

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

MARIA ANGÉLICA OLIVEIRA MENDONÇA

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA REDUÇÃO DA FUNÇÃO QUIMIOTÁTICA  
DE NEUTRÓFILOS APÓS QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM CÂNCER  
DE MAMA.**

UBERABA

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA ANGÉLICA OLIVEIRA MENDONÇA

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA REDUÇÃO DA FUNÇÃO QUIMIOTÁTICA  
DE NEUTRÓFILOS APÓS QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM CÂNCER  
DE MAMA.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Patologia Clínica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Beatriz Martins  
Tavares Murta

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando  
Candido Murta

Uberaba - MG

2009

Catálogo na fonte por Rachel Ines da Silva  
Bibliotecária - CRB6/2381 - UFTM

M496m Mendonça, Maria Angélica Oliveira.  
Mecanismos envolvidos na redução da migração de neutrófilos após quimioterapia em pacientes com câncer de mama / Maria Angélica Oliveira Mendonça. -- 2009.  
103f.: tab.; graf.; fig.

Tese de Doutorado em Ciências, área Patologia Clínica - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, 2009. Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta.

1. CÂNCER DE MAMA. 2. QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS. 3. QUIMIOTERAPIA. 4. ÓXIDO NÍTRICO. 5. VIAS DE SINALIZAÇÃO. I. Título. II. Tavares-Murta, Beatriz Martins.

CDU 618.19 - 006

## **APOIO FINANCEIRO**

- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)

## **LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA**

- Ambulatório de Mastologia da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Escola da UFTM
- Laboratório da Disciplina de Farmacologia do Departamento de Ciências Biológicas da UFTM
- Laboratório do Instituto de Pesquisa em Oncologia/IPON da UFTM
- Laboratório da Disciplina de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da UFTM
- Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP

## **DESENVOLVIMENTO TÉCNICO**

- Maria Angélica Oliveira Mendonça
- Eddie Fernando Candido Murta
- Douglas Côbo Micheli
- Januário Barbosa dos Santos Junior
- Beatriz Cibele Rezende Gerolin
- Fabrício Oliveira Souto
- José Carlos Alves Filho
- Lucio Roberto Castejon Castellano

**Maria Angélica Oliveira Mendonça**

**Mecanismos envolvidos na redução da função quimiotática de neutrófilos após  
quimioterapia em pacientes com câncer de mama.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Patologia Clínica.

Uberaba, 06 de março de 2009

Banca Examinadora

Profa. Dra. BEATRIZ MARTINS TAVARES MURTA  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM/Uberaba

Profa. Dra. ROSEKEILA SIMÕES NOMELINI  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM/Uberaba

Profa. Dra. SHEILA JORGE ADAD  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM/Uberaba

Prof. Dr. HÉLIO ANGOTTI CARRARA  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP/Ribeirão Preto

Profa. Dra. ANDRÉIA MACHADO LEOPOLDINO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP/ Ribeirão Preto

Dedico este trabalho a uma jovem mulher  
que sofreu as mazelas de um câncer incurável.

Mesmo consciente de sua realidade,  
acreditou e sucumbiu a todas as condutas  
médicas propostas para seu tratamento -  
quimioterapia, cirurgia, radioterapia. Enfim,  
tudo o que era possível.

Foi uma batalha cruel e desigual.

Não sei dizer se minha irmã sofreu mais  
pelo medo da morte, pela doença ou pelos  
efeitos da quimioterapia...

O que sei é que foi um exemplo de  
paciência, resignação e, sobretudo, esperança. À  
semelhança da maioria das pacientes que  
acompanhei durante a execução deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que me ajudaram a concluir este trabalho.

Meus sinceros agradecimentos...

...à minha família, razão de minha vida;  
...às pacientes, pois sem seu consentimento nada  
teria sido possível;  
...aos professores Beatriz Tavares Murta e Eddie  
Murta, pela orientação, pelo conhecimento,  
aprendizagem e paciência diante de minhas  
limitações;  
...aos amigos Januário, Douglas e Bia, pelo apoio,  
incentivo e, especialmente, pela amizade e confiança;  
...ao médico residente em Mastologia Paulo Cesar,  
pela colaboração durante a seleção e inclusão das  
pacientes no estudo;  
...às técnicas de enfermagem Guará e Juliana, pelo  
auxílio na coleta de sangue e pelo carinho;  
...ao colega Fabrício Souto, pelo acolhimento e  
auxílio na execução da imunocitoquímica;  
...aos professores André Pedrosa, Karina Ferrazzoli e  
Paulo Maluf, pelas valiosas sugestões feitas durante  
a qualificação;  
... às minhas mais novas amigas Patrícia e Anna  
Cláudia, pelo carinho, atenção, companheirismo e  
dedicação.

## RESUMO

A quimioterapia pode alterar funções de neutrófilos, mesmo após o período de recuperação da aplasia medular, acarretando aumento na incidência e/ou gravidade de infecções. O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis mecanismos envolvidos na redução da migração de neutrófilos após tratamento quimioterápico (QT) em pacientes com câncer de mama. Foram avaliadas 35 mulheres com câncer de mama em estádios II a IV (*Committee of the International Union against Cancer*) e 17 mulheres saudáveis como controles. Sangue venoso periférico foi coletado no momento do diagnóstico e depois (21 dias após o término do 3º ou 4º ciclo) do tratamento quimioterápico contendo antraciclinas, para purificação de neutrófilos e obtenção do soro. Neutrófilos de controles foram incubados com soro de pacientes tratadas com QT e a migração de neutrófilos foi avaliada em microcâmara de quimiotaxia, em resposta aos quimioatraentes ( $10^{-7}M$ ) fMLP,  $LTB_4$  e IL-8. O soro obtido de pacientes reduziu a migração de neutrófilos normais de forma dose-dependente, em resposta aos estímulos quimioatraentes, comparado aos neutrófilos controles incubados com maior concentração de soro heterólogo normal. Os níveis de metabólitos de óxido nítrico (NO, Reação de Griess) e das citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  (ELISA) foram quantificados no soro de 22 pacientes e 17 controles. Concentrações aumentadas de IL-8 foram encontradas em pacientes comparado ao grupo controle, mas os níveis das citocinas não foram alterados significativamente comparando pacientes antes e após quimioterapia. Por outro lado, a produção de NO, parcialmente produzido pelas células mononucleares, foi significativamente aumentada após a QT comparado ao pré-QT. Neutrófilos obtidos de 13 pacientes e 12 controles foram avaliados quanto à expressão de receptores CXCR1 e CXCR2, CD11b (citometria de fluxo) e polimerização da actina (microscopia de fluorescência). A expressão de ambos receptores CXCRs foi reduzida em pacientes no momento do diagnóstico, comparado aos controles, sendo este efeito mantido após tratamento. Também em pacientes, a polimerização de actina foi reduzida após a quimioterapia comparado ao pré tratamento. Em conclusão, em pacientes tratadas com QT foi observada associação entre o efeito inibitório do soro sobre a migração de neutrófilos, aumento da produção de NO e redução da polimerização dos filamentos de actina.

**Palavras-chave:** Câncer de Mama. Quimiotaxia de Neutrófilos. Quimioterapia. Óxido Nítrico. Vias de Sinalização.

## ABSTRACT

Chemotherapy may alter neutrophil function, even after recovery of bone marrow aplasia, and favor an increase in the incidence and/or severity of infection episodes. The aim of this study was to investigate possible mechanisms involved in the reduction of neutrophil migration after chemotherapy (CHT) in breast cancer patients. Thirty five breast cancer women at disease stage II to IV (Committee of the International Union against Cancer) and 17 healthy women (control group) were evaluated. Peripheral venous blood was collected on diagnosis and after (21 days after the 3<sup>rd</sup> or 4<sup>th</sup> cycles) anthracycline-based chemotherapy, for neutrophil purification and obtention of serum. Control neutrophils (n=5) were incubated with serum of patients treated with CHT (n=8) and neutrophil migration was assayed in a microchemotaxis chamber in response to the chemoattractants ( $10^{-7}$  M) fMLP, LTB<sub>4</sub> and IL-8. The serum obtained from patients reduced the migration of control neutrophils in a dose-dependent way, in response to the chemotactic stimuli, compared to control neutrophils incubated with the highest concentration of normal heterologous serum. The levels of nitric oxide (NO) metabolites (Griess reaction) and the cytokines IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  (ELISA) were quantified in sera of 22 patients and 17 controls. Increased IL-8 concentrations were found in patients than controls, but cytokine levels were not significantly altered comparing patients before and after CHT. But the NO production, at least partially provided by mononuclear cells, was significantly increased after CHT than before treatment. Purified neutrophils obtained from 13 patients and 12 controls were evaluated for the expression of the receptors CXCR1 and CXCR2, CD11b (flow cytometry) and actin polymerization (fluorescence microscopy). The expression of both CXCRs was reduced in patients upon diagnosis, compared to controls, being this effect maintained after CHT. Also in patients, actin polymerization was reduced after CHT compared to pretreatment. In conclusion, in patients treated with chemotherapy it was observed association among the inhibitory effect of serum on neutrophil migration, augmented NO production and reduction in the polymerization of actin filaments.

Keywords: Breast cancer. Neutrophil migration. Chemotherapy. Nitric oxide. Signaling pathways.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AC</b>	adriamicina, ciclofosfamida
<b>AG</b>	aminoguanidina
<b>AGP</b>	$\alpha$ -1 glicoproteína ácida
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>BSA</b>	soro albumina bovina
<b>C5a</b>	quinto fragmento do sistema complemento ativado
<b>CAM</b>	molécula de adesão celular
<b>CLP</b>	ligadura e perfuração do ceco
<b>PECy5</b>	ficoeritrina – Cianina 5.1
<b>CMF</b>	ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracil
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>CXCR</b>	receptores de quimiocinas CXC
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>EC</b>	epirrubicina e ciclofosfamida
<b>ENA</b>	peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais
<b>EPM</b>	erro padrão da média
<b>FAC</b>	fluorouracil-adriamicina-ciclofosfamida
<b>FAD</b>	flavina adenina dinucleotídeo
<b>FEC</b>	fluorouracil-epirrubicina-ciclofosfamida
<b>FICT</b>	fluorocromo de isotiocianato de fluorosceína
<b>fMLP</b>	formil-metil-leucil-fenilalanina
<b>UFTM</b>	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
<b>G-CSF</b>	fator estimulador de colônias de granulócitos
<b>GM-CSF</b>	fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
<b>GPCR</b>	receptores acoplados a proteína G
<b>GDP</b>	guanosina difosfato
<b>GRO</b>	oncogenes reguladores do crescimento
<b>GTP</b>	guanosina trifosfato
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana

<b>ICAM</b>	molécula de adesão intercelular
<b>IMF</b>	intensidade média de fluorescência
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	interferon gama
<b>IL</b>	interleucina
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol trifosfato
<b>JAM</b>	moléculas de adesão juncional
<b>LFA-1</b>	antígeno associado à função de leucócitos
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>LTB<sub>4</sub></b>	leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>M</b>	molar
<b>MAC</b>	antígeno macrofágico
<b>MAPK</b>	proteína quinase ativada por mitógenos
<b>MCP</b>	proteína quimiotática de monócitos
<b>Mg</b>	miligramas
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitros
<b><math>\mu</math>L</b>	microlitros
<b>mM</b>	milimol
<b>MIP</b>	proteína inflamatória de macrófagos
<b>NADPH</b>	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NK</b>	célula exterminadora natural
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b>	nitrito
<b>NO<sub>3</sub></b>	nitrato
<b>NOS</b>	enzima sintase de óxido nítrico
<b>NOSc</b>	enzima sintase constitutiva de óxido nítrico
<b>eNOS</b>	enzima sintase de óxido nítrico endotelial
<b>iNOS</b>	enzima sintase de óxido nítrico induzida
<b>nNOS</b>	enzima sintase de óxido nítrico neuronal
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPD</b>	o-fenilenediamina dihidroclorato

<b>PAF</b>	fator de agregação plaquetária
<b>PBAAF</b>	punção para biópsia aspirativa por agulhamento fino
<b>PBS</b>	solução salina tamponada com fosfato
<b>PE</b>	fluorocromo ficoeritrina
<b>PECAM</b>	moléculas de adesão celular endotelial e plaquetária
<b>PF</b>	paraformaldeído
<b>PI3K</b>	fosfoinosítideo 3-quinase
<b>PKA</b>	proteína quinase A
<b>PKC</b>	proteína quinase C
<b>PIP3</b>	fosfatidilinositol-3-4-5-trifosfato
<b>PLC</b>	fosfolipase C
<b>QT</b>	quimioterapia
<b>RANTES</b>	quimiocina regulada sob ativação normalmente expressa e secretada por células T
<b>rh</b>	recombinante humano
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>TGF</b>	fator transformador do crescimento
<b>TGU</b>	trato genitourinário
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>TNM</b>	tamanho do tumor, nódulo axilar e metástase
<b>UI</b>	unidade internacional
<b>UICC</b>	<i>Committee of the International Union against Cancer</i>
<b>VCAM</b>	molécula de adesão da célula vascular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1. Câncer de mama .....	14
1.1.1. Incidência de câncer no Brasil e no mundo .....	14
1.1.2. Fatores de risco para o câncer de mama .....	16
1.1.3. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama .....	17
1.2. Resposta Inflamatória - migração dos neutrófilos circulantes .....	18
1.2.1. Inflamação - aspectos gerais .....	18
1.2.2. Migração dos neutrófilos circulantes até o sítio inflamatório .....	19
1.3. Fatores quimiotáticos envolvidos na migração dos neutrófilos - papel das quimiocinas .....	24
1.4. Motilidade de neutrófilos - vias de sinalização e participação dos filamentos de actina .....	26
1.5. Alterações de funções de neutrófilos em doenças/câncer - participação de mediadores .....	28
1.6. Quimioterapia antineoplásica - efeitos terapêuticos e tóxicos .....	30
<b>2. HIPÓTESE E OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1. Pacientes e controles.....	36
3.2. Tratamento quimioterápico .....	36
3.3. Coleta de Sangue .....	37
3.4. Obtenção e purificação de neutrófilos .....	38
3.5. Tratamento de neutrófilos normais com soro de pacientes .....	39
3.6. Ensaio de Quimiotaxia.....	39
3.7. Cultura de leucócitos .....	42
3.8. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas .....	42
3.9. Ensaio colorimétrico para quantificação de metabólitos de óxido nítrico .....	44
3.10. Citometria de fluxo para quantificação da expressão de receptores CXCR1, CXCR2 e CD11b em superfície de neutrófilos .....	44
3.11. Quantificação da polimerização de F-actina de neutrófilos .....	46

3.12. Análise estatística .....	47
3.13. Preparo de meios de cultura, soluções, reagentes e drogas .....	47
3.13.1. Meios de cultura, soluções e corantes utilizados para purificação de neutrófilos e ensaio de quimiotaxia .....	47
3.13.2. Tampões e soluções utilizados durante a realização do ELISA .....	49
3.13.3. Tampões e reagentes para dosagem de NO - reação de Griess.....	50
3.13.4. Tampões e soluções utilizados para citometria de fluxo .....	51
3.13.5. Soluções utilizadas durante o ensaio de citoquímica .....	52
3.13.6. Drogas, citocinas e anticorpos .....	53
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
4.1. População de estudo .....	56
4.2. Função quimiotática de neutrófilos normais. Efeito do soro de pacientes com câncer de mama após tratamento quimioterápico.....	56
4.3. Concentração sérica de citocinas em pacientes com câncer de mama submetidas ao tratamento quimioterápico .....	59
4.4. Concentração sérica de metabólitos de NO em pacientes com câncer de mama submetidas ao tratamento quimioterápico .....	60
4.5. Produção de NO nos sobrenadantes de leucócitos de pacientes submetidas a tratamento quimioterápico.....	61
4.6. Expressão de receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2 na superfície de neutrófilos obtidos de pacientes com câncer de mama antes e após tratamento quimioterápico .....	63
4.7. Expressão da molécula de adesão CD11b em neutrófilos de pacientes com câncer de mama antes e após tratamento quimioterápico.....	66
4.8. Análise da polimerização de F-actina em neutrófilos obtidos de pacientes com câncer de mama antes e após tratamento quimioterápico .....	69
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>95</b>

# 1. INTRODUÇÃO



## 1.1. Câncer de mama

### 1.1.1. Incidência de câncer no Brasil e no mundo

A industrialização e a urbanização desencadearam significativa alteração na demografia mundial devido à redução nas taxas de natalidade e mortalidade com aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional. Como consequência, houve importante modificação nos padrões de saúde-doença caracterizados pela alteração no perfil de mortalidade com diminuição da taxa de doenças infecciosas e aumento da taxa de doenças crônico-degenerativas, especialmente doenças cardiovasculares e câncer (WHO, 2003; JEMAL et al., 2008).

No ano de 2005, de um total de 35 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões representando 21,7% de todas as mortes (WHO, 2005). Estima-se que em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões e até 2030 o câncer deverá alcançar a maior taxa de mortalidade comparada a outras doenças, até então consideradas como de maior ocorrência (Figura 1) (WHO, 2007; JEMAL et al., 2008).

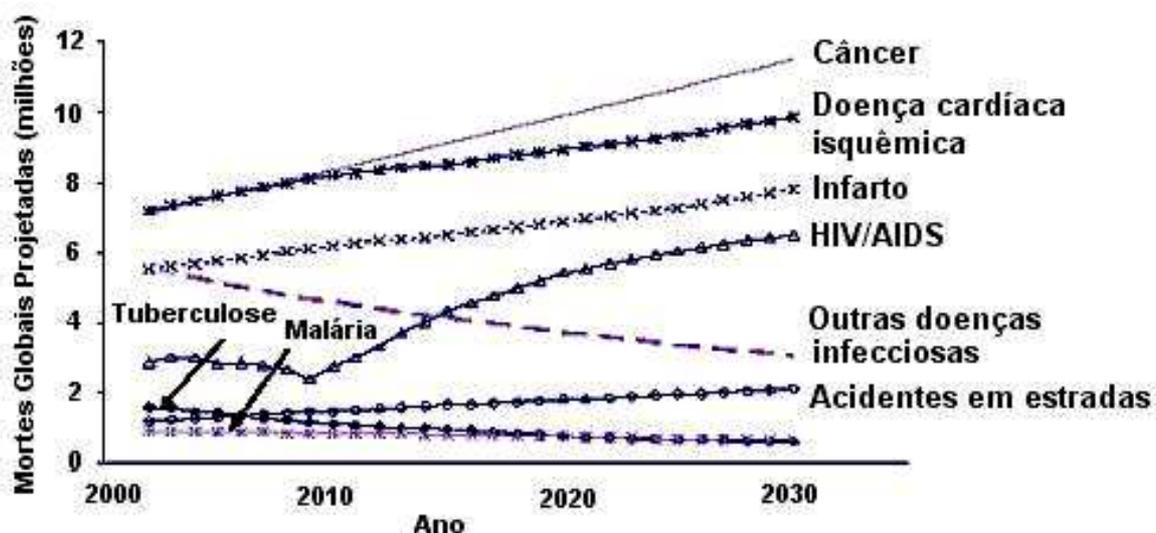
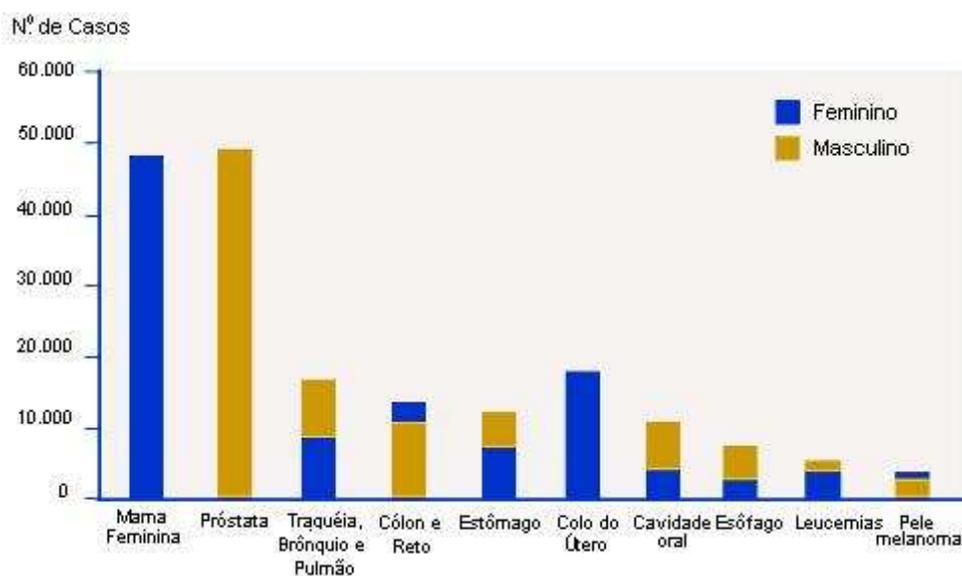


Figura 1. Mortes projetadas por causas selecionadas para 2030. Fonte: WHO: World Health Statistics 2007 (<http://www.who.int/healthinfo/>)

No Brasil, desde o ano de 2000, considerando as causas de morte por doença, excluindo-se as causas externas e as não-definidas, o câncer constitui a segunda causa de mortalidade entre a população (BRASIL, 2006). Sua distribuição epidemiológica demonstra aumento entre os tipos de câncer normalmente associados ou a maior *status* sócio-econômico (câncer de mama, próstata, cólon e reto) ou à pobreza (câncer de colo de útero, pênis, estômago e cavidade oral) (BRASIL, 2002; KOIFMAN; KOIFMAN, 2003).

Dentre os diferentes sítios primários de tumores, o câncer de mama representa o segundo tipo mais freqüente na população geral e o mais comum entre as mulheres (PARKIN; BRAY; DEVESA, 2001). No Brasil, a doença constitui a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres (BOING; VARGAS; CRIS-BOING, 2007).

Nos últimos 20 anos, de 1979 a 2000, a taxa de mortalidade por câncer de mama entre as mulheres brasileiras teve um aumento considerável, passando de 5,77/100.000 a 9,74/100.000, correspondendo a uma variação percentual relativa de +80,3% (BRASIL, 2003). As taxas de incidência do câncer de mama no Brasil indicam que a doença tende a manter-se como a primeira causa de morte em mulheres. Para o ano de 2008, o número de casos novos esperados para o Brasil é de 49,4 (Figura 2), com risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2007).



**Figura 2.** Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, sem pele não melanoma. Fonte: Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

O câncer de mama constitui um problema de saúde pública no Brasil e em diferentes países tais como Estados Unidos, Reino Unido, Suécia, Itália e Uruguai. Nestes países as taxas anuais de incidência e mortalidade pela doença são superiores a 100 casos/100.000 mulheres e cerca de 40 óbitos/100.000 casos, respectivamente (JEMAL et al, 2008). Nos Estados Unidos foi estimado que uma em cada nove mulheres poderá desenvolver câncer de mama em determinado momento de suas vidas (FEUER et al, 1993).

### 1.1.2. Fatores de risco para o câncer de mama

O aumento das taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama é associado a diferentes fatores de risco. A interação de fatores genéticos (genes de predisposição) com estilo de vida, hábitos reprodutivos e meio ambiente estão envolvidas no seu desenvolvimento (JOHNSON-THOMPSON; GUTHRIE, 2000). Estudos epidemiológicos apontam que fatores ambientais estão envolvidos na incidência do câncer de mama em 80% dos casos; enquanto que fatores genéticos, ou história familiar, correspondem a somente 5% dos casos, ou a 25% quando a doença aparece em mulheres jovens ainda na pré-menopausa (BRASIL, 2003).

Os fatores ambientais podem ser divididos por hierarquia, de acordo com o risco que representam. Idade acima de 50 anos, presença de doenças proliferativas benignas na mama, como hiperplasia ou carcinoma lobular *in situ*, presença de tecido mamário mais denso e altos índices de radiação ionizante representam risco 2 a 4 vezes maior para o desenvolvimento do câncer de mama. Dentre os fatores que representam menor risco estão a idade à primeira gravidez (acima de 30 anos), história de câncer de ovário ou endométrio, menopausa tardia, menarca precoce e nuliparidade. A terapia de reposição hormonal é considerada outro possível fator de risco, porém, restrito a mulheres que a utilizaram por longo período ou em altas doses de hormônio; e pelo uso de anticoncepcionais orais, principalmente entre as mulheres acima de 45 anos ou abaixo de 20 anos de idade (FRIEDENREICH et al., 2001).

### 1.1.3. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama

A prevenção primária do câncer de mama ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas em sua etiologia. Até o momento, a realização periódica de exame clínico e mamográfico constitui a principal estratégia de rastreamento da doença, cujo principal objetivo é sua detecção precoce (ELMORE et al., 2005). O auto-exame das mamas é considerado importante estratégia para a detecção do tumor de mama em estadiamento inicial (MENDONÇA et al., 2008), embora não esteja relacionado à redução da taxa de mortalidade pela doença (KOSTERS; GOTZSCHE, 2003).

O diagnóstico do câncer de mama em estágio inicial possibilita um tratamento mais efetivo e menos agressivo (SINGLETERY; CONNOLLY, 2006). O aumento global na sobrevida de mulheres com câncer de mama ocorre principalmente para os casos em que a doença se encontra em estádios clínicos iniciais. Nos Estados Unidos, considerando a sobrevida de 1,3 milhões de mulheres com câncer de mama em 10 anos de seguimento (1985 a 1996), apenas 5% a 12% das pacientes em estágio inicial (0, I ou II) morreram. Porém, para os casos mais avançados (III ou IV) cerca de 90% foram a óbito (BLAND et al., 1998).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, 60% dos casos de câncer de mama no Brasil são detectados em estádios mais avançados, o que tem por consequência o aumento de recidivas, aparecimento de metástases e redução da sobrevida (BRASIL, 2007). Tal situação exige um tratamento mais agressivo que inclui o uso de drogas quimioterápicas, cujo benefício consiste na redução da progressão tumoral. Sabe-se que a resposta à quimioterapia neoadjuvante é um fator preditivo de sobrevida livre de doença e sobrevida global (BONADONNA et al., 1998).

A quimioterapia (QT) consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar por via sistêmica as neoplasias através da redução do processo de crescimento e divisão celular (CLEATOR; PARTON; DOWSETT, 2002). Contudo, as drogas utilizadas no tratamento quimioterápico atuam sem especificidade, destruindo ou inibindo não só as células neoplásicas como

também células normais do paciente. Alterações da resposta imune celular têm sido demonstradas em pacientes com câncer após o uso de drogas quimioterápicas. Tais alterações podem desencadear diminuição da resistência frente aos microrganismos (LEJEUNE et al., 1996) e, conseqüentemente, pode ocorrer aumento da incidência e/ou gravidade de infecções nas pacientes tratadas, provocadas não só pela leucopenia induzida pelas drogas (RAHMAN et al., 1997), mas também por uma redução da capacidade de migração dos neutrófilos, mesmo após o período de recuperação da aplasia medular (MENDONÇA et al., 2006).

## **1.2. Resposta inflamatória - migração dos neutrófilos circulantes**

### *1.2.1. Inflamação: aspectos gerais*

A inflamação é uma reação dos tecidos vascularizados frente a um agente agressor, cuja finalidade é a reparação de estruturas e funções e, conseqüentemente, manutenção da homeostasia tecidual (DEJANA; CORADA; LAMPUGNANI, 1995). Em princípios gerais, o agente agressor, que pode ser químico (drogas), físico (calor), biológico (microrganismos), auto-imune ou células tumorais, age sobre as células residentes induzindo a liberação de mediadores solúveis que, via receptores de membrana, produzem aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma e células sanguíneas para o meio extravascular (HENSON, 2005).

O processo inflamatório envolve complexos mecanismos moleculares e celulares. A migração celular é um evento central na resposta inflamatória, independente de sua etiologia. Os leucócitos - neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos - representam o segundo grupo de células presentes no sangue, em valores numéricos, e diferem entre si por diversas características, dentre as quais suas quantidades relativas, morfologia e, principalmente, suas funções (DITTMAR et al., 2000).

Dentre os leucócitos circulantes, os neutrófilos representam as principais células recrutadas para o sítio inflamatório na fase aguda e também os maiores efetores da lesão tecidual, através da produção de proteases e radicais derivados do

metabolismo do oxigênio e nitrogênio (KEEL et al., 1997). Devido suas funções, os neutrófilos são considerados como essenciais na resposta do organismo contra agentes infecciosos além de desempenhar importante papel na vigilância e destruição de células neoplásicas (VOLLMER; MANDELL, 1993).

### *1.2.2. Migração dos neutrófilos circulantes até o sítio inflamatório*

Os neutrófilos representam cerca de 60-70% dos leucócitos circulantes. São células provenientes de células-tronco pluripotentes (“haematopoietic stem cells”) as quais dão origem às células brancas, células vermelhas e plaquetas. Os processos de diferenciação, proliferação e maturação dos neutrófilos ocorrem ainda na medula óssea sob estimulação de fatores de crescimento hematopoiéticos como o fator estimulador da colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interleucina (IL)-3 (REYES et al., 1999). Após a maturação, os neutrófilos entram na corrente sanguínea onde se mantêm por aproximadamente 6 a 9 horas. Neste local, encontram-se, em sua maioria, sob forma madura (51-67%), apresentando núcleo segmentado (polimorfonuclear) e citoplasma com granulações que assumem um aspecto característico quando observadas ao microscópio. Essas células também podem migrar para os tecidos, nos quais o tempo máximo de permanência é de 2 a 4 dias (JANEWAY et al., 2000).

O processo de recrutamento ou migração dos neutrófilos circulantes depende da liberação de fatores quimiotáticos no sítio da lesão, que são capazes de orientar o movimento das células através de um gradiente de concentração (DITTMAR et al., 2000). Substâncias quimiotáticas, tais como compostos formilados (formil-metil-leucil-fenilalanina - fMLP), fragmentos do sistema complemento (C5a), fatores derivados da parede bacteriana (lipopolissacarideo - LPS), mediadores lipídicos como fator de agregação plaquetária (PAF) e leucotrieno (LT)-B<sub>4</sub>, e citocinas como IL-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , constituem mediadores clássicos na ativação de neutrófilos assim como de outros subtipos de leucócitos (BOKOCH, 1995; GURA, 1996). Citocinas quimiotáticas, denominadas quimiocinas, também são reconhecidas na ativação de leucócitos, porém com maior especificidade (PROOST; WUYTS; VAN

DAMME, 1996). Quimiocinas específicas para neutrófilos incluem interleucina (IL)-8, peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais (ENA), proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-2 $\alpha$  e -2 $\beta$  e oncogenes reguladores do crescimento (GRO)- $\alpha$ , - $\beta$  e - $\delta$  (FUHLER et al., 2005).

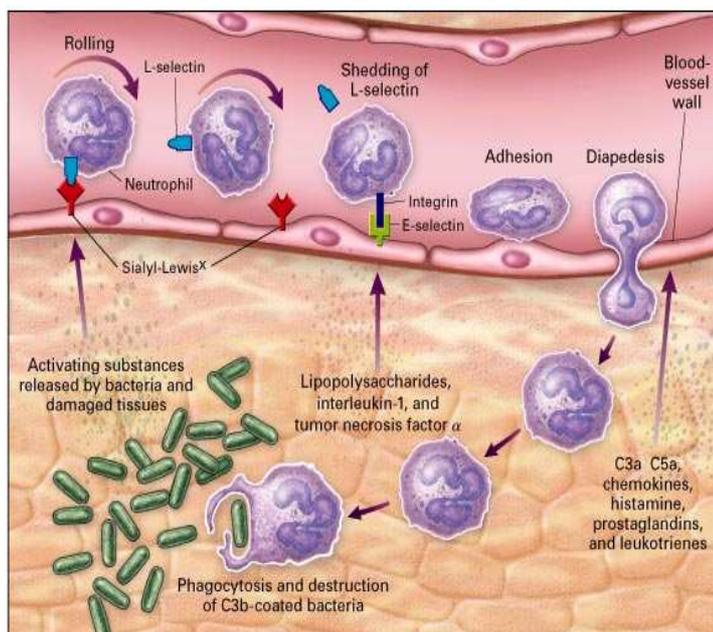
Os quimioatraentes não apenas direcionam os leucócitos como também ativam essas células. A ativação é um pré-requisito para a migração celular uma vez que determina a capacidade pró-adesiva dessas células ao endotélio, via receptores de membrana e sinalização intracelular, e subsequente extravasamento dos neutrófilos (MOSER; WILLIMANN, 2004).

A ativação dos neutrófilos desencadeia uma série de eventos celulares que se apresentam de maneira seqüencial (rolamento, adesão e transmigração) de acordo com a capacidade de interação leucócito-endotélio, coordenada por diferentes moléculas de adesão (Figura 3) (KADONO et al., 2002).

Durante a inflamação, os neutrófilos circulantes interagem transitoriamente com moléculas expressas na superfície das células endoteliais, resultando em rolamento celular sobre a parede dos vasos sanguíneos. Este contato inicial representa a primeira etapa de uma cascata de interações moleculares entre leucócitos e endotélio ativados (Figura 3) (RADI et al., 2001; LEY, 2002).

O rolamento dos neutrófilos no endotélio é mediado pela ligação reversível das glicoproteínas selectinas e seus contra-receptores. As selectinas são expressas constitutivamente na superfície dos leucócitos (L-selectina) e, de maneira induzida, nas células endoteliais (E- e P-selectina) e nas plaquetas (P-selectina) (Figura 3). A interação entre as moléculas E-selectina e L-selectina confere uma ligação de baixa afinidade entre endotélio e leucócito, a qual favorece uma redução da velocidade com que os leucócitos passam pelos vasos, permitindo a essas células rolar e, desde que suficientemente estimuladas, aderir firmemente ao endotélio (LEY et al., 1995). Em pacientes portadores da síndrome da Deficiência de Adesão de Leucócitos tipo 2 - defeito metabólico em via sintética comum para todos os ligantes de selectinas - observa-se falência da migração de neutrófilos associada à redução de rolamento e aderência dessas células ao endotélio (ETZIONI et al., 1995). O mesmo tem sido demonstrado em camundongos nocaute para L- e/ou E- selectina, sugerindo que o

rolamento, realizado por meio das selectinas, é pré-requisito para a firme adesão do neutrófilo ao endotélio e, conseqüentemente, para o seu recrutamento normal (LEY, 2002).



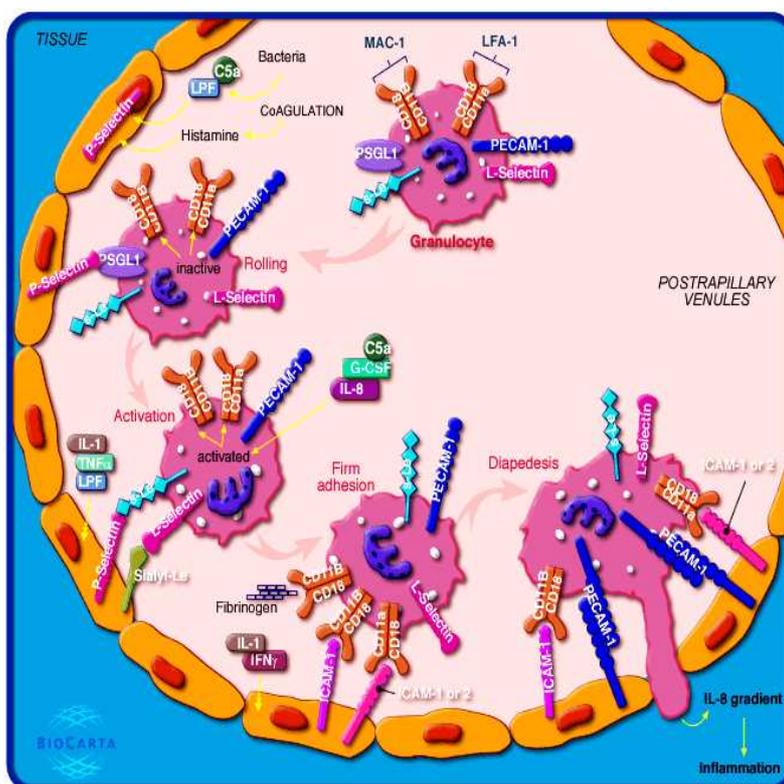
**Figura 3.** Seqüência de eventos envolvidos no processo de transmigração celular. Modificado de Holgate ST, Church MK, Lichtenstein LM – *Allergy*, 2<sup>nd</sup> edition, London: Mosby, 2001.

A aderência ou firme adesão dos leucócitos ao endotélio tem como objetivo imobilizar o rolamento dessas células e possibilitar uma maior interação leucócito-endotélio. A firme adesão dos neutrófilos é mediada especialmente por moléculas de adesão pertencentes à família de Integrinas  $\beta_2$  (ou CD18) - expressas na superfície dos leucócitos - e moléculas de adesão intercelular (ICAM), apresentadas na superfície das células endoteliais (GAHMBERG, 1997).

As integrinas, também conhecidas como receptores CR3, são glicoproteínas heterodiméricas transmembrana compostas de duas cadeias de peptídeos,  $\alpha$  (CD11a, CD11b ou CD11c) e  $\beta$  (CD18), ligadas não covalentemente que integram as atividades da matriz extracelular e do citoesqueleto (KIM; CARMAN; SPRINGER, 2003).

Os neutrófilos expressam dois membros da família CD18 tais como CD11a/CD18 (ou antígeno associado à função de leucócitos - LFA-1) e CD11b/CD18

(ou antígeno macrofágico - Mac-1), que reconhecem moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) expressas nas células endoteliais ativadas (Figura 4) (LEY, 2002).



**Figura 4.** Participação das moléculas de adesão nas interações leucócito-endotélio. Fonte: [www.biocarta.com/.../h\\_neutrophilpathway.asp](http://www.biocarta.com/.../h_neutrophilpathway.asp)

Mac-1 é considerada como a molécula de maior relevância na maioria dos modelos de resposta inflamatória (WAGNER; ROTH, 1999) e em conjunto com as quimiocinas, constitui o componente mais importante no controle da migração de neutrófilos (FAGERHOLM et al., 2006). Mac-1 está envolvida não só na adesão dessas células ao endotélio como também em sua transmigração, fagocitose, apoptose e degranulação (GAHMBERG, 1997). Além disso, Mac-1 parece participar da sinalização realizada por outros receptores expressos na superfície dos neutrófilos, incluindo proteína ligante de LPS, receptor de fMLP e receptores Fc (LEY, 2002). Desta forma, alterações na expressão de Mac-1 podem contribuir para a disfunção dos neutrófilos, comprometendo a capacidade de defesa do organismo e favorecendo maior susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções, como

demonstrado em pacientes com mutação do gene CD18 (TSAI et al., 2008) e em neutrófilos normais tratados com anticorpos monoclonais para integrinas  $\beta_2$  (GAHMBERG, 1997).

Os efeitos observados para as integrinas  $\beta_2$  estão diretamente relacionados à capacidade de ligação ou adesividade (afinidade e avidéz) dessas moléculas aos seus receptores endoteliais (LAUDANNA et al., 2002). A ligação de Mac-1 ocorre sob sinais de ativação, os quais são responsáveis não só pelo controle da adesividade como também da expressão dessas moléculas. Quimioatraentes (PAF, IL-8, fMLP, C5a), citocinas (TNF- $\alpha$ ), fatores de crescimento (GM-CSF) e produtos bacterianos (peptídeos formilados e LPS) favorecem o aumento da expressão de Mac-1 (CANETTI et al., 2001). Por outro lado, o aumento da adesividade ou avidéz desta molécula parece ser estimulado particularmente pela quimiocina IL-8, como demonstrado em modelos animais após o uso de anticorpos monoclonais anti-IL-8 (DETMERS et al., 1990; POBER; COTRAN, 1990).

Uma vez aderidos ao endotélio, os neutrófilos migram até os tecidos subjacentes por espaços abertos entre as células endoteliais (diapedese) (Figura 4) ou por dentro de fissuras formadas no próprio endotélio (migração transendotelial) (RADI et al., 2001). A diapedese e a migração transendotelial (transmigração) dos neutrófilos ocorrem devido à expressão de moléculas de adesão pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, tais como moléculas de adesão celular endotelial e plaquetária (PECAM)-1, expressas na superfície dos neutrófilos e das células endoteliais (Figura 4), e moléculas de adesão juncional (JAM), expressas apenas no endotélio (ZIMMERMAN et al., 1994). Selectinas e integrinas  $\beta_2$  também estão envolvidas no processo de diapedese dos neutrófilos, direta ou indiretamente. Em modelos experimentais de isquemia/reperfusão foi demonstrado que a emigração de neutrófilos previamente ativados foi reduzida após o uso de anticorpos monoclonais para várias glicoproteínas de adesão, incluindo CD18, CD11b, ICAM-1 e L-selectina (KUBES; JUTILA; PAINE, 1995).

Após a transmigração até o sítio de lesão, os leucócitos podem desempenhar uma grande variedade de funções dependendo do seu modo de ativação. Dentre elas, incluem-se a capacidade de apresentação de antígenos, citotoxicidade celular,

remoção de fragmentos celulares, remodelamento tecidual e regulação da inflamação. Podem também inibir ou facilitar o crescimento tumoral através de diferentes mecanismos (AL-SARIREH; EREMIN, 2000).

Em resumo, a capacidade de migração do neutrófilo é essencial para manter outras importantes funções dessa célula, como a fagocitose e atividade microbicida (KEEL et al., 1997). O processo de migração dos neutrófilos envolve eventos seqüenciais, sendo cada um deles pré-requisito para a etapa subsequente. Estes eventos são coordenados pela interação molecular entre receptores (moléculas de adesão) e seu ligantes, expressos na superfície dos neutrófilos e das células endoteliais. A expressão e a capacidade de ligação (afinidade e avidéz) das moléculas de adesão determinam a habilidade dos neutrófilos circulantes chegarem ao sítio inflamatório.

### **1.3. Fatores quimiotáticos envolvidos na migração de neutrófilos - papel das quimiocinas**

Os neutrófilos circulantes são atraídos para o sítio inflamatório por meio da produção, no local da lesão, de diferentes fatores quimioatraentes, tais como fMLP, C5a, IL-8, TNF- $\alpha$  e LTB<sub>4</sub> (HEIT et al., 2002). No entanto, o papel dos mediadores frente a uma determinada agressão tecidual está relacionado à concentração e ao compartimento orgânico (tecido ou circulação sistêmica) no qual eles são liberados. Nos tecidos, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-1 $\beta$  medeiam a defesa local do hospedeiro, através de ativação e migração de neutrófilos (RIBEIRO et al., 1991). Por outro lado, níveis sistêmicos elevados destas citocinas resultam em efeitos inibitórios sobre a função de leucócitos, incluindo a migração dos neutrófilos (TAVARES-MURTA; CUNHA; FERREIRA, 1998).

Dentre os vários mediadores já citados, as quimiocinas representam os principais mediadores envolvidos na ativação e migração de neutrófilos, provavelmente devido sua especificidade sobre essas células (FIGARELLA-BRANGER et al., 2003). As quimiocinas são classificadas em famílias com base no número e localização dos resíduos de cisteína N-terminais. As duas principais

famílias são a das quimiocinas CC, nas quais os resíduos de cisteína são adjacentes, e a família CXC, na qual esses resíduos são separados por um aminoácido. As citocinas quimiotáticas pertencentes aos grupos CXC e CC constituem as subfamílias de quimiocinas mais envolvidas na resposta imune celular, cujas atividades biológicas diferem quanto à capacidade de estimular tipos específicos de células efetoras. Enquanto as quimiocinas CXC (por exemplo, IL-8, ENA-78, MIP-2 e GRO) atraem principalmente neutrófilos (FIGARELLA-BRANGER et al., 2003), as quimiocinas CC (por exemplo, proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 e quimiocina regulada sob ativação normalmente expressa e secretada por células T (RANTES)) atraem uma variedade de leucócitos (KAPLAN, 2001).

Dentre as quimiocinas CXC em humanos, considera-se a IL-8 como o fator quimiotático de maior especificidade para neutrófilos, cuja ação é mediada pela ligação de alta afinidade a dois receptores transmembrana específicos, incluindo receptores de quimiocinas CXC - CXCR1 (ou IL-8RA) e CXCR2 (ou IL-8RB) (HARADA et al., 1994). Esses receptores ativam as proteínas G triméricas nos neutrófilos, iniciando deste modo a sinalização intracelular que permitirá a estas células migrarem para os sítios inflamatórios (KATANAEV, 2001).

A produção de IL-8 é realizada especialmente pelos monócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (CHALY et al., 2000), sendo sua síntese e secreção induzidas por estímulos externos como o LPS e por substâncias endógenas como óxido nítrico (NO) (AJUEBOR et al., 1998), TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (FURIE; RANDOLPH, 1995).

A importância da IL-8 sobre a função dos neutrófilos está diretamente relacionada à sua capacidade de controlar não apenas a ativação e o recrutamento dessas células (HARADA et al., 1994; FURIE; RANDOLPH, 1995), como também a expressão e adesividade das moléculas de adesão Mac-1 e funções efetoras como a degranulação (SPRINGER, 1990).

Em resumo, a IL-8 liberada pelos agentes infecciosos e/ou células imunes participa da ativação celular, da ligação dos leucócitos ao endotélio, da migração das células circulantes para os tecidos subjacentes e ativação de funções efetoras dos neutrófilos (SPRINGER, 1990). Estes efeitos, no entanto, estão condicionados à

concentração da quimiocina e ao compartimento orgânico onde foi liberada. Portanto, a redução tecidual ou o aumento sérico de IL-8 é capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos até o sítio inflamatório, comprometendo a defesa do organismo frente a uma injúria tecidual.

#### **1.4. Motilidade de neutrófilos - vias de sinalização envolvidas e participação dos filamentos de actina**

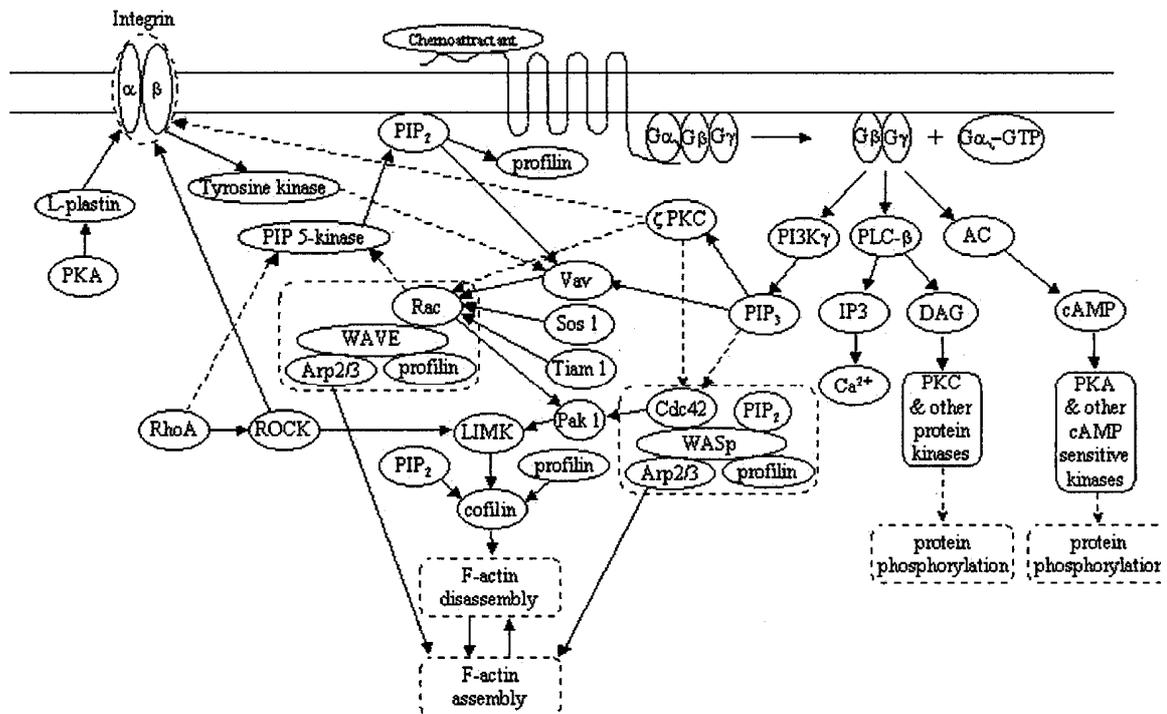
A habilidade dos leucócitos em detectar pequenas concentrações de quimioatraentes permite a essas células locomover pelo tecido e até o sítio inflamatório. A motilidade dos neutrófilos é controlada por receptores quimioatraentes específicos ligados a mediadores quimiotáticos produzidos pelo agente infeccioso e/ou por células teciduais (LEE et al., 1992; WUYTS et al., 1997). A maioria dos quimioatraentes, independente de sua natureza química, exerce sua ação via receptores acoplados a proteína G (GPCR) controlando complexas cascatas de eventos sinalizadores (DEVALAJARA; RICHMOND, 1999; CUMMINGS et al., 1999).

Os receptores GPCR são expressos na superfície dos neutrófilos e possuem uma estrutura característica de sete domínios  $\alpha$ -helicoidais transmembranas acoplados à proteína G. Eles são divididos em cinco grupos, de acordo com os mediadores envolvidos na ativação celular, incluindo receptores para fMLP, PAF, C5a, LTB<sub>4</sub> (YOKOMIZO et al., 1997) e receptores para quimiocinas da família CXC, principalmente receptores CXCR1 e CXCR2 para IL-8 (PREMACK; SCHALL, 1996).

Proteínas G são moléculas triméricas, com três subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo a subunidade  $\alpha$  ligada a guanosina difosfato (GDP) (Figura 5). Quando ativadas, as subunidades  $G\beta\gamma$  são liberadas em decorrência da formação do complexo GTP-G $\alpha$  e a partir de então, três vias distintas de sinalização podem ser induzidas, incluindo fosfolipase C (PLC), fosfoinositol 3-quinase (PI3K) e adenilil ciclase (AC) (HOWARD; BEN-BARUCH; OPPENHEIM, 1996). A ativação da via PLC resulta na formação de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), responsáveis pela ativação de proteína quinase C (PKC) e aumento de cálcio citoplasmático (LU; FURUYA; GRINSTEIN, 1993). A ativação da AC favorece a produção de cAMP, o qual é responsável pela

ativação de proteína quinase A (PKA). Ambas as vias, PLC e AC, participam indiretamente da resposta motora dos neutrófilos através de seus produtos PKC e PKA (ALTERAIFI; ZHELEV, 1997).

PI3K, através do acúmulo de seu produto fosfatidilinositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>), é considerada como a principal molécula sinalizadora da motilidade dos neutrófilos (BEN-BARUCH; MICHIEL; OPPENHEIM, 1995), provavelmente devido sua estreita relação com as proteínas tirosina quinases e os filamentos de actina (BRUYNINCKX et al., 2001).



**Figura 5.** Esquema representativo das vias de sinalização intracelular envolvidas na migração de neutrófilos após ativação. Participação dos receptores acoplados à proteína G e moléculas de adesão integrinas β<sub>2</sub>. Fonte: ZHELEV, DV e ALTERAIFI, A. In: *Annals of Biomedical Engineering*, v. 30, p. 357, 2002.

A ativação da via tirosina quinase, realizada diretamente pela ligação e ativação das moléculas de adesão integrina β<sub>2</sub> (Figura 5), é evento chave na polimerização de actina que é fundamental na resposta motora dos neutrófilos

(KATANAEV, 2001). O mecanismo da motilidade dos neutrófilos ativados está associado inicialmente a uma alteração conformacional destas células, permitindo sua movimentação (“*crawling*”) ao longo do endotélio em direção ao gradiente quimioatraente (FIRTEL; CHUNG, 2000).

Durante a fase inicial da motilidade, os neutrófilos movimentam-se estendendo um pseudópodo que impulsiona o restante da célula na direção da extensão. O interior do pseudópodo é constituído por uma rede ramificada de filamentos compostos de actina e de uma proteína contrátil, a miosina. O neutrófilo utiliza associação e dissociação rápidas de actina, a fim de expandir e contrair o pseudópodo (SULLIVAN; MANDELL, 1983; STOSSEL et al., 1984). Este fenômeno é controlado por íons de cálcio (liberados especialmente pela ação das fosfolipases) e inúmeras proteínas reguladoras, tais como proteínas fixadoras de actina ou de cálcio (LU; FURUYA; GRINSTEIN, 1993).

A polimerização dos filamentos de actina é evento determinante na migração de neutrófilos. Alterações em quaisquer etapas que precedem este evento, tais como reconhecimento de mediadores quimiotáticos e acoplamento de resposta, podem resultar em redução na capacidade quimiotática, comprometendo a defesa do organismo e aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento de infecções.

### **1.5. Alterações de funções de neutrófilos em doenças/câncer - participação de mediadores**

Em doenças infecciosas, o papel dos neutrófilos como células de defesa é bem documentado. Em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi demonstrada redução significativa da quimiotaxia (HEIT et al., 2006) e fagocitose (PUGLIESE et al., 2005) de neutrófilos em resposta aos estímulos IL-8 e fMLP. Estes defeitos foram associados à ocorrência de infecções bacterianas e fúngicas e, conseqüentemente, ao aumento da morbidade/mortalidade neste grupo de pacientes (HEIT et al., 2006). Em pacientes com sepse que posteriormente evoluíram para óbito, a função quimiotática de neutrófilos foi significativamente menor que aquela apresentada por voluntários saudáveis, sugerindo que este tipo de

disfunção também pode contribuir para o prognóstico da doença (TAVARES-MURTA et al., 2002).

Pacientes com câncer podem apresentar alterações de funções de leucócitos induzidas pela própria doença (PICKERING; ERICSSON; KOHL, 1978). Pacientes com câncer gastrointestinal, no momento do diagnóstico, apresentaram redução da função quimiotática de neutrófilos comparado a voluntários sadios (DUIGNAN et al., 1986). Em mulheres com câncer ginecológico de diferentes origens, foi encontrada redução na produção de radicais superóxidos, já em estádios iniciais e de forma mais marcada com a evolução da doença. Não está claro se as alterações na produção de superóxidos apresentam relação causal com o desenvolvimento da doença ou se seriam consequência desta doença (PÓKA et al., 2000). Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou redução da capacidade de migração dos neutrófilos de pacientes com câncer invasivo de colo uterino, comparado ao grupo em estádios iniciais e ao grupo controle (FERNANDES JUNIOR et al., 2007).

Mediadores sistêmicos como as citocinas e o óxido nítrico (NO) estão envolvidos no fenômeno de inibição de funções celulares. Em modelos de sepse, a falência da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório é mediada por TNF- $\alpha$  e IL-8 presentes na circulação, através da produção do NO (TAVARES-MURTA et al., 1998). Em modelo de endotoxemia (TAVARES-MURTA et al., 2001) ou sepse induzida por ligadura e perfuração cecal, a administração de inibidor seletivo da síntese de NO, aminoguanidina, preveniu a falência da migração de neutrófilos, demonstrando o papel do NO neste modelo experimental (BENJAMIM et al., 2000).

Em pacientes com câncer também observam-se alterações na produção de mediadores sistêmicos. Concentrações séricas elevadas de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10 e NO são descritas para pacientes com câncer de diferentes etiologias comparado a voluntários sadios (MERENDINO et al., 1999; COSKUN et al., 2003). Alterações de funções de neutrófilos têm sido verificadas também, e principalmente, entre os ciclos de administração de drogas quimioterápicas.

## 1.6. Quimioterapia antineoplásica – aspectos terapêuticos e tóxicos

A cirurgia como tratamento isolado do câncer é ineficaz em pacientes com tumores localmente avançados. Nos últimos anos, estabeleceu-se consenso mundial na utilização e indicação da quimioterapia adjuvante, ou seja, administrada após a retirada cirúrgica da mama. A terapia neoadjuvante, inicialmente definida como terapia sistêmica realizada antes do tratamento local, é mais recente e também amplamente utilizada (CLEATOR; PARTON; DOWSETT, 2002).

A quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar, por via sistêmica, as neoplasias através da redução do processo de crescimento e divisão celular. Contudo, a maioria destas substâncias não possui especificidade, ou seja, não destrói seletiva e exclusivamente as células tumorais. Os tecidos formados por células de rápida proliferação, por apresentarem semelhança às células neoplásicas - alta atividade mitótica e ciclos celulares curtos - representam os principais alvos da toxicidade quimioterápica (CLEATOR; PARTON; DOWSETT, 2002).

Mielossupressão, especialmente neutropenia, é um dos efeitos adversos mais comuns da quimioterapia e está associada ao aumento de risco de infecções (ELOMAA; JOENSUU; BLOMQUIST, 2003). No entanto, alguns estudos sugerem que a contagem de neutrófilos isoladamente não tem valor preditivo na ocorrência de infecções, como demonstrado em pacientes com câncer ovariano (GREGORY et al., 2000) ou de mama (RAHMAN et al., 1997) submetidas a quimioterapia. Além da perda quantitativa de leucócitos circulantes, as drogas quimioterápicas são também capazes de afetar a capacidade funcional dessas células (LEHRNBECHER et al., 1997).

A maioria dos trabalhos descritos em literatura demonstra efeito direto da quimioterapia sobre as funções de leucócitos, associando leucopenia, alterações funcionais de células e ocorrência de infecções (RAHMAN et al., 1997). Por outro lado, efeitos indiretos – aqueles que ocorrem quando não existe droga circulante – também são observados. Recentemente, demonstramos que os neutrófilos obtidos de mulheres com câncer de mama apresentaram capacidade de migração semelhante a

mulheres voluntárias. Porém, o tratamento quimioterápico reduziu a migração de neutrófilos frente a diferentes estímulos, principalmente nas pacientes com episódios de infecção (MENDONÇA et al., 2006). Neste estudo, os neutrófilos foram coletados no tempo mínimo de 21 dias após o ciclo de quimioterapia, quando considera-se que já houve recuperação da aplasia medular e depuração das drogas do organismo (CALABRESE; CHABNER, 2001). Também em pacientes com câncer de mama recebendo antraciclinas foi observada redução significativa das funções fagocítica e microbicida de neutrófilos imediatamente antes do 2º ciclo de QT, sendo este efeito mantido durante os ciclos subseqüentes (WIJAYAHADI et al., 2007). Em pacientes com glioma maligno foi demonstrada redução da produção de superóxidos por neutrófilos no tempo de 6-8 semanas após o término do tratamento quimioterápico (HARTMANN et al., 2004). Alteração funcional semelhante foi demonstrada em pacientes com câncer ovariano no 14º dia após a quimioterapia, comparada ao tempo pré-QT. Na fase de total recuperação da aplasia medular houve aumento da capacidade de produção de superóxidos por neutrófilos, contudo ainda abaixo dos níveis normais. Foi sugerido que a quimioterapia pode alterar diretamente a função celular e, de maneira indireta, destruir o microambiente da medula óssea (HIDAKA et al., 2003).

A toxicidade da quimioterapia antineoplásica não ocorre de forma uniforme, variando de indivíduo para indivíduo e de uma droga para outra (COLLINS, 1995). Em crianças leucêmicas foi demonstrado que as funções neutrofílicas são diferentemente sensíveis aos efeitos tóxicos da quimioterapia. Embora a maior parte das funções seja restaurada após a recuperação medular, como a quimiotaxia, observou-se a persistência do defeito bactericida (LEJÈUNE et al., 1996). Outros pacientes com leucemia aguda, na fase de remissão da doença, apresentam aumento da capacidade de quimiotaxia dos neutrófilos, contudo muito abaixo dos níveis normais. O índice de fagocitose tende a normalizar-se mas, ainda assim, observa-se que nesses pacientes a incidência de infecções mantém-se aumentada (HOFMANN; STAUCH; HÖFFKEN, 1998). Em pacientes com câncer de mama previamente submetidas à quimioterapia ou radioterapia, a redução na mobilização de células progenitoras a partir da medula óssea sugere a presença de um “fator circulante”,

---

responsável pelo efeito indireto do quimioterápico (DEMIRKAZIK et al., 2002).

O esclarecimento dos mecanismos envolvidos nas alterações de funções leucocitárias poderá definir uma estratégia efetiva capaz de limitar os efeitos deletérios da inflamação aguda e, ao mesmo tempo, preservar a defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, como ocorre em pacientes com câncer em tratamento quimioterápico.

## 2. HIPÓTESE E OBJETIVOS



## 2.1. HIPÓTESE

A redução da migração de neutrófilos observada em pacientes com câncer de mama tratadas com quimioterapia pode ser mediada por fatores circulantes que interferem em algum evento essencial à migração celular.

## 2.2. OBJETIVOS

Avaliar mecanismos envolvidos na redução da migração de neutrófilos em pacientes com câncer de mama tratadas com quimioterapia, através dos seguintes procedimentos experimentais:

- a) Efeito do soro obtido de pacientes com câncer de mama após tratamento quimioterápico sobre a migração de neutrófilos normais;
- b) Quantificação da produção sistêmica de mediadores NO, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-10;
- c) Quantificação da produção de mediadores NO, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-10 em sobrenadantes da cultura de neutrófilos e células mononucleares;
- d) Quantificação da expressão de receptores de quimiocinas (CXCR1 e CXCR2) e de moléculas de adesão (CD11b) em neutrófilos;
- e) Quantificação da polimerização dos filamentos de F-actina.

### 3. PACIENTES E MÉTODOS



### 3.1 Pacientes e controles

Foram avaliadas mulheres com diagnóstico de câncer de mama, independente do estadiamento tumoral, sem qualquer tipo de tratamento antineoplásico anterior para a doença ou uso de drogas imunossupressoras, atendidas no Serviço de Mastologia da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). O diagnóstico foi realizado através de exame clínico e mamográfico e confirmado através de Punção para Biópsia Aspirativa por Agulha Fina (PBAAF) e/ou “Core Biopsy”. O estadiamento anátomo-patológico seguiu a recomendação do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) juntamente com o *Committee of the International Union against Cancer* (UICC). Tal procedimento reflete a extensão tumoral em TNM – tamanho do tumor (T), presença de nodo axilar (N) e/ou metástase (M) – e permite priorizar o tratamento mais adequado (SINGLETERY; CONNOLLY, 2006).

Os controles foram mulheres voluntárias sadias, ou seja, sem doença diagnosticada e sem uso de drogas imunossupressoras, abordadas no momento da realização do ensaio de quimiotaxia.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM e o termo de “Consentimento livre e esclarecido para participação em pesquisa” foi assinado, perante testemunha, pela paciente ou seu responsável, quando de acordo em participar da pesquisa.

### 3.2. Tratamento quimioterápico

Pacientes em diferentes estádios foram submetidas à quimioterapia, de acordo com a rotina do Serviço de Mastologia. O tratamento foi realizado em 6 ou 8 ciclos, com intervalo de 21 dias entre cada ciclo e contagem total de leucócitos maior ou igual a  $2000/\text{mm}^3$ , avaliada através de leucograma realizado, em média, 5 dias antes do início de cada ciclo. O tratamento quimioterápico foi constituído da combinação das seguintes drogas: (1) adriamicina ou epirrubicina ( $50 - 60 \text{ mg}/\text{m}^2$ ) e ciclofosfamida ( $500 - 600 \text{ mg}/\text{m}^2$ ): esquema AC ou EC, (2) 5-fluoruracil ( $600 \text{ mg}/\text{m}^2$ ),

adriamicina ou epirrubicina (50 - 60 mg/m<sup>2</sup>) e ciclofosfamida (500 - 600 mg/m<sup>2</sup>): esquema FAC ou FEC e (3) ciclofosfamida (500 - 600 mg/m<sup>2</sup>), metotrexato (50 mg/m<sup>2</sup>) e 5-fluoruracil (600 mg/m<sup>2</sup>): esquema CMF. Por ser o tratamento individualizado, a manutenção do mesmo por período maior ou menor do que o prescrito inicialmente foi dependente da resposta tumoral. Pacientes que apresentaram regressão tumoral total após o 6º ciclo tiveram seu tratamento quimioterápico interrompido, seguindo para o tratamento cirúrgico. Em mulheres com resposta parcial (mais que 50% de redução da área tumoral) ou com progressão tumoral (aumento de 25% ou mais no volume do tumor) ou ausência de resposta (regressão menor que 50%) ao final do 6º ciclo, a quimioterapia foi modificada por meio da suspensão do esquema até então utilizado e introdução do Taxol (50 mg/m<sup>2</sup>), associado ou não à radioterapia.

### 3.3. Coleta de sangue

Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas das pacientes, utilizando material descartável e esterilizado, seguindo todos os princípios de assepsia, em dois momentos distintos: (1) antes do 1º ciclo de quimioterapia quando a paciente ainda não havia recebido nenhum tipo de tratamento antineoplásico sistêmico e (2) 21 dias (período necessário para a recuperação da aplasia medular induzida pela quimioterapia) após o término do 3º ou 4º ciclo, imediatamente antes do ciclo seguinte.

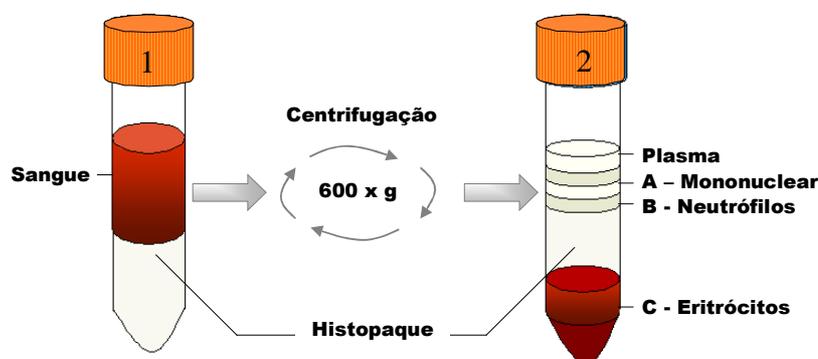
Em cada tempo foram coletadas duas amostras contendo 5 mL de sangue/amostra, sendo uma sem anticoagulante, utilizada para a dosagem de mediadores no soro, e outra com heparina (100 U/mL) utilizada para purificação de neutrófilos e avaliação da expressão de receptores de membrana.

O mesmo procedimento técnico foi realizado para a coleta de sangue das voluntárias sadias.

### 3.4. Obtenção e purificação de neutrófilos

Os neutrófilos presentes no sangue venoso de pacientes e controles foram isolados através do meio Histopaque (densidade 1119) de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA). O sangue coletado foi adicionado a um tubo de centrifuga contendo Histopaque, na proporção de 4,0 mL sangue/4,0 mL Histopaque. Os tubos foram centrifugados a 600 x g, em temperatura ambiente, até a completa separação da banda de neutrófilos (Figura 6).

A camada de neutrófilos foi coletada com o auxílio de micropipeta e a seguir as células foram lavadas com meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) contendo soroalbumina bovina (BSA) 0,01%, através de centrifugação (1200 rpm, 5 min, temperatura ambiente), procedimento este que foi repetido outras duas vezes. Em seguida, os neutrófilos isolados foram ressuspensos em 1 mL do mesmo meio. A viabilidade das células foi analisada por exclusão em azul de Tripan.



**Figura 6. Separação de leucócitos a partir do sangue total coletado com heparina.** Sangue heparinizado obtido de controles e pacientes com câncer de mama é colocado em tubos Falcon contendo Histopaque (Tubo 1) e centrifugado em velocidade de 600 vezes a força da gravidade (x g). Duas camadas celulares são formadas (Tubo 2), sendo uma superior (A) e outra inferior (B) constituídas de células mononucleares e neutrófilos, respectivamente.

Foi realizada a contagem total e diferencial dos leucócitos purificados. Para a contagem total, 20  $\mu$ L da solução de células foram adicionados à solução de Turk (400  $\mu$ L) e as células foram contadas em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi

feita em lâmina lapidada preparada com 20  $\mu$ L da solução de células em citocentrífuga (1000 rpm, 5 min, Cito-Spin, Incibrás). A lâmina foi corada (May-Grunwald-Giemsa) e observada em microscópio óptico com objetiva em óleo de imersão (100x). Foram contadas 100 células diferenciando-se os tipos celulares - neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e basófilos. O grau de purificação obtido foi, em média, superior a 95%.

### **3.5. Tratamento de neutrófilos normais com soro de pacientes**

Para avaliar um possível efeito do soro obtido de pacientes com câncer de mama sobre a função quimiotática de neutrófilos normais, estas células purificadas foram incubadas com soro heterólogo normal (50%) ou na presença de soro de pacientes diluído em RPMI-BSA (concentrações de 0,5%, 5% e 50%) durante 30 minutos, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo foi realizado o ensaio de quimiotaxia utilizando microcâmara de quimiotaxia (Figura 7).

### **3.6. Ensaio de quimiotaxia**

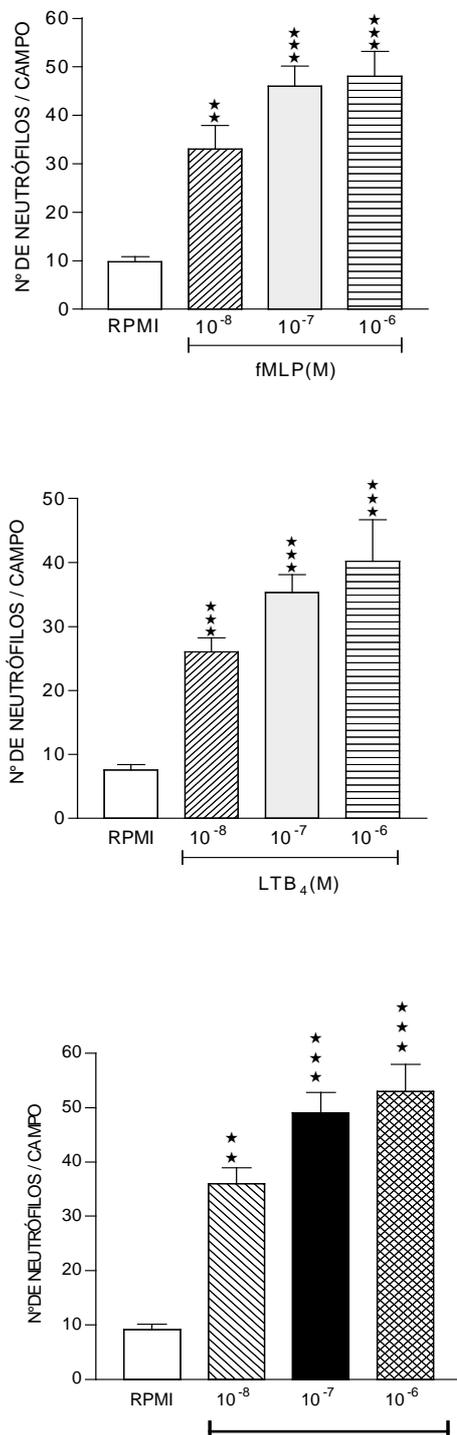
A capacidade de migração de neutrófilos foi avaliada em microcâmara de quimiotaxia de 48 poços (Neuro Probe, Cabin John, MD, USA) (figura 7), separadas por membrana de policarbonato com poros de 5  $\mu$ m de diâmetro. Na câmara inferior foram colocados 28  $\mu$ L do meio de cultura RPMI-BSA 0,01% ou 28  $\mu$ L dos estímulos quimiotáticos separadamente: fMLP, LTB<sub>4</sub> e IL-8 diluídos em RPMI-BSA.

A concentração utilizada para os estímulos em todos os ensaios foi de 10<sup>-7</sup>M, selecionada através da análise da curva dose-efeito da migração de neutrófilos, em resposta a diferentes concentrações dos estímulos quimiotáticos, realizada em voluntárias (Figura 8). Na câmara superior foram colocados 50  $\mu$ L dos neutrófilos purificados normais (1,0  $\times$  10<sup>6</sup> células/mL RPMI/BSA), previamente tratados com diferentes concentrações de soro obtido de voluntárias ou de pacientes com câncer de mama. O ensaio foi feito em triplicata para cada uma das amostras.

As câmaras foram incubadas por 1 h, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após esse tempo a membrana de polycarbonato foi removida, fixada e corada (kit de coloração Hema 3 Stain set, Biochemical Sciences, Bridgeport, NJ). O número de neutrófilos emigrados para a parte inferior do filtro foi contado (objetiva 100x) em 10 campos aleatórios e para cada grupo realizado em triplicada. Os neutrófilos diluídos em RPMI que emigraram em direção aos estímulos quimiotáticos foram considerados como migração direcionada e os que migraram em direção ao RPMI como migração aleatória. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos emigrados por campo.



**Figura 7.** Microcâmara de quimiotaxia. Apresentação das partes da microcâmara de quimiotaxia: câmara inferior, membrana de silicone e câmara superior



**Figura 8.** Curva dose-efeito da migração de neutrófilos em resposta a diferentes concentrações de estímulos quimiotáticos. As barras representam o número de neutrófilos (média ± EPM) emigrados por campo, obtidos de mulheres voluntárias (n=5), em resposta ao RPMI (controle) e a diferentes concentrações molares (10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>) dos estímulos quimiotáticos fMLP, LTB<sub>4</sub> e IL-8 . \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 comparado ao RPMI (ANOVA + Dunnett).

### 3.7 Cultura de leucócitos para avaliação da produção de mediadores inflamatórios

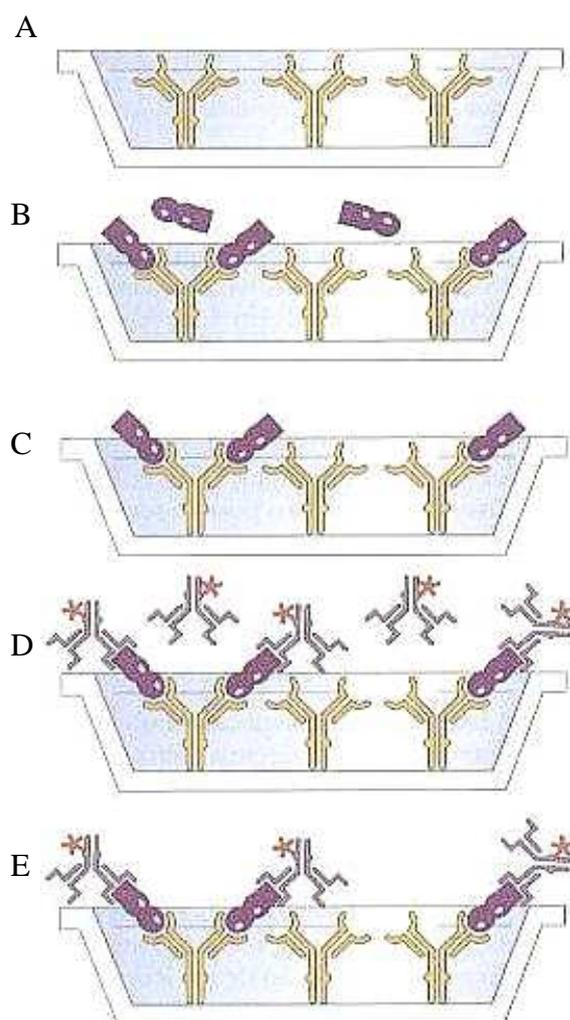
Para avaliar a produção de mediadores inflamatórios por leucócitos circulantes obtidos de mulheres voluntárias sadias (controles) e de pacientes com câncer de mama antes e após tratamento quimioterápico, neutrófilos e células mononucleares ( $1 \times 10^6$ /ml) purificados foram estimulados ou não com endotoxina (LPS *E.coli*, 1  $\mu$ g/ml) e incubados (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) durante 24 e 48 horas em placas de 96 poços. Após cada tempo, as amostras foram transferidas para tubos de centrifuga e a viabilidade celular foi determinada por exclusão em azul de Tripan. Em seguida, a solução foi centrifugada (10 min, 1500 rpm) e os sobrenadantes foram coletados e estocados (-70°C) em amostras de 200  $\mu$ L, até a dosagem dos mediadores realizada através da reação de Griess ou de ensaio imunoenzimático.

### 3.8. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas

O soro dos controles e das pacientes foi obtido por centrifugação (1500 rpm durante 10 min) do sangue total (amostra sem anticoagulante) e estocado em amostras de 200 $\mu$ L em freezer (-70°C), até o dia do experimento.

As concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10 nas amostras de soro ou de sobrenadantes da cultura de leucócitos foram determinadas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Figura 9). Para a captura de anticorpos, placas de 96 poços foram revestidas com 50  $\mu$ L/poço do anticorpo específico para cada uma das citocinas acima, diluídos (1 a 3  $\mu$ g/mL) em solução tampão de ligação (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e incubados por 16-24 h em temperatura de 4°C. As placas foram então lavadas (PBS/Tween 20 0,05%) três vezes e a ligação não-específica foi bloqueada (2 h, 37°C) com PBS/BSA 1% (100  $\mu$ L/poço). As amostras e padrões (curva padrão) foram colocados nas placas (50  $\mu$ L/poço) e incubados por 16-24 h a 4°C. Para a curva padrão foram utilizados anticorpos recombinantes humanos previamente diluídos em PBS/Tween 20 (2,5 a 10  $\mu$ g/mL). As placas foram lavadas e em seguida, foi

adicionado anticorpo anti-citocina biotilado (0,5 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluído em tampão de bloqueio (PBS/BSA 1%). Após 1 h de incubação (37°C), as placas foram lavadas (PBS/Tween 20) e o conjugado avidina-peroxidase previamente diluído em tampão de bloqueio (1:5000) foi adicionado (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ). A placa foi novamente incubada por 30 min em temperatura ambiente. Após este período de tempo as placas foram lavadas e, em seguida, foi realizada a reação de coloração adicionando-se o substrato o-fenilenediamina dihidrocloro - OPD (100  $\mu\text{L}$ ). As placas foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 a 20 min. A reação foi interrompida com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50  $\mu\text{L}$ , 1M) e a absorbância medida a 490 nm em leitor de placa de ELISA. Os resultados foram expressos em picogramas de cada citocina por mililitro de soro ou sobrenadante (BENJAMIM et al., 2000).



**Figura 9.** Ensaio de Imunoabsorção por ligação enzimática “em sanduíche”. Apresentação das etapas de captura de anticorpos (A), adição da amostra ou padrão (B), remoção dos antígenos não ligados (C), detecção de anticorpos (D) e reação de coloração (E). Modificado de Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman – *Imunologia Celular e Molecular*. 5<sup>th</sup> edição. Rio de Janeiro, 2005.

### 3.9. Ensaio colorimétrico para quantificação de metabólitos de óxido nítrico

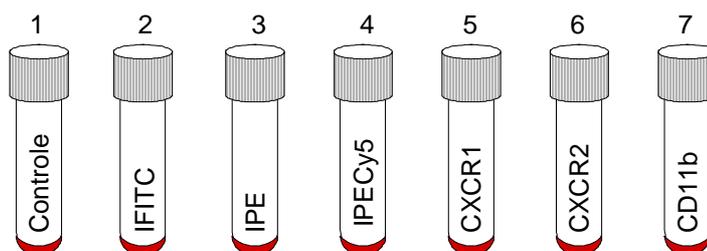
A quantificação do nitrato em amostras de soro obtidas de controles e pacientes foi determinada por meio da redução enzimática do nitrito com a nitrato redutase, conforme descrito (SCHMIDT et al., 1989). As amostras (40  $\mu$ l) foram incubadas com o mesmo volume de tampão redutase (fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5; contendo 1 mM de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo-NADPH, 10 mM de flavina adenina dinucleotídeo-FAD e 4U de nitrato redutase/ml) durante 20 h a 37°C. Uma curva padrão de nitrato foi determinada por incubação de nitrato sódico (10 a 200  $\mu$ M) com tampão. A quantidade total de metabólitos de NO foi então determinada pelo ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN et al., 1981). O mesmo procedimento foi utilizado para a quantificação de nitrito em amostras de sobrenadante, exceto a utilização da enzima nitrato redutase. A absorbância foi medida a 546 nm. Os resultados foram expressos como  $\mu$ M de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) + nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).

### 3.10. Citometria de fluxo para quantificação da expressão de receptores CXCR1, CXCR2 e CD11b na superfície de neutrófilos

#### *Marcação das células*

Amostras de sangue heparinizado de controles e pacientes com câncer de mama foram distribuídas em 7 tubos de FACs (100  $\mu$ L/cada). Anticorpo controle (isotipo) de marcação inespecífica (IgG<sub>2b</sub> - fluorocromo de isotiocianato de fluoresceína (FICT) ou fluorocromo ficoeritrina (PE) ou IgG<sub>1</sub> - fluorocromo de ficoeritrina-cianina 5.1 (PECy5); BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA) foi adicionado aos tubos 2, 3 e 4. Os anticorpos conjugados anti-CXCR1/FITC, anti-CXCR2/PECy5 e anti-CD11b/PE foram adicionados (1  $\mu$ L/cada) aos tubos 5, 6 e 7, respectivamente. No primeiro tubo (tubo 1) nenhuma marcação foi realizada, sendo este considerado como controle negativo (Figura 10).

As amostras foram incubadas em temperatura ambiente e sob proteção da luz durante 30 minutos. As células foram então fixadas com PBS/paraformaldeído (PF) 1% por 5 min e em seguida foi adicionado tampão de lise (3 mL/cada tubo) para realização da lise de hemácias. Os tubos foram levemente agitados e centrifugados a 1200 rpm durante 10 min, procedimento este repetido outras duas vezes. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com tampão PBS/BSA 1% através de centrifugação (1200 rpm, 5 min, 20°C). Após três lavagens, o sobrenadante foi então desprezado e as células foram ressuspensas em 300µL de PBS/PF 1%. As células foram analisadas através de citometria de fluxo (Fluorescence Activated Cell Analyser FACSsort; Becton Dickinson, San Jose, CA - USA).

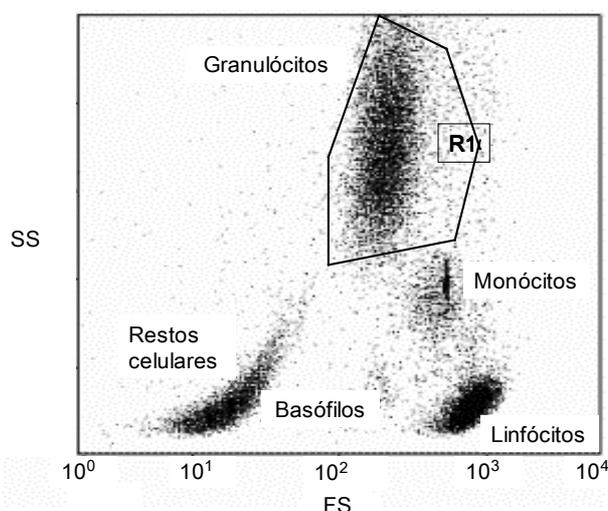


**Figura 10.** Marcação de células para avaliação da expressão de moléculas de adesão e receptores de membrana. Sangue total foi colocado em tubos de FACS (representados por números de 1 a 7). Em cada tubo, à exceção do tubo 1 (controle), foi adicionado anticorpo inespecífico (isotipo (I) conjugado a FITC, PE ou PEcy5) ou anticorpos específicos anti -CXCR1 (tubo 5), -CXCR2 (tubo 6) e -CD11b (tubo 7).

#### *Parâmetros adotados na citometria de fluxo*

Para a leitura e a análise das amostras foi utilizado o *Cell Quest Software*, versão 3.1 (Cell Quest™ Software, Becton Dickinson immunocytometry systems, San Jose, CA, USA) com aquisição de 20.000 eventos utilizando-se uma janela de análise (*gate*) a partir dos parâmetros FSC e SSC (Figura 11). Considerando a *gate* das células de interesse, foram obtidos histogramas de intensidade de fluorescência do respectivo fluorocromo (FITC, PE e/ou Cy5) em escala logarítmica fornecida pelo citômetro.

Os resultados foram fornecidos na forma de porcentagem e número absoluto de células positivas e, de forma quantitativa, foram representados pela intensidade média de fluorescência - razão entre a intensidade média de fluorescência (IMF) da amostra em estudo e do respectivo controle negativo (ARRAES et al., 2006).



**Figura 11.** Histograma de células normais do sangue periférico. O histograma foi obtido em função da positividade de CD<sub>45</sub> lida no *scatter* SS

### 3.11. Quantificação da polimerização de F-actina em neutrófilos estimulados

Neutrófilos purificados de pacientes ( $1 \times 10^6$  células/mL RPMI/BSA) foram incubados na presença ou ausência de IL-8 ( $10^{-7}$ M) por 10 minutos em temperatura ambiente. Para cada amostra foi preparada uma lâmina lapidada com 50  $\mu$ L da solução de células ( $5 \times 10^4$  células) utilizando citocentrífuga (Cito-Spin, Incibrás) durante 5 min e 1000 rpm. Em seguida, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído-sacarose 4% (PF 4%) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após este tempo as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, sendo que para cada lavado foi dada uma pausa de 3 min. As lâminas foram então secadas e armazenadas em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  até o dia da realização do ensaio de citoquímica.

No dia do experimento, as lâminas foram retiradas do gelo e mantidas em

câmara úmida e escura e em temperatura ambiente durante todo procedimento de marcação das células. As lâminas foram inicialmente cobertas por PBS durante 3 minutos, sendo este procedimento repetido outras duas vezes. Após secagem das lâminas as células foram tratadas com PBS-Triton X-100 0,2% e incubadas por 5 minutos. Sem lavagem, as lâminas foram novamente secadas e as células foram tratadas com 100 µL de faloidina conjugada a isotiocianato de rodamina-tetrametil (TRITC; Sigma), previamente diluída em PBS (1:3000). As lâminas foram incubadas por 2 h e, em seguida, lavadas três vezes com PBS por 3 min cada lavado. Lâminas foram montadas sobre as células utilizando solução de N-propilgalactose (20 µM) e glicerol (20%) diluídos previamente em PBS. A polimerização de actina foi então determinada por meio da microscopia de fluorescência (Olympus BX40, Tokyo, Japan) a partir da captura de imagens de células marcadas. Os resultados foram representados através da intensidade média de fluorescência obtida através do *software Image J*.

### **3.12. Análise estatística**

Os dados foram avaliados por meio dos programas *SigmaStat® 2.0*, *GraphPad Prism® 4* e *GraphPad InStat®*. A distribuição das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e os valores expressos em mediana e percentis. Os grupos (controles e pacientes) foram analisados pelo teste de Mann-Whitney e pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparação de mais de dois grupos (tratamento de neutrófilos normais com soro de pacientes em diferentes concentrações). A comparação entre os grupos pareados (antes e após tratamento quimioterápico) foi feita através do teste de Wilcoxon.

Fixou-se o nível de significância em 5% ( $p < 0,05$ ).

### **3.13. Preparo de meios de cultura, soluções, reagentes e drogas**

#### **3.13.1. Meios de cultura, soluções e corantes utilizados para purificação de**

**neutrófilos e ensaio de quimiotaxia**

- a) Meio de cultura RPMI 1640 simples, com glutamina, sem bicarbonato de sódio:

RPMI 1640 (Sigma) .....	10,4 g
Bicarbonato de sódio (Merck) .....	2,2 g
Água bi-destilada e deionizada q.s.p .....	1,0 L

O pH do meio foi acertado para 7,4 e a solução filtrada (filtros de Millipore 0,22 µm) e armazenada em geladeira antes do uso.

- b) Meio de cultura RPMI contendo BSA 0,01%

O meio de cultura foi preparado conforme descrito no item a, acrescido de BSA fração V (Sigma), na concentração de 0,01 g/100 mL, imediatamente antes do uso, e esterilizado por filtros Millipore 0,22 µm antes do uso.

- c) Solução de Turk

Ácido acético glacial P.A. (Merck) .....	20,0 mL
Azul de metileno (Merck).....	0,5 g
Água deionizada Mili-Q q.s.p.....	1,0 L

- d) Corante pancrômico de Rosenfeld

Giemsa-azul-eosina-azul de metileno .....	97,0 mg
May-Grunwald-eosina-azul de metileno .....	53,0 mg
Metanol P.A. (Merck) .....	100,0 mL

Após o preparo, o corante foi filtrado e estocado em temperatura ambiente.

## e) Azul de Tripán

Azul de Tripán (Reagen) .....	100,0 mg
PBS q.s.p. ....	100,0 ml

**3.13.2. Soluções e tampões utilizados durante a realização do ELISA**

## a) Solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10X concentrada

Cloreto de sódio P.A. (Merck) .....	80,0 g
Cloreto de potássio P.A. (Merck) .....	2,0 g
Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck) .....	11,5 g
Fosfato de potássio monobásico P.A. (Merck) .....	2,0 g
Água bi-destilada e deionizada q.s.p. ....	1,0 L

O pH da solução final foi acertado para 7,4 com NaOH 0,1 N e a solução autoclavada (127°C) antes do uso. Para realização dos ensaios a solução foi diluída em água Mili-Q na proporção 1:10.

## b) Solução PBS contendo BSA 1% - tampão de bloqueio

Para preparação do tampão de bloqueio foi utilizado PBS previamente diluído em água Mili-Q (1:10), acrescido de BSA fração V (Sigma), na concentração de 1 g/100 mL. A solução foi esterilizada por filtros Millipore 0,22 µm e preparada imediatamente antes do uso.

## c) Solução tampão de ligação

Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck).....	0,1Molar
Água bi-destilada e deionizada q.s.p. ....	1,0 L

O pH da solução final foi acertado para 9,0 e a solução foi armazenada em geladeira antes do uso.

d) Tampão substrato

Ácido cítrico (Merck) .....	4,7 mM
Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck) .....	66,7 mM
Água bi-destilada e deionizada q.s.p. ....	500,0 mL

O pH da solução final foi acertado para 5,0 com NaOH 0,1 N e a solução foi armazenada em geladeira antes do uso.

e) Solução PBS contendo Tween-20 0,05%

Para preparação da solução foi utilizado PBS previamente diluído em água mili-Q (1:10), acrescido de Tween-20 (Sigma), na concentração de 50 µL/100mL.

f) Substrato para reação de coloração

O-fenilenediamina diidrocloreto (Sigma) .....	0,4 mg
Água oxigenada (Merck) .....	0,4 µL
Tampão substrato <i>q.s.p.</i> .....	1,0 mL

A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

### 3.13.3. Tampões e reagentes para dosagem de NO - reação de Griess

a) Tampão de ensaio para a enzima nitrato redutase

Para 10 mL:

NADPH (Sigma) .....	10,0 mg
Nitrato redutase (Sigma) .....	4,0 U
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5; Merck) .....	4,0 mL (0,5 M)
Água Mili-Q q.s.p. ....	10,0 mL

b) Reagente de Griess

**Solução A**

Sulfanilamida 2% (Sigma) .....	0,5 g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5% (Merck) .....	25,0 mL

**Solução B**

N-1-naftil etilenodiamino dihidroclorato 0,2% (Sigma) .....	0,05 g
Água Mili-Q .....	25,0 mL

**Solução C**

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5% (Merck) .....	25,0 mL
Água Mili-Q .....	50,0 mL

Como estoque estas soluções foram armazenadas a 4°C. Para dosagem foi misturada uma parte da solução A, uma parte da solução B, uma parte da solução C e uma parte da água Mili-Q.

### 3.13.4. Tampões e soluções utilizados para citometria de fluxo

a) Solução PBS contendo Paraformaldeído 1%

Para preparação da solução foi utilizado PBS previamente diluído em água mili-Q (1:10), acrescido de Paraformaldeído (Proquimios), na concentração de 1 mL/100mL. A solução foi preparada e armazenada em geladeira antes do uso.

b) Tampão para lise de hemácias

NH <sub>4</sub> Cl (Merck) .....	8,02 g
NaHCO <sub>3</sub> (Merck) .....	0,84 g
EDTA (Merck) .....	0,37 g
Água Mili-Q q.s.p. ....	1000,0 mL

O pH da solução final foi acertado para 7,5 com NaOH 0,1 N e a solução foi armazenada em geladeira antes do uso.

### 3.13.5. Soluções utilizadas durante o ensaio de citoquímica

#### a) Solução fixadora de células

Paraformaldeído (Proquimios) .....	4%
Sacarose (Sigma) .....	4%
PBS <i>q.s.p.</i> .....	100 mL

#### b) Solução detergente contendo Triton X-100 0,1%

Para preparação da solução foi utilizado PBS previamente diluído em água Mili-Q (1:10), acrescido de Triton X-100 (Sigma), na concentração de 100 µL/100 mL. A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

#### c) Solução PBS contendo faloidina conjugada a TRITC

Solução PBS foi diluída em água Mili-Q (1:10) e acrescida de faloidina-TRITC (Pharmingen), na concentração de 1:1000. A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

#### d) Solução de glicerol

Glicerol (Sigma) .....	80%
Tampão fosfato .....	0,1 M

O pH da solução final foi acertado para 8,0 com NaOH 0,1 N e a solução foi armazenada em geladeira antes do uso.

e) Solução de N-propilgalacto

N-propilgalacto (Merck) ..... 5,0 g  
Solução de Glicerol ..... 100,0 mL

A solução foi aquecida em banho-maria (40°C) durante 15 minutos e, em seguida, agitada até a obtenção de aspecto cristalino. A solução foi estocada em alíquotas de 200 µL em temperatura de -20°C.

### 3.13.6. Drogas, citocinas e anticorpos

- a) fMLP (Sigma): a solução mãe foi preparada na concentração de 5 mg/ml, diluída em 10% de DMSO (dimetil sulfóxido, Sigma) e água estéril. A solução utilizada nos experimentos foi a seguir diluída em RPMI-BSA.
- b) IL-8 (Sigma): um frasco de 10 µg foi diluído em 1250 µL de PBS estéril com BSA 0,1% (10<sup>-6</sup>M). Para o experimento, 90 µL da solução foi diluída em 810 µL de RPMI/BSA 0,01% (10<sup>-7</sup>M).
- c) LTB<sub>4</sub> (Sigma): um frasco de 100 µg foi diluído em 1 mL de etanol. Para o experimento a solução foi diluída em meio RPMI/BSA para obtenção da concentração utilizada.
- d) Anticorpos purificados (Pharmlingen): anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-10 e anti-TNF-α. Anticorpos primários utilizados durante a realização do ELISA.
- e) Citocinas derivadas de DNA recombinante humano (Pharmlingen): IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α. Citocinas utilizadas para realização da curva-padrão durante o ELISA.

- 
- f) Anticorpos biotinilados anti-citocinas (Pharmlingen): anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-10 e anti-TNF- $\alpha$ . Anticorpos secundários utilizados durante a realização do ELISA.
  - g) Anticorpo anti-CXCR1 (Pharmlingen): anticorpo conjugado a FITC, utilizado para marcação de neutrófilos e avaliado através da citometria de fluxo.
  - h) Anticorpo anti-CXCR2 (Pharmlingen): anticorpo conjugado a PECy-5, utilizado para marcação de neutrófilos e avaliado através da citometria de fluxo.
  - i) Anticorpo anti-CD11b (Pharmlingen): anticorpo conjugado a PE, utilizado para marcação de neutrófilos e avaliado através da citometria de fluxo.
  - j) Anticorpos controle  $\gamma 1$  e  $\gamma 2$  (Pharmlingen): anticorpo IgG<sub>2b</sub> conjugado a FITC, anticorpo IgG<sub>2b</sub> conjugado a PE e anticorpo IgG<sub>1</sub> conjugado a PECy-5.

## 4. RESULTADOS



#### 4.1. População do estudo

Foram avaliadas 35 mulheres com diagnóstico de câncer de mama, apresentando idade (média  $\pm$  DP) de  $48,4 \pm 12,3$  anos (27-77) e 17 mulheres sadias como grupo controle com idade de  $48,2 \pm 2,2$  anos (29-65). Dentre as pacientes, pouco mais da metade (51,4%) apresentaram a doença diagnosticada em estádios iniciais (0, I ou IIa) e 48,6% em estádios avançados (IIb, III ou IV) (Tabela 1). Para a maioria dos casos (77,2%) houve indicação de quimioterapia como tratamento inicial das pacientes e 22,8% foram submetidas a tratamento cirúrgico (Tabela 1). Dentre os esquemas quimioterápicos, o uso de antraciclinas (adriamicina ou epirrubicina) ocorreu em 92,6% dos casos e o número de ciclos variou entre 4 (7,4%) e 6 (92,6%), de acordo com a resposta da paciente ao tratamento (Tabela 1).

#### 4.2. Função quimiotática de neutrófilos normais. Efeito do soro de pacientes com câncer de mama após tratamento quimioterápico

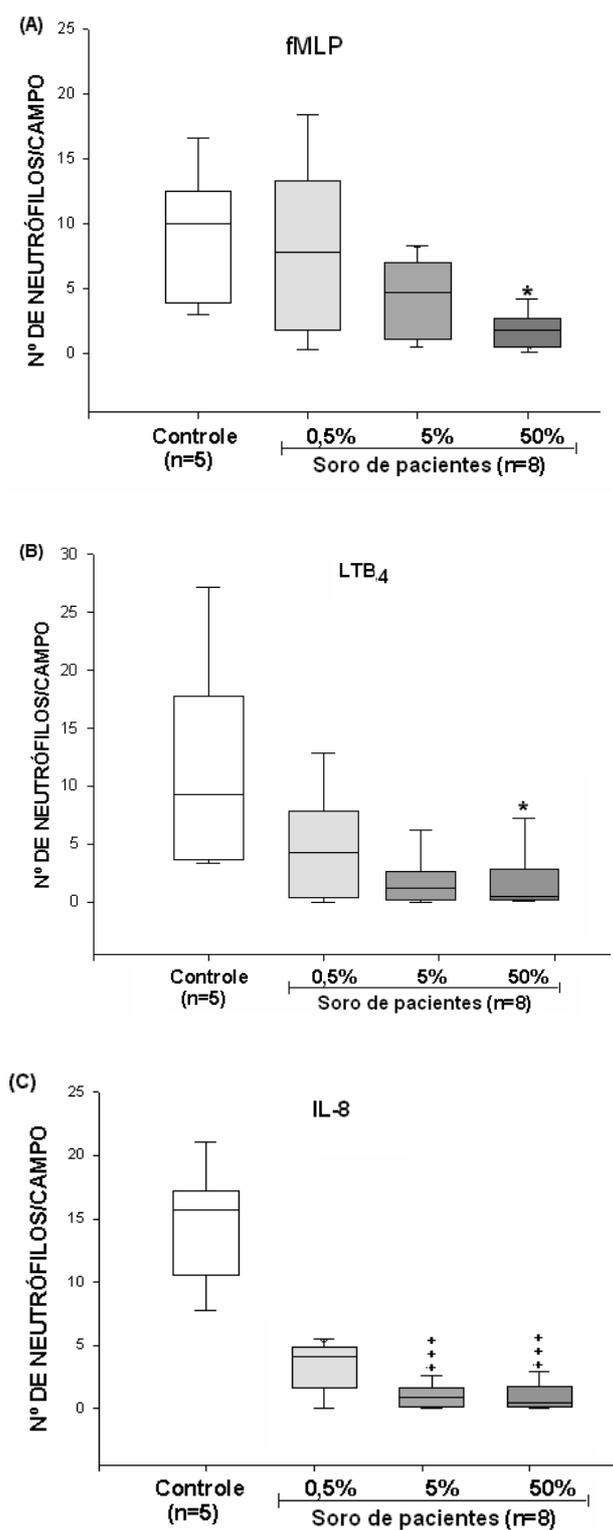
Para avaliar possível participação de fatores circulantes, liberados após a administração de drogas quimioterápicas, sobre a redução da migração de neutrófilos, foi realizado ensaio de quimiotaxia utilizando neutrófilos normais. Essas células, obtidas de 5 mulheres voluntárias sadias ( $46,6 \pm 5,8$  anos, 34-63), foram incubadas com soro heterólogo normal (50%) obtido de outras 5 voluntárias sadias ou diferentes concentrações (0,5, 5 e 50%) de soro de pacientes ( $n=8$ , idade  $48,7 \pm 5,23$  anos, 27-70) obtido no tempo pós-QT.

A Figura 13 mostra o número de neutrófilos normais emigrados em direção aos estímulos fMLP, IL-8 e LTB<sub>4</sub> subtraído dos valores obtidos da migração aleatória (RPMI). Comparando-se a migração de neutrófilos incubados com soro heterólogo normal (controles) à migração de neutrófilos incubados com soro de pacientes, foi observada redução desta migração para fMLP e LTB<sub>4</sub> a partir da menor concentração de soro, atingindo valores significativos com a maior concentração de soro. Em resposta à IL-8, uma redução significativa da quimiotaxia foi observada desde a concentração intermediária (5%).

**Tabela 1.** Identificação das pacientes com câncer de mama quanto á idade, estadiamento tumoral e conduta terapêutica inicial

Pacientes	Idade	Classificação		Tratamento	Esquema Quimioterápico	Nº de ciclos
		TNM	Estadiamento			
1	64	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	Cirurgia	....	....
2	55	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> Mx	IIb	QT	EC	6
3	41	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> Mx	IIa	Cirurgia	....	....
4	46	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	IIIa	QT	EC	6
5	38	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	IIb	QT	EC	6
6	43	T <sub>3</sub> N <sub>2</sub> Mx	IIIb	QT	EC	6
7	41	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	IIb	Cirurgia	....	....
8	41	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> Mx	IIa	QT	EC	6
9	43	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	QT	EC	6
10	43	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> Mx	IIa	QT	EC	6
11	41	T <sub>3</sub> N <sub>3</sub> Mx	IIIc	QT	EC	6
12	49	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	IIb	QT	EC	6
13	64	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> Mx	IIa	Cirurgia	....	....
14	64	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	Cirurgia	....	....
15	31	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	IIa	QT	EC	6
16	30	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> Mx	IIIb	QT	EC	6
17	38	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> Mx	IIIb	QT	EC	6
18	51	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> Mx	IIa	QT	EC	6
19	49	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	IIIb	QT	FEC	6
20	40	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	IIb	QT	EC	6
21	69	T <sub>is</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	0	Cirurgia	....	....
22	37	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	IIa	QT	FEC	6
23	60	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	QT	CMF	6
24	77	T <sub>4</sub> N <sub>3</sub> Mx	IV	QT	EC	6
25	70	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	IIb	QT	CMF	6
26	41	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	IIb	QT	FAC	6
27	61	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	IIb	QT	FAC	6
28	64	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	IIb	QT	FEC	6
29	47	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	IIIa	QT	FAC	6
30	45	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	IIb	QT	AC	4
31	37	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>1</sub>	IIIb	QT	AC	4
32	27	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	IIa	QT	FAC	6
33	49	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	Cirurgia	....	....
34	42	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	Cirurgia	....	....
35	57	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	IIIa	QT	FAC	6

As pacientes foram identificadas por números (1 a 35); estadiamento anátomo-patológico seguiu a recomendação do AJCC e UICC, considerando o tamanho do tumor (T), presença de nodo axilar (N) e/ou metástase (M). As drogas 5-fluorouracil (F), adriamicina (A) e ciclofosfamida (C), associadas entre si (FAC e AC) ou a outros agentes como metotrexato (M) e epirrubicina (E), foram utilizadas no esquema quimioterápico (QT).



**Figura 13.** Migração de neutrófilos normais incubados com soro heterólogo normal (50%) ou diferentes concentrações de soro de pacientes tratadas com QT, em resposta aos estímulos ( $10^{-7}M$ ) fMLP (painel A), LTB<sub>4</sub> (painel B) e IL-8 (painel C) subtraídos da migração aleatória (RPMI). As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis 25% e 75%, e as linhas verticais os valores mínimo e máximo. Kruskal-Wallis + Dunn: \*p < 0,05 e \*\*\*p = 0,001 comparado ao controle.

### 4.3. Concentração sérica de citocinas em pacientes com câncer de mama submetidas ao tratamento quimioterápico

Níveis sistêmicos elevados de citocinas/quimiocinas resultam em efeitos inibitórios sobre a função de leucócitos, incluindo a migração dos neutrófilos, como demonstrado em modelos de sepse (TAVARES-MURTA; CUNHA; FERREIRA, 1998). A quantificação de citocinas foi realizada em amostras de soro de controles (n=7) e de pacientes com câncer de mama (n=16) submetidas à quimioterapia, obtidas imediatamente antes do início do tratamento (pré-QT) e 21 dias após o 3º ou 4º ciclo (pós-QT). A Tabela 2 mostra que os níveis séricos (mediana; 25% -75%) de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 não apresentaram alterações significativas comparando-se os grupos de controles e pacientes no momento do diagnóstico e os tempos pré e pós tratamento. Foi observado aumento da concentração sérica de IL-8 no grupo de pacientes antes do tratamento, comparado ao grupo controle (Mann-Whitney, p=0,02), porém sem alterações significativas comparando-se os tempos pré e pós QT.

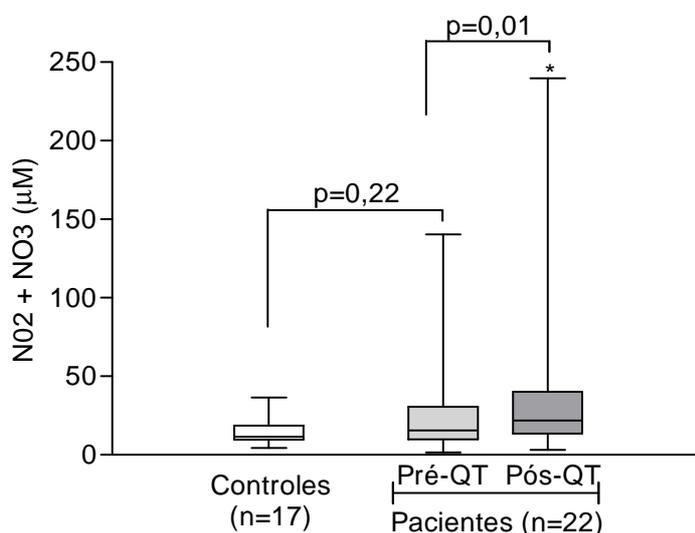
**Tabela 1. Concentração de citocinas no soro de controles e pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia.**

Citocinas	Controles (n=7)	Pacientes (n=16)	
		Pré-QT	Pós-QT
TNF- $\alpha$	0,0 (0,0 - 241,1)	36,5 (0,0 - 195,0)	34,5 (0,0 - 92,5)
IL-6	10,0 (0,0 - 98,1)	12,0 (0,0 - 107,5)	78,3 (0,0 - 101,0)
IL-8	0,0 (0,0 - 28,3)	34,8 (0,0 - 100,5)*	8,8 (0,0 - 30,5)
IL-10	25,5 (0,0 - 133,8)	26,2 (0,0 - 89,5)	24,5 (0,0 - 116,0)

Os valores representam as medianas e os valores mínimo e máximo dos níveis de citocinas detectadas em amostras de soro obtidas de mulheres voluntárias sadias (controles) e pacientes com câncer de mama antes (pré-QT) e 21 dias após o 3º ou 4º ciclo de quimioterapia (pós-QT). Mann-Whitney: \*p=0,02 comparado ao grupo controle.

#### 4.4. Concentração sérica de metabólitos de NO em pacientes com câncer de mama submetidas a tratamento quimioterápico

O aumento sérico de NO em pacientes com infecção de diferentes etiologias pode mediar a redução da migração de neutrófilos para o sítio de infecção (BONE; GRODZIN; BARK, 1997). A Figura 15 mostra a concentração dos metabólitos de NO quantificados em amostras de soro obtidas de 17 mulheres saudáveis e de 22 pacientes em dois tempos: (1) antes do 1º ciclo de quimioterapia (pré-QT) e (2) 21 dias após o término do 3º ou 4º ciclos, após recuperação da aplasia medular (pós-QT). Não foi observada diferença significativa entre os valores de medianas e percentis obtidos para os controles e as pacientes no momento do diagnóstico. Foi observado aumento dos níveis séricos de NO (mediana; 25% - 75%) no tempo pós-QT (27,2; 18,3 - 45,6) comparado ao tempo pré-QT (18,4; 11,1 - 29,8) ( $p=0,01$ , Wilcoxon).

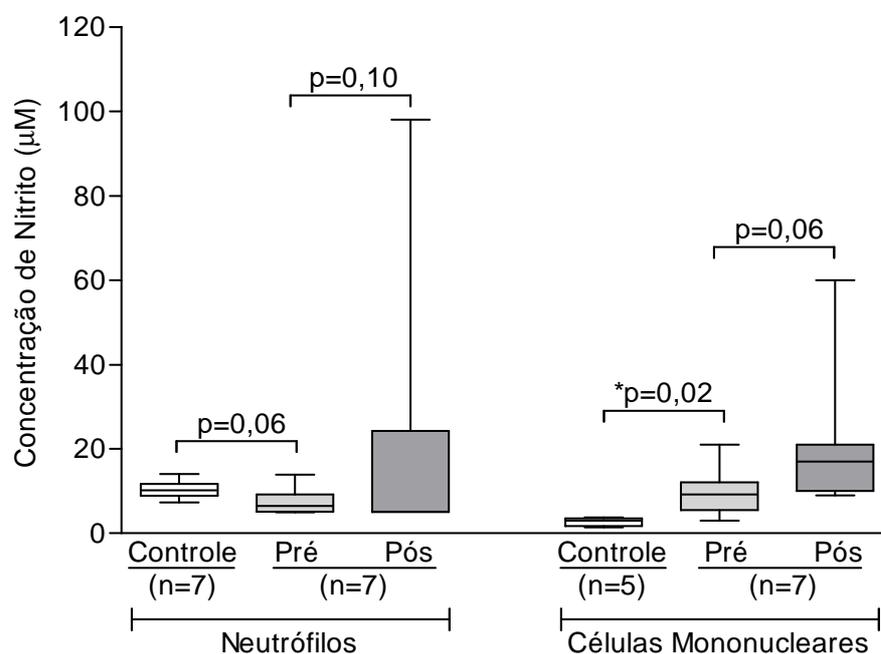


**Figura 15.** Concentração sérica de metabólitos de NO em mulheres saudáveis (controles) e pacientes com câncer de mama submetidas ao tratamento quimioterápico, comparando-se (a) controles e pacientes antes (pré-QT) do tratamento e (b) pacientes nos tempos pré e pós (pós-QT) quimioterapia (QT). As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis 25% e 75%, e as linhas verticais os valores mínimo e máximo. Mann-Whitney:  $p=0,22$ ; Wilcoxon:  $*p=0,01$ .

#### **4.5. Produção de óxido nítrico nos sobrenadantes de leucócitos de pacientes com câncer de mama submetidas a tratamento quimioterápico.**

Para avaliar os leucócitos envolvidos no aumento da produção sistêmica de NO em pacientes com câncer de mama após tratamento quimioterápico, a concentração de nitrito foi quantificada nos sobrenadantes obtidos da cultura de neutrófilos e células mononucleares previamente estimuladas com LPS. Os leucócitos foram obtidos de mulheres saudáveis (n=7, controles) e de pacientes (n=7) antes do tratamento (pré-QT) e 21 dias após o 3º ou 4º ciclos de QT (pós-QT).

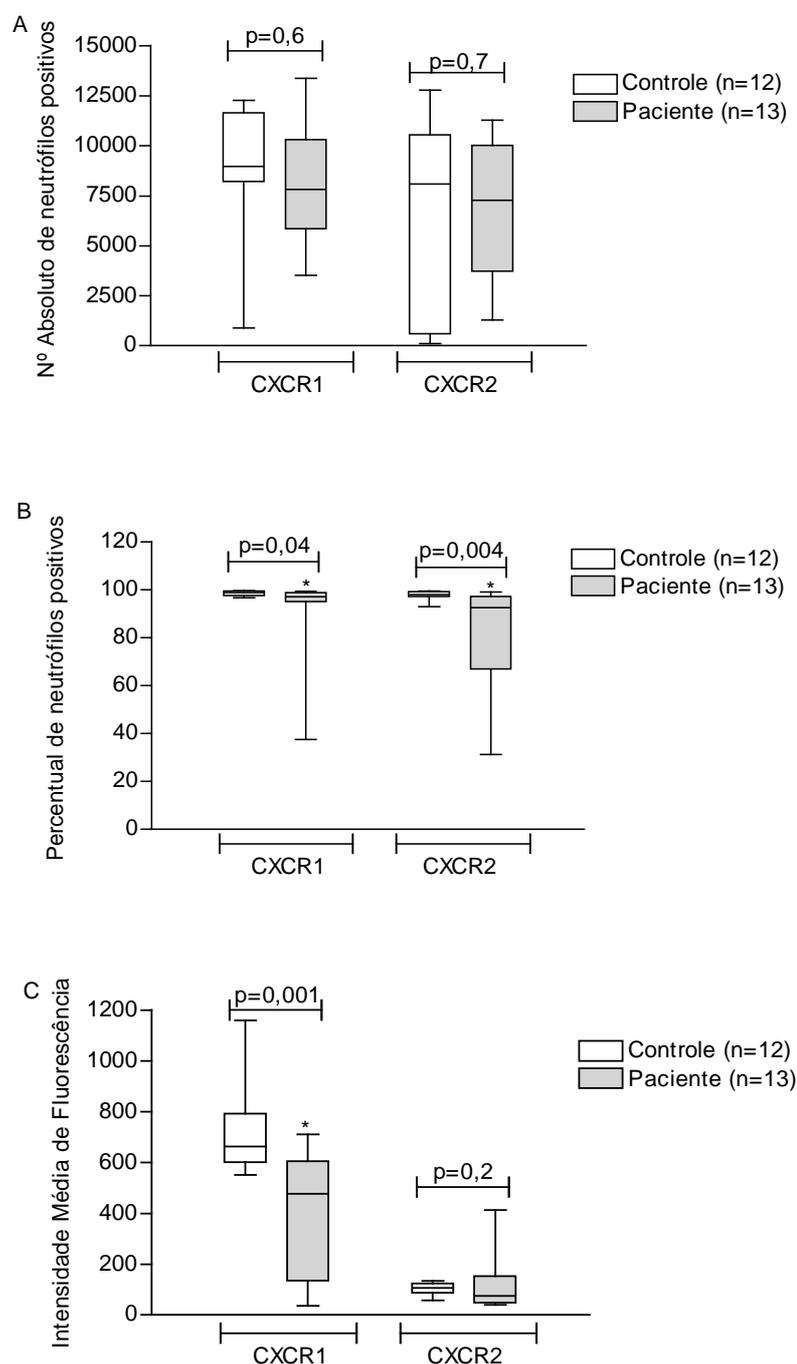
A concentração de nitrito nos sobrenadantes de neutrófilos apresentou-se reduzida, embora de maneira não significativa, em amostras de pacientes obtidas no momento do diagnóstico e comparado ao grupo controle (p=0,06, Mann-Whitney). Após a quimioterapia houve aumento na produção de nitrito, porém sem diferença entre os tempos pré e pós-QT (p=0,1, Wilcoxon) (Figura 16, painel esquerdo). Considerando a produção de NO por células mononucleares, foi observado aumento significativo da concentração de nitrito já no momento do diagnóstico, comparado aos níveis detectados em mulheres controles (p=0,02, Mann-Whitney). No grupo de pacientes submetidas à quimioterapia foi demonstrado aumento da produção de nitrito no tempo pós-QT comparado aos níveis observados no tempo pré-QT, no limiar da significância estatística (p=0,06, Wilcoxon) (Figura 16, painel direito).



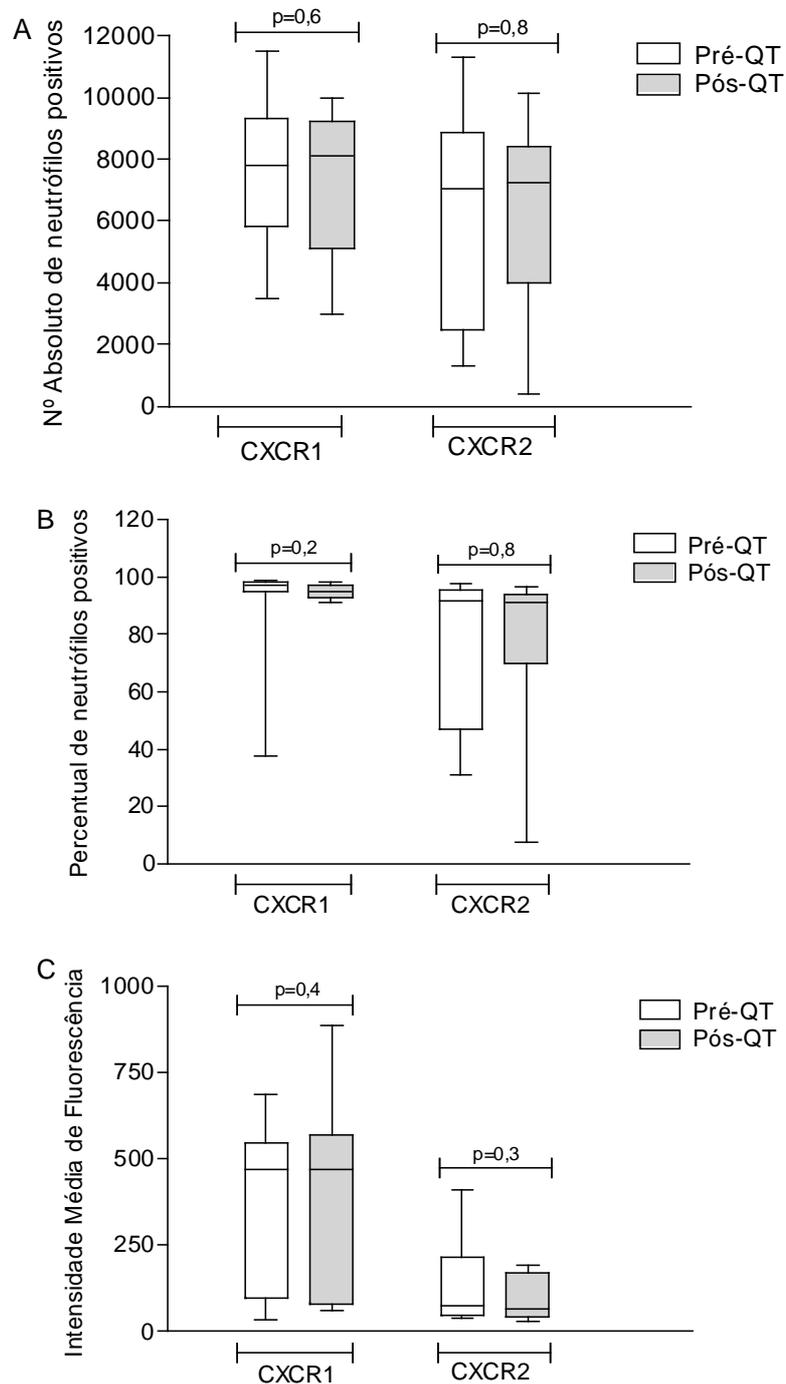
**Figura 16.** Concentração de nitrito nos sobrenadantes da cultura de neutrófilos e células mononucleares obtidas de mulheres voluntárias sadias (n=7, controle) e pacientes com câncer de mama submetidas ao tratamento quimioterápico (n=7), comparando-se os tempos antes (pré-QT) e após (pós-QT) tratamento quimioterápico (QT). Os leucócitos ( $1 \times 10^6$ /ml) foram previamente estimulados com endotoxina (LPS *E. Coli*, 10 µg/mL). As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis 25% e 75%, e as linhas verticais os valores mínimo e máximo. Mann-Whitney:  $p=0,06$  para neutrófilos e  $*p=0,02$  para mononucleares; Wilcoxon:  $p=0,1$  para neutrófilos e  $p=0,06$  para mononucleares.

#### **4.6. Expressão dos receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2 na superfície de neutrófilos obtidos de pacientes com câncer de mama antes e após tratamento quimioterápico**

Para avaliar se a redução da resposta quimiotática de neutrófilos observada em pacientes com câncer de mama submetidas à QT está relacionada à alteração da expressão dos receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2, foi avaliada a expressão destes receptores em pacientes no diagnóstico da doença, ou seja, antes de qualquer tratamento antineoplásico. Neste grupo (n=13), comparado aos controles (n=12), foi observada redução ( $p < 0,05$ , Mann Whitney) tanto da intensidade média de fluorescência quanto do percentual de células positivas para CXCR1 (Figura 17, painéis B e C). Para CXCR2, foi observada redução da intensidade média de fluorescência ( $p = 0,004$ , Mann Whitney) em neutrófilos obtidos das pacientes comparado ao grupo controle. Dentre as pacientes acompanhadas durante tratamento quimioterápico (n=10) não foi encontrada alteração significativa na expressão dos receptores de membrana, comparado ao tempo pré tratamento, e considerando as diferentes formas de representação quantitativa da expressão de CXCR1 ou CXCR2 (Figura 18, painéis A, B e C).



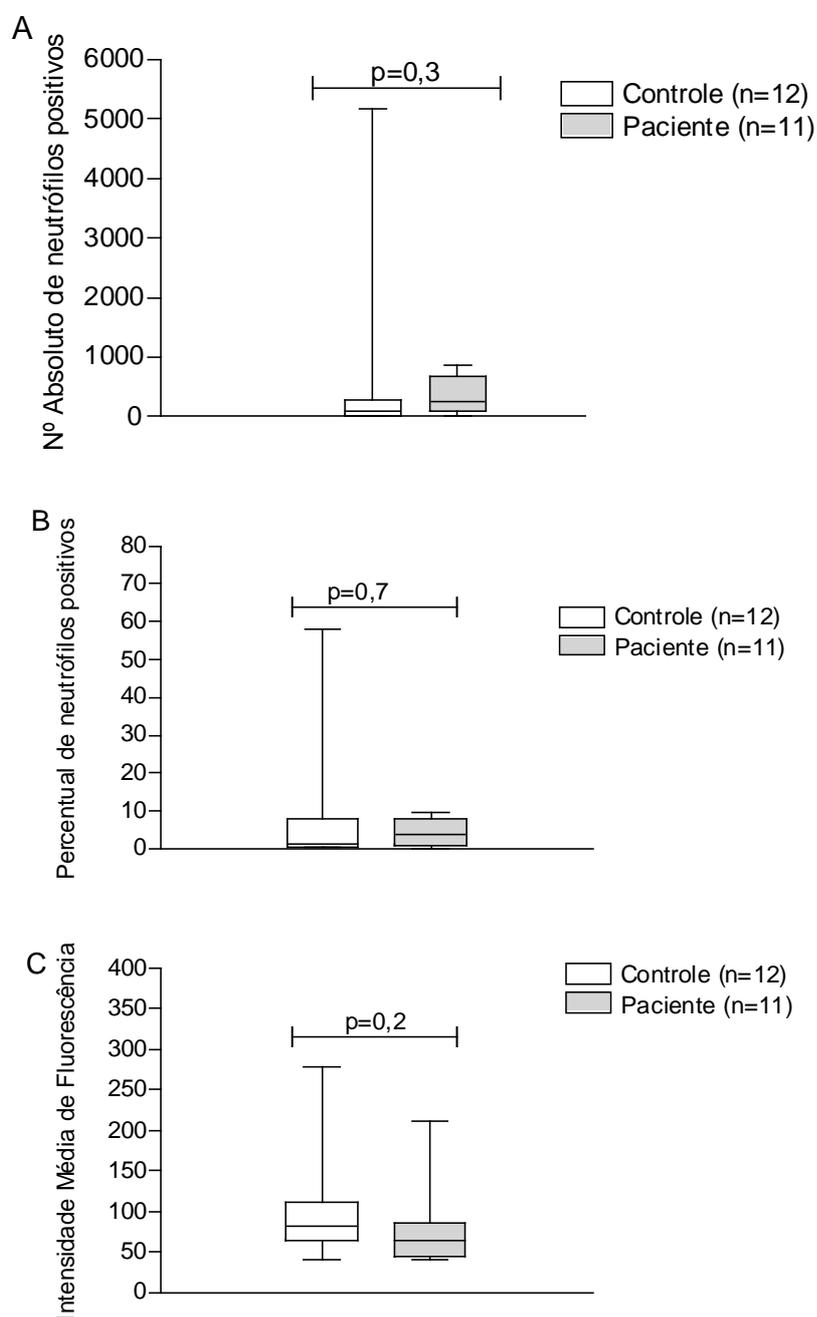
**Figura 17.** Expressão de receptores CXCR1 e CXCR2 em neutrófilos obtidos de controles e pacientes com câncer de mama no diagnóstico. Os resultados foram expressos como número absoluto (painel A) e percentual (painel B) de neutrófilos positivos e intensidade média de fluorescência (painel C) para expressão dos receptores. As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis 25% e 75%, e as linhas verticais os valores mínimo e máximo. Mann-Whitney: valores de  $p$  apresentados acima das respectivas barras de acordo com o grupo em comparação.



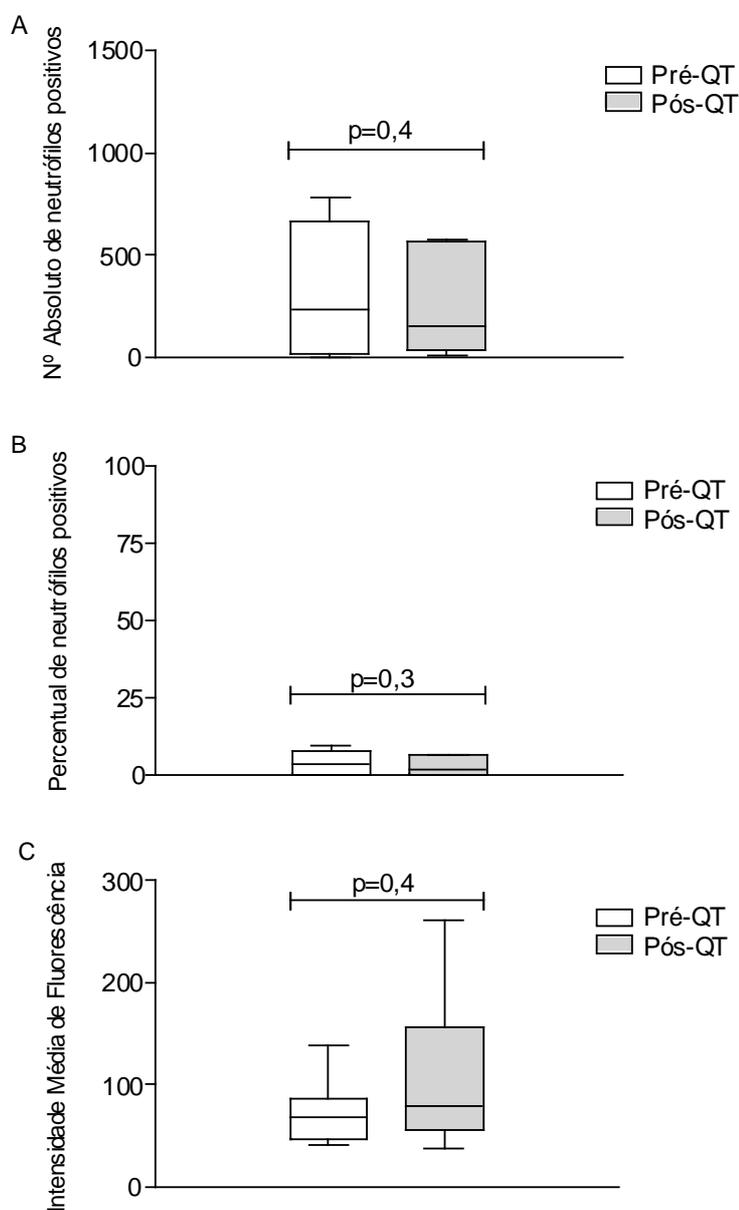
**Figura 18.** Expressão de receptores CXCR1 e CXCR2 em neutrófilos de pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia (n=10), comparando-se os tempos antes (pré-QT) e após (pós-QT) tratamento. Os resultados foram expressos como número absoluto (painel A) e percentual (painel B) de neutrófilos positivos e intensidade média de fluorescência (painel C) para expressão dos receptores. As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis 25% e 75%, e as linhas verticais os valores mínimo e máximo. Wilcoxon:  $p>0,05$ .

#### **4.7. Expressão da molécula de adesão CD11b em neutrófilos de pacientes com câncer de mama antes e após tratamento quimioterápico**

Em neutrófilos obtidos de pacientes com deficiência de integrinas Mac-1 ou neutrófilos tratados com anticorpos anti-integrinas, observa-se redução da capacidade de adesão celular ao endotélio e conseqüente redução da transmigração (SMITH et al., 1988). Neste estudo foi avaliada a expressão da integrina CD11b em neutrófilos obtidos de controles (n=12) e pacientes com câncer de mama no momento do diagnóstico (n=11) e após tratamento quimioterápico (n=8). A figura 19 mostra que a expressão de CD11b está preservada no grupo de pacientes comparado ao grupo controle e considerando todas as formas de representação quantitativa. No grupo de pacientes que foram submetidas à quimioterapia não foi observada alteração na expressão da integrina CD11b no tempo pós-QT, comparado ao tempo pré-QT (Figura 20). Esta observação também se aplica para todos os parâmetros quantitativos adotados.



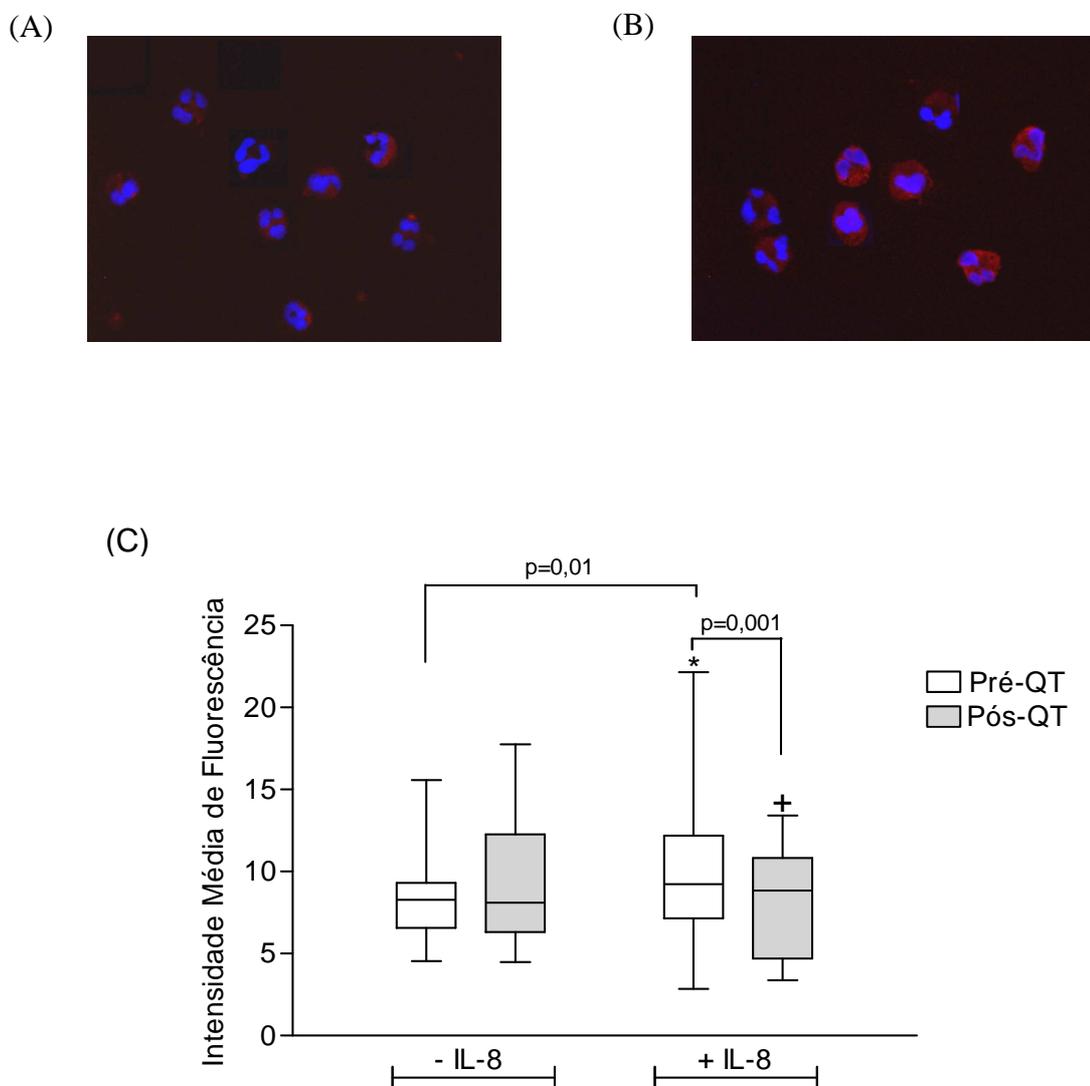
**Figura 19.** Expressão de CD11b em neutrófilos obtidos de controles e pacientes com câncer de mama no diagnóstico. Os resultados foram expressos como número absoluto (painel A) e percentual (painel B) de neutrófilos positivos e intensidade média de fluorescência (painel C) para expressão de CD11b. As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis 25% e 75%, e as linhas verticais os valores mínimo e máximo. Mann-Whitney: valores de  $p$  apresentados acima das respectivas barras de acordo com o grupo em comparação.



**Figura 20.** Expressão de CD11b em neutrófilos de pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia (n=8), comparando-se os tempos antes (pré-QT) e após (pós-QT) tratamento. Os resultados foram expressos como número absoluto (painel A) e percentual (painel B) de neutrófilos positivos e intensidade média de fluorescência (painel C) para expressão de CD11b. As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis 25% e 75%, e as linhas verticais os valores mínimo e máximo. Wilcoxon:  $p > 0,5$ .

#### **4.8. Análise da polimerização de F-actina em neutrófilos obtidos de pacientes com câncer de mama antes e após quimioterapia**

Durante a migração celular, modificações no citoesqueleto de actina permitem às células o movimento em direção ao estímulo quimiotático. Em resposta a estímulos externos há um remodelamento dinâmico do citoesqueleto favorecendo alterações na forma e motilidade celular, além da transdução de sinais (VAN HAASTERT; DEVREODS, 2004). Foi avaliada possível alteração na polimerização dos filamentos de actina em neutrófilos obtidos de pacientes (n=11) com câncer de mama submetidas à QT, comparando-se células não estimuladas (Figura 21A) e células estimuladas por IL-8 (Figura 21B). A Figura 21C mostra que no tempo pré-QT os neutrófilos estimulados por IL-8 apresentaram aumento da polimerização de F-actina, comparado às células não estimuladas ( $p=0,01$ , teste de Wilcoxon). A análise no tempo pós-QT mostra que a polimerização de actina em neutrófilos estimulados foi semelhante ao observado nas células não estimuladas ( $p=0,09$ , teste de Wilcoxon) e que houve redução da polimerização de actina (mediana, percentis 25-75 da IMF) no tempo pós-QT (8854, 4717 - 10817) comparado ao tempo pré-QT (9231, 7159 - 12120) ( $p=0,001$ , teste de Wilcoxon).



**Figura 21.** A polimerização de actina foi avaliada através de citofluorescência em neutrófilos obtidos de pacientes com câncer de mama (n=11) nos tempos pré e pós-QT. Os neutrófilos foram estimulados (painel B) ou não (painel A) por IL-8 ( $10^{-8}$ M), o núcleo celular foi corado pelo DAPI (cor azul) e os filamentos de actina pela faloidina-TRITC (cor vermelha). Os painéis A e B mostram imagens representativas de pelo menos 5 experimentos independentes. A intensidade de fluorescência da actina foi quantificada e os resultados foram expressos como mediana e percentis (painel C), comparando-se células sem estímulos (- IL-8) e estimuladas (+ IL-8). Wilcoxon: \* $p=0,01$  e + $p=0,001$ .

## 5. DISCUSSÃO



Os neutrófilos são as principais células efetoras durante a fase aguda da resposta inflamatória e são considerados como a subpopulação de leucócitos mais importante na determinação do risco de infecção (revisto por LEHRNBECHER et al., 2008). Pacientes com câncer de diferentes sítios primários podem apresentar alterações em funções de neutrófilos, as quais podem ser causadas pela própria doença desencadeante (RICHARDS et al., 2006; FERNANDES Jr et al., 2007) e/ou pelo tratamento quimioterápico instituído (EK et al., 2005). Em trabalhos anteriores demonstramos que neutrófilos obtidos de mulheres com câncer de mama em diferentes estadiamentos apresentaram capacidade de migração preservada no momento do diagnóstico, comparado a mulheres voluntárias. Porém, o tratamento quimioterápico reduziu a migração de neutrófilos frente aos diferentes estímulos fMLP, IL-8 e LTB<sub>4</sub> (MENDONÇA et al., 2006). A partir destes resultados surgiu a hipótese de que o tratamento quimioterápico pode estimular a liberação de mediadores na circulação sistêmica que, por diferentes mecanismos, poderiam favorecer a redução da migração de neutrófilos observada nas pacientes.

Para investigar a possível presença de mediadores inibitórios no soro de pacientes tratadas com drogas quimioterápicas, neutrófilos obtidos de controles foram incubados com soro das pacientes. Sendo que este soro foi coletado no tempo mínimo de 21 dias após o ciclo de quimioterapia, quando considera-se que já houve recuperação da aplasia medular para a maioria das drogas (CLEATOR; PARTON; DOWSETT, 2002). Neste período também já houve depuração das drogas do organismo, considerando que sua meia-vida é variável de 30 min para epirrubicina e adriamicina e 8 a 10 horas para metotrexato, 5-fluorouracil e ciclofosfamida (CALABRESI; CHABNER, 2001). Observamos que os neutrófilos normais incubados com soro heterólogo normal (controle) responderam aos estímulos quimiotáticos (fMLP, LTB<sub>4</sub> e IL-8) quando comparado à migração aleatória (RPMI). Porém, após incubação com diferentes concentrações de soro de pacientes tratadas, houve redução da migração de neutrófilos de forma dose-dependente, em resposta aos diferentes quimioatraentes (Figura 13).

Trabalhos descritos em literatura demonstram a participação de diversos mediadores na modulação do recrutamento de neutrófilos. Citocinas e quimiocinas

como TNF- $\alpha$  e IL-8, quando presentes nos tecidos, medeiam a defesa local do organismo devido à indução da migração e ativação de neutrófilos (CUNHA; FERREIRA, 1986; RIBEIRO et al., 1991). Por outro lado, altas concentrações circulantes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (GOGOS et al., 2000), citocina antiinflamatória IL-10 (VAN DER POLL et al., 1997) e metabólitos de NO podem reduzir a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, como demonstrado em modelos de endotoxemia e sepse (OTSUKA et al., 1990; TAVARES-MURTA; CUNHA; FERREIRA, 1998). Baseado nessas informações, como etapa seguinte procuramos identificar possível aumento de mediadores circulantes como citocinas e NO em pacientes submetidas ao tratamento quimioterápico. Para isso, foram quantificados no soro os metabólitos de NO e citocinas pró e antiinflamatórias em dois tempos: (1) antes do 1º ciclo de quimioterapia (pré-QT), ou seja, no momento do diagnóstico e antes de qualquer tratamento antineoplásico e (2) 21 dias após o término do 3º ou 4º ciclo, após recuperação da aplasia medular (pós-QT).

À exceção da IL-8, não foram verificadas diferenças significativas entre os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 comparando-se controles e pacientes no momento do diagnóstico (Tabela 2). Os dados de literatura são ainda controversos em relação à produção sistêmica de citocinas em pacientes com câncer. Em mulheres com câncer de mama, os níveis circulantes de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  não apresentaram diferenças estatísticas quanto aos valores obtidos para voluntárias saudáveis (PUSZTAI et al., 2004). Ao contrário, outros estudos em pacientes com câncer de mama (LYON et al., 2008) ou de ovário (GORELIK et al., 2005), demonstram aumento significativo das concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  comparado aos controles. Sugere-se que essas discrepâncias possam ser resultantes da limitação de métodos utilizados para detecção de citocinas (LYON et al., 2008).

Outra possível explicação para as diferenças de resultados descritos na literatura, em relação a concentrações sistêmicas de mediadores em pacientes com câncer, pode ser decorrente do estadiamento do tumor. Já foi sugerido que o aumento de funções leucocitárias, tais como produção de citocinas, poderia ser resultado da ativação do sistema imune celular em resposta à célula tumoral, em fases iniciais (SUSS, BAKACS; RINGWALD, 1984), enquanto que a redução nessas

funções seria, principalmente, conseqüência da progressão da doença (GEBHARD et al., 2000).

Considerando as pacientes submetidas à quimioterapia, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10) comparando-se os tempos antes e após o tratamento (Tabela 2). Em acordo com estes resultados, em pacientes com câncer de mama o uso de 5-fluorouracil, adriamicina e ciclofosfamida, mesmas drogas utilizadas neste estudo, não alterou a concentração sérica de IL-6 e IL-8 considerando os valores obtidos antes da quimioterapia (PUSZTAI et al., 2004). Em outro estudo em pacientes com câncer de mama, o uso de taxanos (paclitaxel e docetaxel) aumentou os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 e GM-CSF após quimioterapia e recuperação da aplasia da medula óssea (TSAVARIS et al., 2002). Em pacientes com câncer de pulmão, o uso de cisplatina aumentou de maneira significativa a produção de IL-10 (YANAGAWA et al., 1999), IL-6 e G-CSF (ENDO et al., 2004), comparando-se os tempos pré e pós-QT.

Porém, a ausência de um mediador na circulação em um momento específico não exclui a possibilidade de que a motilidade dos neutrófilos tenha sido afetada pelo mesmo mediador liberado em tempos anteriores ao avaliado. Além disso, é possível que, *in vivo*, os mediadores envolvidos possam modular a resposta imune de maneira parácrina e não endócrina.

Em pacientes com câncer de mama previamente submetidas à quimioterapia foi demonstrada redução da mobilização de células progenitoras da medula óssea e, desde que o plasma destas pacientes também inibiu a mobilização celular, os autores sugeriram que um fator circulante poderia ser responsável por este efeito (DEMIRKAZIK et al., 2002). Embora a natureza de tais inibidores seja incerta, a participação do fator transformador do crescimento (TGF)- $\beta$  é sugerida (DEMIRKAZIK et al., 2002) pois esta citocina antiinflamatória pode levar a uma regulação decrescente da atividade de leucócitos. Plasma obtido de pacientes que receberam transfusão sanguínea inibiu a migração de neutrófilos normais, sendo este efeito associado ao aumento de TGF- $\beta$  nas amostras avaliadas (GHIO et al., 2003). Outro mediador envolvido na redução da migração de neutrófilos é a  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida (AGP). Recentemente foi demonstrado que a proteína de fase

aguda AGP, isolada do soro de pacientes sépticos, inibiu a migração de neutrófilos induzida por carragenina para a cavidade peritoneal de ratos. Além disso, a incubação de AGP com neutrófilos normais inibiu a quimiotaxia dessas células e este efeito foi associado ao aumento da produção de NO (MESTRINER et al., 2007).

O NO é uma pequena molécula gasosa e altamente hidrofóbica. Sua síntese em mamíferos resulta da oxidação da L-arginina realizada por ação de enzimas conhecidas como sintases de NO (NOS). Três isoformas de NOS são descritas: neuronal (nNOS ou tipo I), induzida (iNOS ou tipo II) e endotelial (eNOS ou tipo III). As isoformas eNOS e nNOS são constitutivamente expressas, enquanto iNOS pode ser induzida durante respostas inflamatória e imune por lipopolissacarídeo bacteriano e citocinas, tais como quimiocinas, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interferon (INF)- $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

Vários trabalhos evidenciam a participação do NO na modulação do recrutamento de leucócitos. Inibidores da enzima NOS ou deleção gênica de iNOS em camundongos são capazes de aumentar a migração de neutrófilos até o sítio inflamatório em resposta a vários estímulos (BENJAMIM et al., 2002; SECCO et al., 2003). Em modelos de sepse, o pré-tratamento de animais com aminoguanidina, inibidor seletivo de iNOS, preveniu a falência da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, comparado ao grupo de animais não tratados (BENJAMIN; CUNHA; FERREIRA, 2000; TAVARES-MURTA; MACHADO; CUNHA, 2001).

Além de seus efeitos em doenças infecciosas, o NO também participa da regulação da resposta imune celular em pacientes com câncer. Em mulheres com neoplasia cervical, comparado a controles, foi verificada inibição da migração de neutrófilos circulantes e aumento sérico de NO, sugerindo a associação entre esses eventos (FERNANDES et al., 2007). Em pacientes com câncer gástrico, os níveis sistêmicos dos metabólitos de NO encontram-se aumentados comparado ao grupo controle (DINCER et al., 2006). Em nosso estudo não encontramos diferenças na produção sistêmica de NO, através da quantificação de metabólitos de NO, entre controles e pacientes (Figura 15). Porém, no grupo de pacientes submetidas ao tratamento quimioterápico foi observado significativo aumento dos níveis séricos de NO (nitrito e nitrato), comparado à concentração obtida antes do tratamento (Figura

15). Em acordo com esses resultados, em camundongos com carcinoma gastrointestinal induzido por linhagens de células tumorais, houve aumento significativo da concentração sérica de NO após o uso de doxorrubicina sendo a quantificação do mediador realizada após recuperação da aplasia medular (SAYED-AHMAD; SHOUMAN; RAMADAN, 2002).

Para identificar as células circulantes capazes de produzir NO, a produção de nitrito foi quantificada nos sobrenadantes de neutrófilos e células mononucleares obtidos de controles e pacientes com câncer de mama tratadas com quimioterapia. A concentração de nitrito nos sobrenadantes de neutrófilos não foi modificada pela doença ou pelo tratamento (Figura 16). Já em sobrenadantes de células mononucleares foi observado aumento significativo da concentração de nitrito no momento do diagnóstico e, no limiar da significância estatística, no tempo pós-QT (Figura 16).

Em pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral, comparado a controles, ocorreu redução da produção de NO e da expressão de iNOS tanto em sobrenadantes da cultura de neutrófilos quanto de células mononucleares (JABLONSKA et al., 2005). Em pacientes com leucemia linfocítica, comparado a controles, também foi observada redução da produção de NO em sobrenadantes de neutrófilos e células mononucleares, apesar do aumento da expressão de iNOS (JABLONSKA et al., 2006).

Além dos efeitos sistêmicos, a quimioterapia é capaz de alterar direta ou indiretamente o padrão de produção de mediadores no microambiente tumoral. A indução de iNOS pela QT em tumores sólidos está associada ao aumento local da produção de NO e é considerado evento chave na resposta citotóxica e citostática desses mediador às células tumorais (CHUNG et al., 2001).

Além do NO, as drogas quimioterápicas estimulam a produção de citocinas no sítio tumoral, as quais parecem participar do efeito tumoricida promovido pelo NO. Em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia foi demonstrada correlação significativa entre os níveis de NO, citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$ ) e efeitos antiproliferativos e apoptóticos supressores de tumor (COSKUN, 2004). Considerando que o NO é uma molécula gasosa, portanto de fácil difusão pelas

membranas biológicas, não se pode descartar que o aumento sérico de NO pós QT seja também consequência da produção do mediador no microambiente tumoral.

O recrutamento de neutrófilos para o local de injúria constitui um evento essencial no controle de qualquer lesão tecidual (VOLLMER; MANDELL, 1993). Quimiocinas CXC, tais como a IL-8, apresentam papel central na mediação da cascata de sinalização que direciona os neutrófilos até o sítio de lesão após sua ligação a receptores expressos na superfície desses leucócitos (HARADA et al., 1994). Sendo assim, uma regulação decrescente de receptores de quimiocinas ou não responsividade às quimiocinas pode contribuir para o efeito inibitório sobre o recrutamento de neutrófilos. Neste contexto, em pacientes com sepse foi demonstrada redução da quimiotaxia de neutrófilos frente ao estímulo CXCL8 (IL-8) (ARRAES et al., 2006) e regulação decrescente da expressão de CXCR2 (RIOS-SANTOS et al., 2007) na membrana desses leucócitos. No último estudo foi demonstrado claramente que a regulação inibitória da expressão de CXCR foi dependente de NO (RIOS-SANTOS et al., 2007).

Considerando essas evidências em pacientes com sepse, em conjunto com a redução da migração de neutrófilos observada em pacientes com câncer de mama submetidas à QT (MENDONÇA et al., 2006) e o aumento sérico de NO detectado em nossas amostras após tratamento quimioterápico, procuramos investigar a expressão dos receptores CXCR1 e CXCR2 em neutrófilos obtidos de controles e pacientes tratadas com QT.

No momento do diagnóstico, comparado aos controles, neutrófilos obtidos de pacientes com câncer de mama, em diferentes estadiamentos, apresentaram redução significativa do percentual de células positivas e/ou da intensidade média de fluorescência dos receptores CXCRs (Figura 17). A redução observada neste momento (pré-QT) foi mantida em valores muito semelhantes após a quimioterapia (Figura 18). Estes resultados sugerem que, neste grupo amostral, o câncer contribuiu para alterações na expressão de receptores de membrana CXCRs em leucócitos circulantes, sendo esta redução mantida durante o tratamento quimioterápico. É possível que esta alteração seja consequência de fatores circulantes liberados inicialmente em resposta ao tumor. Por exemplo, em nosso estudo foi detectado

aumento da concentração sérica de IL-8 em amostras de pacientes obtidas antes do tratamento quimioterápico e comparado ao grupo controle (Tabela 2). Este aumento foi detectado nas mesmas amostras em que foram analisados os receptores, sugerindo associação entre os eventos.

A IL-8 é uma quimiocina produzida por vários tipos celulares e reconhecida, particularmente, por sua habilidade em atrair e ativar neutrófilos no sítio inflamatório (FURIE; RANDOLPH, 1995). Os leucócitos, quando expostos ao contato contínuo ou a concentrações aumentadas de quimioatraentes, tornam-se gradativamente não responsivos. Este processo ocorre em consequência da dessensibilização dos receptores cujo mecanismo envolve, especialmente, prolongamento do tempo de internalização dos receptores (RICHARDSON et al., 1998). Assim, o aumento dos níveis de IL-8 pode ter favorecido a dessensibilização dos receptores CXCRs expressos na membrana dos neutrófilos e a internalização dos complexos receptor-ligante não permitiu a verificação de sua expressão.

A redução na expressão dos receptores CXCRs foi mantida, mas não intensificada, comparado ao tempo pré-QT (Figura 18). A expressão inalterada dos receptores CXCRs nas pacientes deste estudo, após tratamento quimioterápico, pode sugerir ou que este realmente não seja o mecanismo envolvido na redução funcional dos neutrófilos ou que a manutenção desta redução seria suficiente para reduzir a função de migração celular. Na literatura não encontramos dados que descrevem possíveis efeitos da QT sobre a expressão de receptores de quimiocinas em leucócitos circulantes. A maioria dos trabalhos investiga a expressão de CXCRs em células do microambiente tumoral e sua associação com angiogênese e metástases tumorais (revisado por WAUGH; WILSON, 2008).

Os mecanismos pelos quais o NO modula a migração dos neutrófilos não estão totalmente elucidados, apesar da demonstração de que o NO, liberado pela eNOS ou iNOS, modula a interação leucócito-endotélio (IALENT et al., 2000). Inibidores seletivos de eNOS e iNOS aumentam a adesão de neutrófilos às células endoteliais, enquanto doadores de NO, tais como nitroprussiato de sódio, diminuem tanto a adesão quanto a transmigração dos neutrófilos até o sítio inflamatório (IALENT et al., 2000). Em camundongos deficientes de iNOS também se observa

aumento da adesividade dos neutrófilos ao endotélio (HICKEY et al., 1997). Ainda, a expressão de moléculas de adesão tais como CD11b/CD18, L-, P- e E-selectinas, ICAM-1, VCAM-1 é regulada de maneira descendente (*down-regulation*) por doadores de NO e ascendente (*up-regulation*) por inibidores de NOS (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991). Em nosso estudo, a expressão de CD11b não foi alterada pela doença (Figura 19) e nem pela quimioterapia (Figura 20).

Drogas antineoplásicas podem influenciar a expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos, porém os dados parecem inconsistentes. Alguns autores demonstram aumento da expressão da molécula CD11b/CD18 após o uso de quimioterapia (ENGERVALL; LUNDAHL, 1998) enquanto outros estudos mostram redução da expressão de CD18 após tratamento quimioterápico, mesmo após recuperação da aplasia medular (UGGLA et al., 2002; KIMHI et al., 2004). Ainda, em outros estudos, em acordo com nossos achados, a expressão de CD11b não foi alterada pela quimioterapia, comparado aos níveis obtidos antes do tratamento (MACKAREL et al., 2000).

A expressão e a capacidade adesiva das integrinas são eventos interdependentes, porém distintos. Enquanto a expressão Mac-1 é alcançada a partir da ativação celular realizada por citocinas e quimioatraentes, a capacidade pró-adesiva depende de pelo menos dois eventos: (1) os neutrófilos devem ser preparados imunologicamente (*priming*) para responder às integrinas (RADI et al., 2001) e (2) a alteração estrutural dos neutrófilos ativados determina a afinidade e avidéz da integrina ao seu ligante endotelial (revisto por ZHELEV; ALTERAIFI, 2002).

As selectinas são consideradas como as principais moléculas envolvidas no *priming* dos neutrófilos. Em camundongos nocaute para L- e/ou E- selectina foi demonstrada redução significativa da adesão do neutrófilo ao endotélio e da migração destas células em resposta à IL-8, comparado ao grupo de animais controle (LEY, 2002). Aumento sistêmico de NO é sugerido como um dos mecanismos envolvidos neste evento, como demonstrado em pacientes com sepse (SECCO et al., 2003) ou voluntários sadios (NOLEN et al., 2008). Nestes estudos, foi observado que após a inibição de NOS houve aumento da migração de neutrófilos em resposta à IL-

8 via um mecanismo dependente da adesão entre L- e P- selectina ao seu contra-receptor endotelial (NOLEN et al., 2008). Sendo assim, não podemos excluir a possibilidade de que o aumento de NO observado em nossas pacientes tenha reduzido a expressão de selectinas e conseqüentemente o *priming* dos neutrófilos. Em pacientes com câncer de mama o uso de ciclofosfamida reduziu significativamente os níveis de L-selectina, sendo este efeito observado durante o período de aplasia medular (comparado ao pré tratamento) e mantido até três meses após o tratamento (CZYGIER et al., 2008).

A ativação celular constitui a primeira etapa da cascata seqüencial de eventos que envolvem o recrutamento de neutrófilos. Independente da natureza química, a maioria dos quimioatraentes é reconhecida pelos neutrófilos via GPCRs expressos em sua membrana. Como resultado da ativação dos receptores pelo quimioatraente, uma complexa seqüência de eventos sinalizadores são desencadeados, os quais induzem importantes alterações do citoesqueleto de actina e ativação de outras vias sinalizadoras, permitindo a essas células locomover, aderir e ainda executar outras atividades, tais como fagocitose e atividade microbida (KATANAEV, 2001).

Em uma visão clássica, a sinalização é iniciada por ativação do GPCR por quimioatraentes, o complexo G ativa isoformas de fosfolipase C que, finalmente, resulta na mobilização de cálcio e ativação de proteína quinase C que medeia a ativação do complexo oxidase NADPH, regulando a fagocitose e a atividade microbida dos neutrófilos (ALTERAIFI; ZHELEV, 1997). Além disso, outras vias intracelulares são ativadas, o que leva à fosforilação de proteínas, especialmente dos resíduos da tirosina e seus adaptadores, os quais amplificam a transdução dos sinais e o *priming* celular a fim de responder às interações adesivas via integrinas (RADI et al., 2001). A sinalização para motilidade atinge seu clímax com a polimerização de actina, a qual resulta na alteração estrutural do neutrófilo, rearranjo do citoesqueleto e rastejamento celular (HOWARD, BEN-BARUCH e OPPENHEIM, 1996).

Baseado nestas informações, procuramos investigar possível alteração na capacidade de polimerização dos filamentos de actina através de ensaios de citoquímica e microscopia de fluorescência. Nossos resultados demonstram que a quimioterapia reduziu a polimerização dos filamentos de F-actina por meio de duas

observações: 1) no tempo pós-QT a ativação dos neutrófilos não modificou a capacidade de polimerização de actina, considerando a resposta basal (sem estímulo) e 2) comparando-se os tempos pré e pós-QT, foi observada redução significativa da capacidade de polimerização de actina em neutrófilos ativados (Figura 21C).

Em acordo com nossos resultados, recentemente foi demonstrada redução da polimerização de actina em neutrófilos de pacientes com câncer de mama após o uso de antraciclinas, significativa a partir do primeiro ciclo de QT e mantida nos ciclos subseqüentes. A avaliação foi realizada antes do início do tratamento e imediatamente antes de cada ciclo quimioterápico (após recuperação da aplasia medular). A alteração dos filamentos de actina foi observada desde o primeiro ciclo e mantida durante os ciclos subseqüentes, apesar do uso de G-CSF (INVERNIZZI et al., 2008). Estes resultados indicam que a quimioterapia é capaz de alterar a organização do citoesqueleto e, desta forma, a migração dos neutrófilos.

O NO tem sido apontado como importante modulador da polimerização de F-actina em neutrófilos e conseqüente redução da migração celular. Neste contexto, foi demonstrado que neutrófilos de pacientes com sepse podem ter suas vias de sinalização intracelular, responsáveis pela polimerização de F-actina, alteradas pelo NO, com conseqüente redução até falência da migração de neutrófilos (ARRAES, 2003). Em nossos resultados também observamos redução da polimerização dos filamentos de actina de neutrófilos e aumento da produção sistêmica de NO em pacientes com câncer de mama após tratamento quimioterápico, sugerindo uma associação entre estes eventos.

O conhecimento do mecanismo molecular envolvido no recrutamento de neutrófilos para o sítio de inflamação é essencial para que se possa definir uma estratégia efetiva capaz de limitar os efeitos deletérios da inflamação aguda (por exemplo na sepse) e, ao mesmo tempo, preservar a defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, como ocorre em pacientes com câncer em tratamento quimioterápico. A compreensão dos mecanismos de regulação de funções das células circulantes é essencial no planejamento de estratégias terapêuticas capazes de restabelecer uma resposta inflamatória/imune eficaz contra agentes infecciosos.

Em conclusão, os resultados demonstraram a presença de fatores circulantes inibitórios sobre a função quimiotática de neutrófilos em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia. Dentre esses mediadores destaca-se o aumento da produção de NO por leucócitos circulantes, associado à redução da polimerização dos filamentos de F-actina de neutrófilos.

## REFERÊNCIAS



ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

\_\_\_\_\_. **NBR 6024**: informação e documentação: numeração progressiva das seções de um documento escrito: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

\_\_\_\_\_. **NBR 6027**: informação e documentação: sumário: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

\_\_\_\_\_. **NBR 6028**: informação e documentação: resumos: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

\_\_\_\_\_. **NBR 6034**: informação e documentação: índice: apresentação. Rio de Janeiro, 2004.

\_\_\_\_\_. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

\_\_\_\_\_. **NBR 12225**: informação e documentação: lombada: apresentação. Rio de Janeiro, 2004.

\_\_\_\_\_. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2005.

AJUEBOR, M. N. et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunol**, v. 95, n. 4, p. 625-630, 1998.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 357, p. 593-615, 2001.

AL-SARIREH, B.; EREMIN, O. Tumor-associated macrophages (TAMs): disordered function, immune suppression and progressive tumor growth. **J R Coll Sur Edin**, v. 45, n. 1, p. 1-16, 2000.

ALTERAIFI, A. M.; ZHELEV, D. V. Transient increase of free cytosolic calcium during neutrophil motility responses. **J Cell Sci**, v. 110, p. 1967-1977, 1997.

ARRAES, S. M. A. A. **Mecanismos intracelulares envolvidos na falência da migração neutrofílica em pacientes sépticos: papel do óxido nítrico**. 2003. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

ARRAES, S. M. et al. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2906-2913, 2006.

- BEN-BARUCH, A.; MICHIEL, D. F.; OPPENHEIM, J. J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. **J Biol Chem**, v. 270, p. 11703-11706, 1995.
- BENJAMIM, C. F. et al. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect Immun**, v. 70, p. 3602-3610, 2002.
- BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis**, v. 182, p. 214-223, 2000.
- BLAND, K. I. et al. The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States. **Cancer**, v. 83, n. 6, p. 1262-1273, 1998.
- BOING, A. F.; VARGAS, S. A. L.; CRISPIM-BOING, A. A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002-2004. **Rev Assoc Med Bras**, v. 53, n. 4, p. 317-322, 2007.
- BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 1649-1660, 1995.
- BONADONNA, G. et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience an the Milan Cancer Institute. **J Clin Oncol**, v. 16, p. 93-100, 1998.
- BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, p. 235-246, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil - 2003**. Rio de Janeiro: 2003. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/>>. Acesso em 09/04/2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: 2007. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer>>. Acesso em: 05 dez. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de informações sobre mortalidade - 2002**. Rio de Janeiro: 2002. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obtm.htm>>. Acesso em: 20 set. 2006.
- BRUYNINCKX, W. J. et al. Phosphoinositide 3-kinase modulation of b3-integrin represents an endogenous "braking" mechanism during neutrophil transmatrix migration. **Blood**, v. 97, p. 3251-3258, 2001.
- CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10. ed. U.S.A.: McGraw-Hill, 2001, cap. 52, p. 1381-1459. ISBN 0-07-135469-7.

- CANETTI, C. et al. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 134, n. 8, p. 1619-1628, 2001.
- CHALY, Y. V. et al. Expression of IL-8 gene in human monocytes and lymphocytes: differential regulation by TNF and IL-1. **Cytokine**, v. 12, n. 6, p. 636 -646, 2000.
- CHUNG, H. T. et al. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 282, p. 1075-1079, 2001.
- CLEATOR, S.; PARTON, M.; DOWSETT, M. The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 9, p. 183-195, 2002.
- COLLINS, P. Symptom management chemotherapy. In: CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS WORKSHOP. 1995. Miami. **Anais...** Miami: American Cancer Society, 1995, P. 1245.
- COSKUN, U. et al. Effect of different neoadjuvant chemotherapy regimens on locally advanced breast cancer. **Neoplasma**, v. 50, p. 210-216, 2003.
- CUMMINGS, C. J. et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. **J Immunol**, v. 162, p. 2341-2346, 1999.
- CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur J Pharmacol**, v. 129, p. 65-76, 1986.
- CZYGIER, M. et al. The plasma level of sL-selectin, myeloperoxidase and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in breast cancer patients in the course of chemotherapy. **Przepl Lek**, v. 65, p. 115-118, 2008.
- DEJANA, E.; CORADA, M.; LAMPUGNANI, M. G. Endothelial cell-to-cell junctions. **FASEB J**, v. 9, p. 910-918, 1995.
- DEMIRKAZIK, A. et al. Effect of prior therapy and bone marrow metastases on progenitor cell content of blood stem cell harvests in breast cancer patients. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 8, p. 268-272, 2002.
- DETMERS, P. A. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. **J Exp Med**, v. 171, p. 1155-1162, 1990.
- DEVALARAJA, M. N.; RICHMOND, A. Multiple chemotactic factors: Fine control or redundancy? **Trends Pharmacol. Sci**, v. 20, p. 151-156, 1999.
- DINCER, Y. et al. Nitric oxide and antioxidant defense in patients with gastric cancer. **Dig Dis Sci**, v. 51, n. 8, p. 1367-1370, 2006.

- DITTMAR, T. et al. Lessons from tumor and immunocompetent cells. The quantitative engagement of ligand-receptor interactions modulates stop-and-go behaviour as well as proliferation. **Medicina**, v. 60, p. 27-33, 2000.
- DUIGNAN, J. P. et al. The association of impaired neutrophil chemotaxis with postoperative surgical sepsis. **Brit J Surg**, V. 73, P. 238-240, 1986.
- ELMORE, J. G. et al. Screening for breast cancer. **JAMA**, v. 293, p. 1245-1256, 2005.
- ELOMAA, I.; JOENSUU, H.; BLOMQVIST, C. Vinorelbine, methotrexate and fluorouracil (VMF) as first-line therapy in metastatic breast cancer: a randomized phase II trial. **Ann Oncol**, v. 14, n. 5, p. 699-703, 2003.
- ENDO, S. et al. Preoperative chemotherapy increases cytokine production after lung cancer surgery. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 26, p. 787-791, 2004.
- ENGERVALL, P.; LUNDAHL, J. Alterations in adhesion molecule (CD11b/CD18 and CD62L) expression on granulocytes after chemotherapy. **Eur J Clin Invest**, v. 28, p. 924-929, 1998.
- ETZIONI, A. et al. Leukocyte adhesion deficiency (LAD) II. **Ciba Found Symp**, v. 189, p. 51-58, 1995.
- FAGERHOLM, S. C. et al. Chain phosphorylation of the human leukocyte CD11b/CD18 (Mac-1) integrin is pivotal for integrin activation to bind ICAMs and leukocyte extravasation. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3379-3386, 2006.
- FERNANDES JR, P.C. et al. Circulating neutrophils may play a role in the host response in cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**, v. 17, p. 1086-1074, 2007.
- FEUER, E. J. et al. The lifetime risk of developing breast cancer. **J Nat Cancer Inst**, v. 85, p. 892-897, 1993.
- FIGARELLA-BRANGER, D. et al. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 6, Dec, p. 659-682, 2003.
- FIRTEL, R. A.; CHUNG, C. Y. The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. **Bioessays**, v. 22, n. 7, p. 603-615, 2000.
- FRIEDENREICH, C.; MARRETT, L. D. Workshop report: identification of research needs breast cancer etiology. **Chronic Dis Can**, v. 22, n. 2, p. 41-49, 2001.
- FUHLER, G. M. et al. Impaired interleukin-8- and GROalpha-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase result in decreased migration of neutrophils from patients with myelodysplasia. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 2, p. 257-266, 2005.

FURIE, M. B.; RANDOLPH, G. J. Chemokines and tissue injury. **Am J Clin Pathol**, v. 146, n. 6, p. 1287-1301, 1995.

GAHMBERG, C. G. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 9, p. 643-650, 1997.

GEBHARD, B. et al. Different transendothelial migration behaviour pattern of blood monocytes derived from patients with benign and malignant diseases of the breast. **Anticancer Res**, v. 20, p. 4599-4604, 2000.

GHIO, M. et al. Transforming growth factor-beta1 in supernatants from stored red blood cells inhibits neutrophil locomotion. **Blood**, v. 102, p. 1100-1107, 2003.

GOGOS, C. A. et al. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. **J Infect Dis**, v. 181, p. 176-180, 2000.

GORELIK, E. et al. Multiplexed immunobead-based cytokine profiling for early detection of ovarian cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14; 981-987, 2005.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, p. 7764-7768, 1981.

GREGORY, R. K. et al. Combining platinum, paclitaxel and anthracycline in patients with advanced gynaecological malignancy. **Eur J Cancer**, v. 36, p. 503-507, 2000.

GURA, T. Chemokines take center stage in inflammatory ills. **Science**, v. 272, p. 954-956, 1996.

HARADA, A. et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 56, n. 5, p. 559-564, 1994.

HARTMANN, P. et al. Unusual and severe symptomatic impairment of neutrophil function after one cycle of temozolomide in patients with malignant glioma. **Ann Hematol**, v. 83, p. 212-217, 2004.

HEIT, B. et al. HIV and Other Lentiviral Infections Cause Defects in Neutrophil Chemotaxis, Recruitment, and Cell Structure: Immunorestorative Effects of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 6405-6414, 2006.

HEIT, B. et al. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration opposing chemotactic gradients. **J Cell Biol**, v. 159, n. 1, p. 91-102, 2002.

HENSON, P. M. Dampening inflammation. **Nat Immunol.**, v. 6, n. 12, p. 1179-1181, 2005.

HICKEY, M. J. et al. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. **FASEB J**, v. 11, p. 955-964, 1997.

HIDAKA, T. et al. Mirimostim (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF) improves chemotherapy-induced impaired natural killer cell activity, Th1/Th2 balance, and granulocyte function. **Cancer Sci**, v. 94, n. 9, p. 814-820, 2003.

HOFMANN, W. K.; STAUCH, M.; HÖFFKEN, K. Impaired granulocytic function in patients with acute leukaemia: only partial normalisation after successful remission-inducing treatment. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 124, p. 113-116, 1998.

HOWARD, O. M.; BEN-BARUCH, A.; OPPENHEIM, J. J. Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. **Trends Biotechnol**, v. 14, n. 2, p. 46-51, 1996.

IALENTI, A. Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. **Inflamm Res**, v. 49, p. 411-417, 2000.

INVERNIZZI, R. et al. Biological Effects of Pegfilgrastim on Circulating Neutrophils in Breast Cancer Patients Undergoing Dose-Dense Chemotherapy. **Oncol**, v. 15, p. 237-244, 2008.

JABLONSKA, E. et al. Nitric oxide in supernatants of leukocytes and the serum of patients with B-CLL. **Przegl Lek**, v. 63, n. 12, p. 1286-1290, 2006.

JANEWAY, C. A. et al. Conceitos básicos em imunologia. In: \_\_\_\_\_ . **Imunobiologia**, Rio grande do Sul: ArtMed, 2000. Cap. 1, p. 1-31.

JEMAL, A. et al. Cancer Statistics, 2008. **CA Cancer J Clin**, v. 58, p.71-96, 2008.

JOHNSON-THOMPSON, M. C.; GUTHRIE, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 1224-1229, 2000.

KADONO, T. et al. Leukocyte Rolling Velocities and Migration are Optimized by Cooperative L-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 Functions. **J Immunol**, v. 169, p. 4542-4550, 2002.

KAPLAN, A. P. Chemokines, chemokine receptors and allergy. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 124, n. 4, p. 423-431, 2001.

KATANAEV, V. L. Signal transduction in neutrophil chemotaxis. **Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 437-456, 2001.

KEEL, M. et al. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. **Blood**, v. 90, p. 3356-3363, 1997.

KIM, M.; CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. **Science**, v. 301, p. 1720-1725, 2003.

KIMHI, O. et al. Fluorouracil induces apoptosis and surface molecule modulation of peripheral blood leukocytes. **Clin Lab Haematol**, v. 26, p. 327-333, 2004.

- KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. **Mutat Res**, v. 544, p. 305-311, 2003.
- KUBES, P.; JUTILA, M.; PAYNE, D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. **J Clin Invest**, v. 95, n. 6, p. 2510-2519, 1995.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, p. 4651-4655, 1991.
- KUO, C. P. et al. Detection of cytomegalovirus reactivation in cancer patients receiving chemotherapy. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 3, p. 221-227, 2008.
- KÖSTERS, J. P.; GOTZSCHE, P. C. Regular self-examination or clinical examination for early detection of breast cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, p. CD003373, 2003.
- LAUDANNA, C. et al. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. **Immunol Rev**, v. 186, p. 37-46, 2002.
- LEE, J. et al. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. **J Biol Chem**, v. 267, n. 23, p. 16283-16287, 1992.
- LEHRNBECHER, T. et al. Changes in host defence induced by malignancies and antineoplastic treatment: implication for immunotherapeutic strategies. **Lancet Oncol**, v. 9, p. 269-278, 2008.
- LEJEUNE, M. et al. Granulocyte functions in children with cancer are differentially sensitive to the toxic effect of chemotherapy. **Pediatr Res**, v. 39, p. 835-842, 1996.
- LEY, K. et al. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling *in vivo*. **J Exp Med**, v. 181, p. 669-675, 1995.
- LEY, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. **Immunol Rev**, v. 186, p. 8-18, 2002.
- LU, D. J.; FURUYA, W.; GRINSTEIN, S. Involvement of multiple kinases in neutrophil activation. **Blood Cells**, v. 19, n. 2, p. 343-351, 1993.
- LYON, D. E. et al. Cytokine Comparisons Between Women With Breast Cancer and Women With a Negative Breast Biopsy. **Nurs Res**, v. 57, p. 51-58, 2008.
- MACKAREL, A. J. et al. Interleukin-8 and leukotriene-B<sub>4</sub>, but not formylmethionyl leucylphenylalanine stimulate CD18-independent migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells *in vitro*. **Am J Respir Cell Mol Bio**, v. 23, p. 154-161, 2000.
- MENDONÇA, M. A. O. et al. Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 57, p. 663-670, 2006.

- MENDONÇA, M. A. O. et al. Relationship between risk factors and tumor stage in breast cancer patients in a university hospital – Brazil. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. XXIX, n. 1, p. 80, 2008.
- MERENDINO, R. A. et al. Interleukin-12 and interleukin-10 production by mononuclear phagocytic cells from breast cancer patients. **Immunol Lett**, v. 68, p. 355-358, 1999.
- MESTRINER, F. L. et al. Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, p. 19595-19600, 2007.
- MOSER, B. E.; WILLIMANN, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. **Ann Rheum Dis**, v. 63, p. ii84-ii89, 2004.
- NOLEN, B. M. et al. Serum biomarker profiles and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 10, p. R45, 2008.
- OTSUKA, Y. et al. Inhibition of neutrophil migration by tumor necrosis factor. Ex vivo and in vivo studies in comparison with in vitro effect. **J Immunol**, v. 145, p. 2639-2643, 1990.
- PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer**, v. 37, p. 4-66, 2001.
- PICKERING, L. K.; ERICSSON, C. D.; KOHL, S. Effect of Chemoterapeutic Agents on Metabolic and Bactericidal Activity of Polymorphonuclear Leukocytes. **Cancer**, v. 42, p. 1741-1746, 1978.
- PÓKA, R. et al. Stage-related superoxide anion production of granulocytes of gynecologic cancer patients. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 89, p. 55-57, 2000.
- PREMACK, B. A.; SCHALL, T. J. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. **Nat Med**, v. 2, n. 11, p. 1174-1178, 1996.
- PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. The role of chemokines in inflammation. **Int J Clin Lab Res**, v. 26, p. 211-223, 1996.
- PUGLIESE, A. et al. Phagocytic Activity in Human Immunodeficiency Virus Type1 Infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 8, p. 889-895, 2005.
- PUSZTAI, L. et al. Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. **Cytokine**, v. 25, n. 3, p. 94-102, 2004.
- RADI, Z. A., et al. Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. **J Vet Intern Med**, v. 15, n. 6, p. 516-529, 2001.

- RAHMAN, Z. et al. Chemotherapy-Induced Neutropenia and Fever in Patients with Metastatic Breast Carcinoma Receiving Salvage Chemotherapy. **Cancer**, v. 79, n. 6, p. 1150-1157, 1997.
- REYES, E. et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) transiently suppresses mitogen-stimulated T-cell proliferative response. **Br J Cancer**, v. 80, n. 1/2, p. 229-235, 1999.
- RIBEIRO, R. A. et al. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472-477, 1991.
- RICHARDS, J. O. et al. Tumor growth impedes natural-killer-cell maturation in the bone marrow. **Blood**, v. 108, p. 246-252, 2006.
- RICHARDSON, R. M. et al. Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. **J Biol Chem**, v. 273, n. 37, p. 23830-23836, 1998.
- RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on Neutrophils in Severe Sepsis Is Mediated by Inducible Nitric Oxide Synthase-derived Nitric Oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, p. 490-497, 2007.
- SAYED-AHMAD, M. M.; SHOUMAN, S. A.; RAMADAN, L. A. Contribution of Nitric Oxide in Doxorubicin-related Cytotoxicity in Murine Tumour Model. **J Egypt Natl Canc Inst**, v. 14, n. 2, p. 111-116, 2002.
- SCHIMIDT, H. H. H. W. et al. Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 165, p. 284-291, 1989.
- SECCO, D et al. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide Biol Chem**, v. 9, p. 153-164, 2003.
- SINGLETARY, S. E.; CONNOLLY, J. L. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **CA Cancer J Clin**, v. 56, n. 1, p. 37-47, 2006.
- SMITH, C. W. et al. Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. **J Clin Invest**, v. 82, n. 5, p. 1746-1756, 1988.
- SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, p. 425-434, 1990.
- STOSSEL, T. P. et al. The motor of leukocytes. **Fed Proc**, v. 43, p. 2760-2763, 1984.
- SULLIVAN, J. A., MANDELL, G. L. Motility of human polymorphonuclear neutrophils: microscopic analysis of substrate adhesion and distribution of F-actin. **Cell Motil**, v. 3, p. 31-46, 1983.

- SUSS, J.; BAKACS, T.; RINGWALD, G. Increased number of phagocytic cells among the peripheral blood lymphocytes of mammary tumor patients. **Allerg Immunol**, v. 30, n. 3, p. 183-187, 1984.
- TAVARES-MURTA, B. M. et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 1056-1061, 2002.
- TAVARES-MURTA, B. M. et al. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation**, v. 25, p. 247-253, 2001.
- TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br J Pharmacol**, v. 124, n.7, p. 1369-1374, 1998.
- TSAVARIS, N et al. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. **Br J Cancer**, v. 87, p. 21-27, 2002.
- UGGLA, B. et al. Activation of granulocytes in patients treated with chemotherapy. **Clin Lab Haematol**, v. 24, p. 29-31, 2002.
- VAN DER POLL, T. et al. Effects of IL-10 on systemic inflammatory responses during sublethal primate endotoxemia. **J Immunol**, v. 158, n. 4, p. 1971-1975, 1997.
- VAN HAASTERT, P. J.; DEVREOTES, P. N. Chemotaxis: signalling the way forward. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 8, p. 626-634, 2004.
- VOLLMER, K.; MANDELL, G. L. Effect of colony-stimulating factors on granulocyte function. **Recent Results Cancer Res**, v. 132, p. 103-108, 1993.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration during endotoxemia. **J Leukoc Biol**, v. 66, p. 10, 1999.
- WAUGH, D. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 21, p. 6735-6741, 2008.
- WHO (World Health Organization). **Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020**. Geneve: WHO, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr27/en>. Acesso em: 01 out. 2006.
- WHO (World Health Organization). **Mortality database: tables**. Geneve: WHO, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/>. Acesso em: 01 ago. 2008
- WIJAYAHADI, N. et al. Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. **J Chemother**, v. 19, n. 6, p. 716-723, 2007.

WUYTS, A. et al. Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties. **Biochemistry**, v. 36, n. 9, p. 2716-2723, 1997.

YANAGAWA, H. et al. Production of interleukin-10 by alveolar macrophages from lung cancer patients. **Respir Med**, v. 93, p. 666-671, 1999.

YOKOMIZO, T. et al. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 620-624, 1997.

ZHELEV, D. V.; ALTERAIFI, A. Signaling in the Motility Responses of the Human Neutrophil. **Ann Biomed Eng**, v. 30, p. 356-370, 2002.

ZIMMERMAN, B. J. et al. Thrombin receptor peptide-mediated leukocyte rolling in rat mesenteric venules: Roles of P-selectin and sialyl Lewis X. **Am J Physiol**, v. 267, p. H1049-H1053, 1994.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)