pois alguns carcinomas de mama expressam em sua superfície carboidratos que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e aumento dos níveis de E-selectina, desta forma favorecendo a adesão entre células do tumor e o endotélio para posterior disseminação.

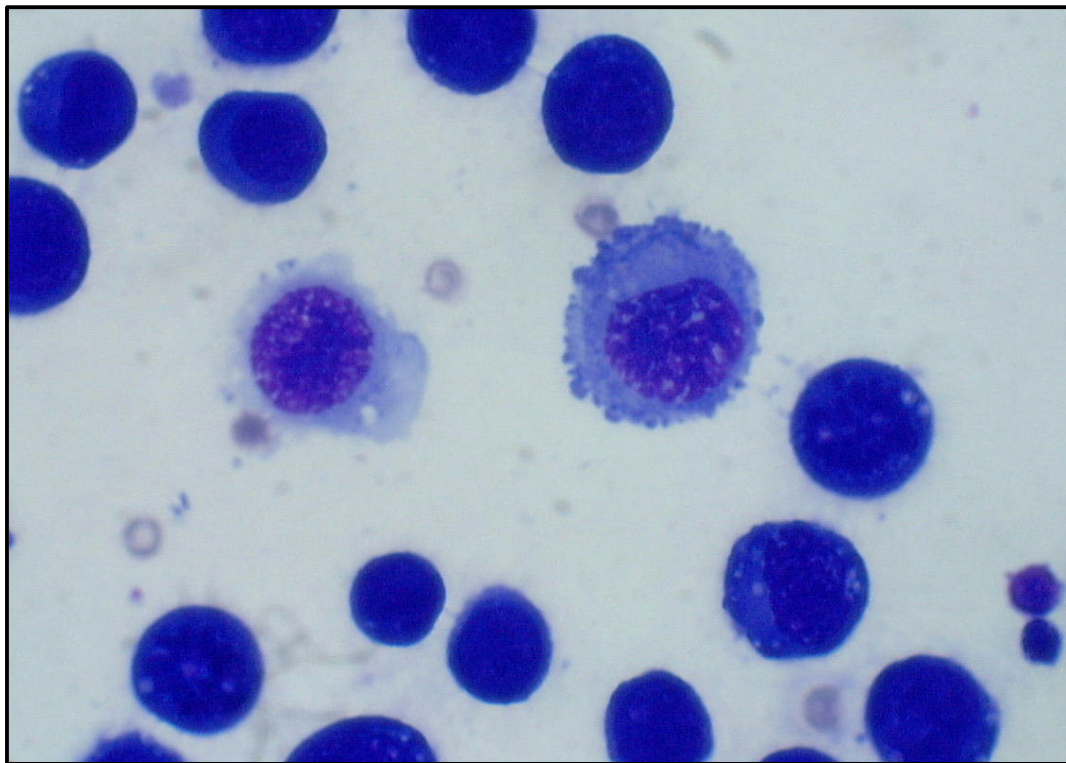
Diferenças na sialização da superfície de células neoplásicas têm sido relacionadas com o potencial metastático de certas neoplasias humanas e experimentais, por favorecer a adesão a componentes da matriz extracelular (SONG et al., 1993; RIZZO, 2000).

A resposta inflamatória, local ou sistêmica não é o achado predominante neste tipo de neoplasia. Assim, o líquido ascítico dos animais portadores deste tumor não foi capaz de estimular as células endoteliais possivelmente por não apresentarem citocinas necessárias ao

estímulo. A este respeito, Gentile (2001) cita que após implante intraperitoneal do TAE, não houve estímulo de macrófagos peritoneais em nenhum dos tempos por ela estudados, e que os níveis de TNF- $\alpha$  não foram significativos. Nesse mesmo sentido, Belik (2003) ressalta que o TNF- $\alpha$  produzido por macrófagos é considerado um mediador-chave da inflamação como resposta do hospedeiro a injúrias, invasão por microrganismos, parasitas e principalmente em neoplasias. A presença desta citocina em altas concentrações inibe a angiogênese e estimula o crescimento tumoral em níveis baixos.

Já que o tumor de Ehrlich não é capaz de desencadear uma resposta inflamatória efetiva, pode-se inferir que talvez este seja um mecanismo de escape tumoral, o que estaria relacionado não só com a perda na expressão de MHC de classe I, dificultando assim, o reconhecimento pelos CTLs como também na produção de IL-6, que é uma interleucina ativadora de resposta humoral porém, não efetiva contra tumores ao contrário do que acontece quando ocorre a produção de citocinas como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (ABBAS et al., 2003).

Os CTLs podem exercer um papel importante nas respostas imunes antitumorais. As citocinas secretadas por células T específicas para antígenos tumorais são TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que podem aumentar a expressão do MHC de classe I nas células tumorais e a sensibilidade para a lise pelos CTLs. A citocina IFN- $\gamma$  também pode ativar os macrófagos para lisar células tumorais (ABBAS et al., 2003).

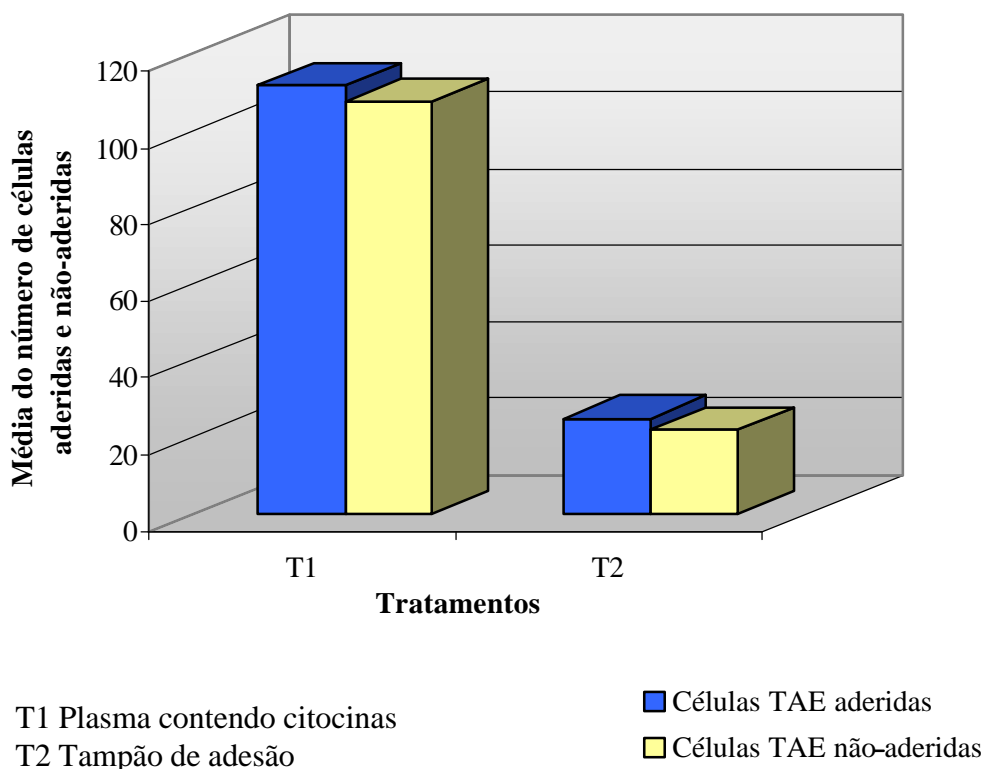


**Figura 16.** Esfregaço de líquido ascítico mostrando células do tumor ascítico de Ehrlich. Instant Prov. 1000x.

#### 5.4. ADESÃO DE CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich EM CÉLULAS ENDOTELIAIS (BUVEC'S)

Os testes de adesão de células do tumor ascítico de Ehrlich em BUVEC's, previamente tratadas conforme item 4.9 (Tabela 2), mostraram que a maior adesão ocorre com as células estimuladas com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias, não se observando diferença quanto ao número de células aderidas e não-aderidas em função do tipo de tratamento utilizado (Figura 17). Este resultado confirma mais uma vez que a inflamação não é um fator preponderante em camundongos BALB/c durante a progressão tumoral, concordando com Fecchio et al. (1990); Rizzo (2000); Gentile (2001); Belik (2003).

Para confirmar a presença da molécula de adesão E-selectina nas células endoteliais (BUVEC's), estas células foram previamente estimuladas com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias (Figura 18), mostrando que houve imunomarcagem.



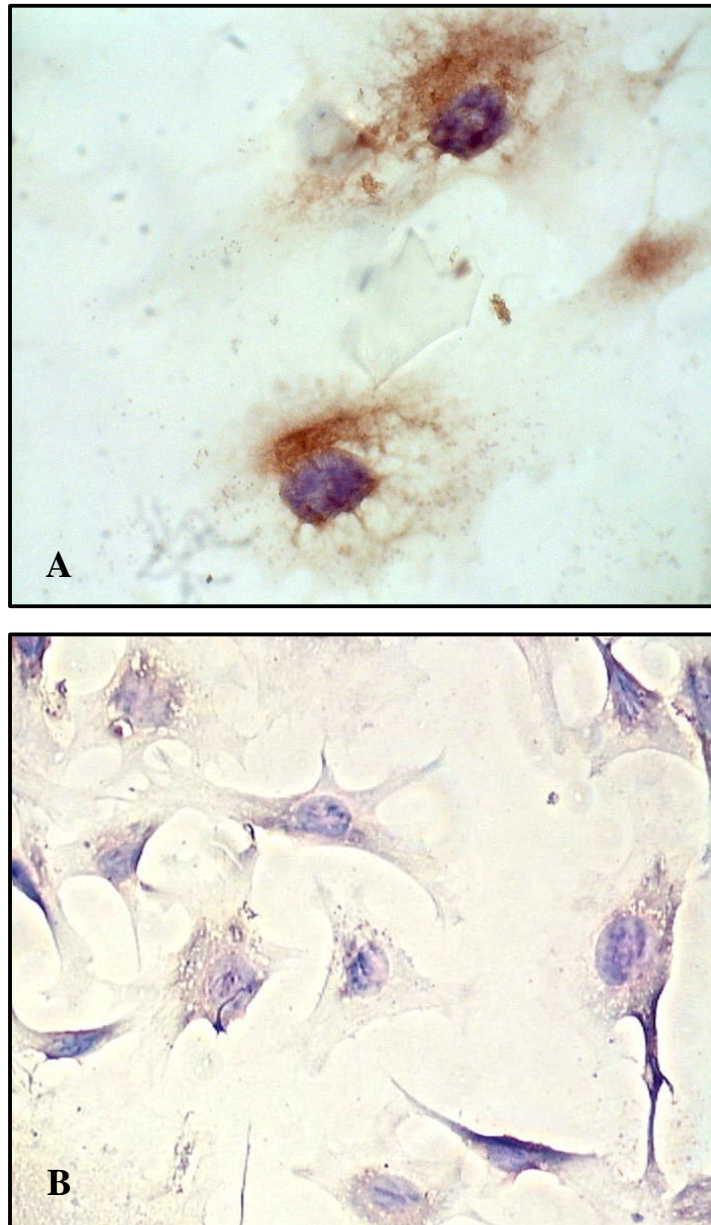
**Figura 17.** Número médio de células do tumor ascítico de Ehrlich aderidas em 100 células endoteliais.

Os testes de adesão em células endoteliais mostraram que há ligação entre receptores presentes nas células do tumor ascítico de Ehrlich e a molécula de adesão E-selectina presente nas células endoteliais (Figura 19), principalmente quando se utilizou plasma contendo citocinas pró-inflamatórias. Este evento está relacionado ao fato de que o plasma utilizado expressava intensos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (SANABRIA, 2002). Em contraste, Gentile (2001) detectou no líquido ascítico de animais inoculados com tumor de Ehrlich, a liberação de IL-2 no 13<sup>o</sup> dia de evolução tumoral e IL-6 a partir do 10<sup>o</sup> dia. Níveis de outras citocinas, como IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$ , não foram alterados significativamente pelo crescimento tumoral, corroborando mais uma vez que no líquido ascítico não havia níveis significativos dessas citocinas. Ainda, segundo Kannagi et al. (2004), indivíduos normais apresentam no soro aproximadamente 35 ng/mL de E-selectina, sendo que estes níveis flutuam em condições variadas, como no caso de estímulos inflamatórios, com presença de citocinas do tipo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ou 1 $\beta$ . Esses relatos poderiam justificar porquê não havia níveis significativos de citocinas pró-inflamatórias no líquido ascítico, pois como já descrito, este tumor não induz uma resposta inflamatória sistêmica significativa.

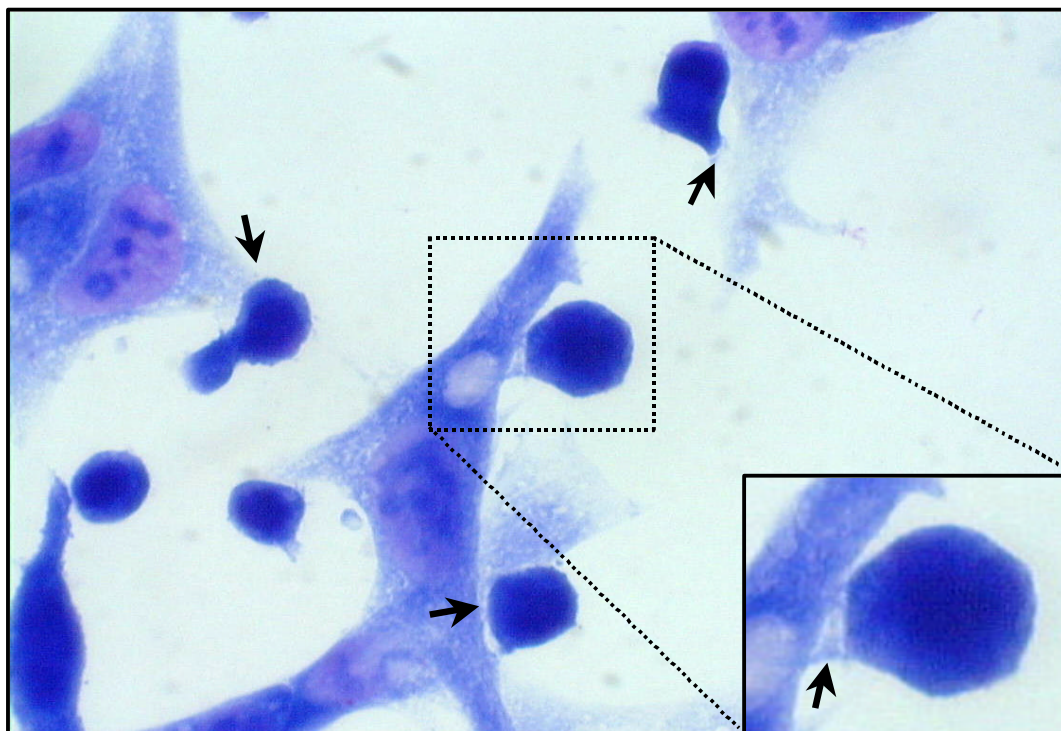
Estudos demonstram que sialyl Lewis<sup>x/a</sup> é o ligante para E-selectina e possui um importante papel na metástase tumoral (MATSUURA et al., 1997; KIJIMA et al., 2003), significando então que a adesão de células neoplásicas ao endotélio vascular requer a presença de E-selectina endotelial bem como de ligantes de carboidratos sobre a superfície de células cancerosas. Isto pode explicar porque ao se utilizar o anticorpo policlonal mono específico contra E-selectina houve imunomarcagem nas células do TAE indicando que há uma afinidade entre os receptores presente nas células do tumor e a E-selectina presente nas células endoteliais. Assim, os resultados dos testes de adesão demonstram que as células do tumor ascítico de Ehrlich que foram utilizadas no presente estudo, possivelmente apresentam o ligante sialyl Lewis. Por outro lado, Mostafapour & Goldstein (1993) e Roth et al. (1994) demonstraram que na superfície da membrana de três variantes de células do tumor ascítico de Ehrlich havia aumento da atividade de sialyltransferase e produtos como ácido siálico, que estão diretamente envolvidos com câncer, metástases e interação célula-célula. Ainda a este respeito, Mostafapour & Goldstein (1993) demonstraram que a incorporação do ácido siálico dentro de glicoconjugados é catalisada por um nível alto de sialyltransferase específico.

A evolução simultânea dos níveis de E-selectina e sialyl Lewis<sup>x/a</sup> na superfície de células neoplásicas constituem um fator de risco para metástase hematogênica e para o

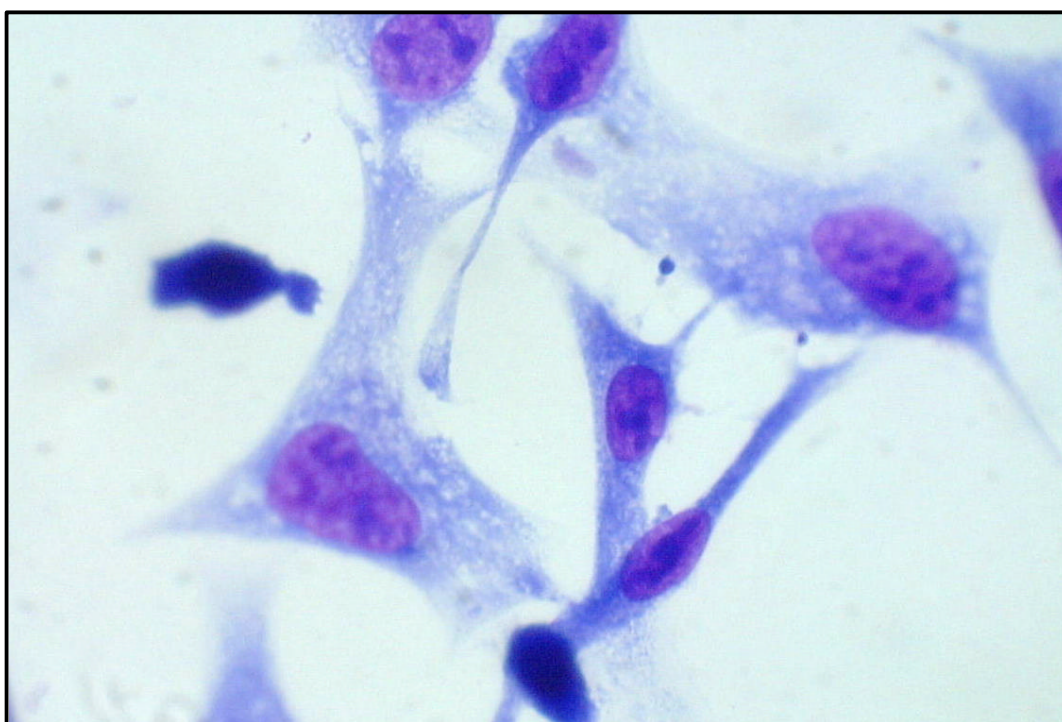
prognóstico pós-operatório (KANNAGI et al., 2004). Segundo Abbas et al. (2003), a maioria dos tumores humanos e experimentais expressa glicoproteínas ou glicolípídeos de superfície em níveis mais altos do que os normais e/ou em formas anormais, que podem servir de marcadores diagnósticos e de alvos para terapias.



**Figura 18.** Controle positivo de células BUVEC's estimuladas com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias, mostrando imunomarcção pelo anticorpo anti E-selectina (A) e controle negativo sem estímulo, mostrando ausência de imunomarcção (B). Ipx. 1000x.



**Figura 19.** Teste de adesão de células do tumor ascítico de Ehrlich em células endoteliais (BUVEC's) estimuladas com plasma contendo citocinas inflamatórias. As setas indicam a adesão. Instant Prov. 1000x.



**Figura 20.** Teste de adesão de células do tumor ascítico de Ehrlich em células endoteliais (BUVEC's) sem estímulo mostrando ausência de adesão. Instant Prov. 1000x.

## 6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente trabalho, pôde-se concluir que:

- Macroscopicamente não houve formação de nódulos neoplásicos em fígado, baço ou pulmão;
- A inoculação de células do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos BALB/c por via intravenosa, intramuscular e coxim plantar constitui um modelo eficiente para o estudo da migração destas células e formação de metástases;
- As metástases nos linfonodos poplíteo e inguinal dos animais inoculados por via intramuscular e no coxim plantar se deram preferencialmente por via linfática;
- A inoculação intravenosa induziu colonização em linfonodos inguinais e braquiais, caracterizando a via hematogênica;
- O comportamento celular *in vitro* mostrou um elevado grau de pleomorfismo celular com presença de dois tipos celulares que crescem de maneira diferenciada: células que aderem ao substrato e células em suspensão;
- A adesão das células do tumor de Ehrlich em células endoteliais (BUVEC's) estimuladas com plasma contendo citocinas pró-inflamatórias comprovam a presença de receptores de carboidratos na superfície destas células;
- Não houve expressão da molécula de adesão E-selectina em amostras de fígado, pulmão, baço e linfonodos de animais inoculados por via intravenosa com o tumor ascítico de Ehrlich, indicando que nos períodos estudados (15 e 30 dias) esta molécula não é a principal responsável pelo processo de disseminação.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Pela grande facilidade de transplantação, padronização e rápido crescimento do tumor ascítico de Ehrlich, este modelo favorece o estudo de outras moléculas de adesão, como por exemplo, as caderinas.
- Pela presença de dois tipos celulares numa mesma linhagem de células tumorais, seria importante separar as células para análise da curva de crescimento.
- Como o tumor ascítico de Ehrlich não desencadeia grandes reações inflamatórias, seria de fundamental importância estudar em que fase da progressão tumoral este processo acontece, e se os mecanismos de defesa contra este tumor são do tipo humoral ou celular.
- A disseminação pela via hematogênica desencadeou um processo de hematopoiese extramedular no fígado e baço. Assim, seria de grande importância entender os mecanismos que desencadeiam este processo, além da utilização de marcadores de células mielóides para testes imunohistoquímicos.
- Utilizar tratamentos com substâncias que induzam processos inflamatórios e analisar o comportamento da E-selectina e de outra moléculas.
- O estudo de tipos de carboidratos presentes na superfície da membrana das células do tumor ascítico de Ehrlich pode evidenciar se estão envolvidas no mecanismo de evasão pelo sistema imune.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4<sup>a</sup> ed. Revinter. p.115-121. 2003.

ADAM, J.K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Imune responses in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, In press, 2003.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, p. 963-1006.

ALEXIOU, D.; KARAYIANNAKIS A.J.; SYRIGOS, K.N.; ZBAR, A.; SEKARA E.; MICHAIL, P.; ROSENBERG, T.; DIAMANTIS, T. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 2, p. 478-485, 2003.

AMARAL, F. **Caracterização de isoformas da desmogleína em diferentes linhagens celulares**. Viçosa, MG. 1999. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

AMSTALDEN, E.M.I. Metástases ósseas abordagem diagnóstica. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA**. 24, 2003, CD-ROM. Tumores ósseos.

ANDREEFF, M.; GOODRICH, D.W.; PARDEE, A.B. Cancer biology: cell proliferation, differentiation, and apoptosis. In: BAST, R.C.; KUFEL, D.W.; POLLOCK, R.E.; WEICHSELBAUM, R.R.; HOLLAND, J.F.; FREI, E.; GANSIER, T.S. **Cancer Medicine**. 5<sup>th</sup> ed. Canada: BC Decker Inc., 2000. www.pubmed.com. Acesso 08/06/04.

BALKWILL, F.; MONTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**. v. 357, n. 17, p.539-345, 2001.

BELIK, A.V.F. **Ação da fração polissacáridica de *Agaricus blazei* sobre o desenvolvimento tumoral, atividade linfoproliferativa, e a produção de citocinas por esplenócitos de camundongos com tumor subcutâneo de Ehrlich**. Botucatu, 2003, 63p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista.

BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.

BOGLIOLO, L.; PEREIRA, F.E.L.; GUIMARÃES, R.C. Transtornos do crescimento e da diferenciação celular II. Neoplasias (Tumores). In: LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; RASO, P; TAFURI, W.L. **Bogliolo Patologia**. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p. 180-205.

BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R.C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: \_\_\_\_\_. **Patologia Geral**. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. p. 148-192.

BRAYTON, J.; QING, Z.; HART, M.N.; VANGILDER, J.C.; FABRY, Z. Influence of adhesion molecule expression by human brain microvessel endothelium on cancer cell adhesion. **Journal of Neuroimmunology**, v. 89, p. 104-112, 1998.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Microbiologia Médica**. 21<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. p. 435-453.

CASSALI, G.D. **Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana.** Belo Horizonte, 2000. 73p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and ig-CAMs in cancer. **Nature**, v. 4, p. 118-132, 2004.

CNAMBERS, A.F.; GROOM, A.C.; MACDONALD, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews**, v. 2, p. 563-572, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional.** 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 233-293.

CROSS, S.S.; BURY, J.P. Molecular biology in diagnostic histopathology: part II – cell adhesion molecules. **Current Diagnostic Pathology**, v. 9, p. 313-321, 2003.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental.** São Paulo, 1989. 148p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.

DONENKI, F.V.; SITDIKOVA, S.M.; KABIEVA, A.O.; MOROZ, L.V. The characteristics of Ehrlich carcinoma recurrence and metastasis. **Biulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny**, v. 114, n. 12, p. 652-654, 1992.

DUKE, R.C.; OJCIUS, D.M.; YOUNG, J.D. Cell suicide in health and disease. **Scientific American**, v. 275, n. 6, p. 80-87, 1996.

FECCHIO, D.; RUSSO, M.; SIROIS, P.; BRAQUET, P.; JNACAR, S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor *in vivo* by PAF-antagonists. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 57-65, 1990.

FIDLER, I.J. Critical determinants of metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 12, p. 89-96, 2002.

FOLKMAN, J. Angiogenesis and apoptosis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 13, p.159-167, 2003.

FOLKMAN, J. The vascularization of tumor. **Scientific American**, v. 234, p. 59-73. 1976.

GENTILE, L.B. **Modulação por PGE<sub>2</sub> no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE)**. São Paulo, 2001. 124 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista.

GIBBS, W.W. Desvendando as raízes do câncer. **Scientific American**, v. 2, n. 15, p. 39-47, 2003.

GUERRA, J.L. **Aspecto do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de Ehrlich**. São Paulo, 1983. 79p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

HARNDEN D.G.; MCGEE, J.O'D. Neoplasia. In: MCGEE, J.O'D.; ISAACSON, P.G.; WRIGHT, N.A. **Oxford Textbook of Pathology**, Oxford University Press, v. 1, p. 571-717, 1992.

HART, I.R. Immune profile in metastasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 1, p. 900-903, 1989.

HAUSBERGER, R.; DE BEM, R.S.; ALENCAR, B.L.F.; PEDROSO, M.L.A.; BOARETTI, A.C.; MESSIAS-REASON, I.J.T. Comportamento do sistema complemento no líquido ascítico de diferentes etiologias. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, n. 3, p.187-196, 2001.

HENRICKS, P.A.J.; NIJKAMP, F.P. Pharmacological modulation of cell adhesion molecules. **European Journal of Pharmacology**, v. 344, p. 1-13, 1998.

JORD, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J.; WHITE, R.L. **Genética Médica**. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.197-212.

KANNAGI, R.; IZAWA, M.; KOIKE, T.; MIYAZAKI, K.; KIMURA, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. **Cancer Sciences**, v. 95, n. 5, p.377-384, 2004.

KEELY, P.; PARISE, L.; JULIANO, R. Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 3, p. 101-106, 1998.

KIJIMA, H.; UEYAMA, Y.; OSAMURA, Y. Histopathology and tumor markers. **Rinsho Byori Japanese Journal of Clinical Pathology**, v. 51, n. 12, p. 1203-1215, 2003.

KOHN, E.C. Invasion and metastasis: biology and clinical potential. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 52, n. 2, p. 235-244, 1991.

KUSMARTSEV, S.; RUIZ DE MORALES, J.M.G.; RULLAS, J.; DANILETS, M.G.; SUBIZA, J.L. Sialoadhesin expression by bone marrow macrophages derived from Ehrlich-tumor-bearing mice. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 48, p. 493-498, 1999.

LIOTTA, L.A. Cancer cell invasion and metastasis. **Scientific American**, v. 266, n. 2, p. 54-63, 1992.

LIOTTA, L.A.; KOHW, E.C. Cancer biology: invasion and metastases. In: BAST, R.C.; KUFEL, D.W.; POLLOCK, R.E.; WEICHSELBAUM, R.R.; HOLLAND, J.F.; FREI, E.; GANSIER, T.S. **Cancer Medicine**. 5 th ed. Canada: BC Decker Inc, 2000. [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com). Acesso 24/11/04.

MACKAY, C.R.; IMHOF, B.A. Cell adhesion in the immune system. **Immunology Today**, v. 14, n. 3, p. 99-102, 1993.

MATSUURA, N.; NARITA, T.; MITSUOKA, C.; KIMURA, N.; KANNAGI, R.; IMAI, T.; FUNAHASHI, H.; TAKAGI, H. Increased level of circulating adhesion molecules in the sera of breast cancer patient with distant metastases. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 3, p. 135-139, 1997.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.S.; GÓRNIAK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life Sciences**, v. 74, p. 573–579, 2004.

MEDINA, M.; VELEZ, D.; ASENJO, J.A.; EGEA, G.; REAL, F.X.; GIL, J.; SUBIZA, J.L. Human colon adenocarcinomas express a MUC1-associated novel carbohydrate epitope on core mucin glycans defined by a monoclonal antibody (A10) raised against murine Ehrlich tumor cells. **Cancer Research**, v. 59, p. 1061-1070, 1999.

MOSTAFAPOUR, M.K.; GOLDSTEIN, I.J. Cultured Ehrlich Ascites Tumor cells show increased N-linked  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 255-259, 1993.

NAIK, R.; BALIGA, P.; BANSAL, R.; PAI, M. Distribution of mast cells in the axillary lymph nodes of breast cancer patients. **Journal of Indian Medical Association**, v. 92, n. 12, p. 600-607, 1997.

PODOLSKY, D.K.; WEISER, M.M.; LA MONT, T.; ISSELBACHER, K.J. Galactosyltransferase and concanavalin A agglutination of cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, n. 3. p. 904-908, 1974.

RITTENHOUSE H.G.; BENIAN, G.M.; RITTENHOUSE, J.W.; HANSEN, E.R.; BOYD, L.E. Heterogeneity of concanavalin A receptors on Ehrlich tumor cells. **Progress Clinical Biology Research**, v. 9, p. 203-213, 1976.

RIZZO, M.S. **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de ehrlich em camundongos**. São Paulo, 2000. 100p. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.

ROOS, E. Cellular adhesion, invasion and metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 738, p. 263-284, 1984.

ROSOL, T.J.; TANNEHILL-GREGG, S.H.; LEROY, B.E.; CONTAG, C.H. Animal models of bone metastasis. **Cancer Supplement**, v. 97, n. 3 p.748-756, 2003.

ROTH, J.; LI, W.P.; KNIBBS, R.N.; MACCALLUM, D.K.; SONG, Z; GOLDSTEIN. Differential expression of cell surface sialoglycoconjugates on wild-type and cultured Ehrlich tumor cells as revealed by quantitative lectin-gold ultrastructural cytochemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 11353-11357, 1994.

RUIZ DE MORALES, J.; VELEZ, D.; SUBIZA, J.L. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 12, p. 1757-67, 1999.

SAAD-HOSSNE, R.S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelhos. Implantação do modelo no Brasil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 208-210, 2002.

SAAD-HOSSNE, R.S; SAAD-HOSSNE W.; PRADO, R.G. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. Estudo experimental in vitro. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 54-58, 2004.

SANABRIA, M.X.H. **Fisiopatologia da *Babesia bovis*: moléculas de adesão expressadas em células endoteliais (ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectina e trombospondina)**. Viçosa, MG: UFV. 2002. 97 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.

SANTOS, A.R.; CARVALHO, H.F. Biomembranas. In: CARVALHO, H.F; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula**. 1<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Monole. 2001. p. 39-56.

SID, B; SARTELET, H.; BELLON, G.; EL BTAOURI, H.; RATH, G.; DELORME, N.; HAYE, B.; MARTINY, L. Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 48, p. 245-258, 2004.

SONG, Z.; VARANI, J. GOLDSTEIN, I.J. Expression in the surface carbohydrates, and in laminin and fibronectin synthesis, between adherent and non-adherent Ehrlich ascites tumor cells. **International Journal Cancer**, v. 55, p. 1029-1035, 1993.

SUBIZA, L.L.; COLL, J.; ALVAREZ, R.; VALDIVIESO, M.; DE LA CONCHA, E.G. IgM response and resistance to ascites tumor growth. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.25, n. 2, p. 87-92, 1987.

TANAKA, K.; SONOO, H.; KUREBAYASHI, J.; NOMURA, T.; OHKUBO, S.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, S. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1125-1131, 2002.

THIERY, J. P. Cell adhesion in cancer. **Comptes Rendus Physique**, v. 4, p. 289-304, 2003.

THORESEN, S.; TANGEN, M.; HARTVEIT, F. Mast cell in the axillary nodes of breast cancer patients. **Diagnostic Histopathology**, v. 5, n. 1, p. 65-67, 1982.

UGORSKI, M.; LASKOWSKA, A. Sialyl Lewis<sup>a</sup>: a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, n. 2, p.303-311, 2002.

VAN KEMPEN, L.C.L.; COUSSENS, L.M. MMP9 potentiates pulmonary metastasis formation. **Cancer Cell**, v. 2, n. 4, p. 251-252, 2002.

WANG, T. N.; QIAN, X-H; GRANICK, M. S.; SOLOMON, M. P.; ROTHMAN, V. L.; BERGER, D. H.; TUSZYNSKI, G. P. Thrombospondin-1 (TSP-1) promotes the invasive properties of human breast cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 63, p. 39-43, 1996.

WEINBERG, R.A. How cancer arises. **Scientific American**, v. 275, n. 3, p. 62-70, 1996.

## ANEXO

### PROTOCOLOS PARA PREPARO DE SOLUÇÕES

#### ▪ AZUL DE TRIPANO 4%

Azul de tripano	0,20 g
PBS	50,00 mL
Ajustar pH para 7,4	

#### ▪ FORMOL TAMPONADO 10%

Formalina 37 – 40%	100,00 mL
Fosfato de sódio monobásico	4,00 g
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	6,50 g
Água deionizada	900,00 mL

#### ▪ MEIO DE CULTURA

Meio de cultura RPMI 1640	10,40 g
Bicarbonato de sódio	2,00 g
Água destilada	1000,00 mL
Ajustar pH para 7,4 e filtrar.	

▪ **TAMPÃO DE ADESÃO**

Meio de cultura RPMI 1640	100 mL
Albumina sérica bovina 1% (BSA)	1 g
HEPES 0,5 M	5 mL
Ajustar pH 7,4 e filtrar.	

▪ **GLUTAMINA**

Glutamina	2,92 g
Água deionizada	100,00 mL
Filtrar.	

▪ **SOLUÇÃO DE ANTIBIÓTICO-ANTIMICÓTICO (SIGMAÒ)**

Cada 1 mL da solução contém:	10 U penicilina
	10 µg streptomina
	0,025 µg anfotericina B

Obs: Para a composição do meio completo a cada 87,0 mL de meio de cultura é adicionado 1,0 mL de solução de antibióticos; 1,0 mL de glutamina (2 mM) e 10,0 mL de SFB.

▪ **PARAFORMALDEÍDO 4%**

Paraformaldeído	4,00 g
Tampão fosfato 0,1 M	100,00 mL
Ajustar pH para 7,0	

▪ **PBS-GLICINA 0,1 M**

Glicina	3,50 g
PBS	200,00 mL

▪ **SOLUÇÃO DE TRIPSINA**

Tripsina	0,25 g
Fosfato de sódio	0,71 g
Cloreto de sódio	0,90 g
EDTA	0,05 g
Água deionizada	100,00 mL
Ajustar pH para 7,4	

▪ **SOLUÇÃO DE PBS**

$2\text{H}_2\text{PO}_4$	0,144 g
NaCl	9,00 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,795 g
Água deionizada	1000,00 mL
Ajustar pH para 7,2	

▪ **TAMPÃO LISE DE HEMÁCIAS**

$\text{NH}_3\text{Cl}$	4,145 g
$\text{KHCO}_3$	0,50 g
EDTA	0,01860 g
Água deionizada	500,00 mL

▪ **HEMATOXILINA DE HARRIS**

Hematoxilina	5,00 g
Álcool etílico absoluto	50,00 mL
Sulfato de alumínio e potássio	100,00 g
Óxido de mercúrio	2,50 g
Água destilada	1000,00 mL

▪ **EOSINA**

Eosina Y	5,00 g
Dicromato de potássio	2,50 g
Ácido pícrico aquoso saturado 1 a 1,5%	50,00 mL
Álcool etílico absoluto	50,00 mL
Água destilada	400,00 mL