

Universidade Federal de Minas Gerais  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Patologia Geral  
Programa de Pós Graduação em Patologia

**Efeito do selênio orgânico e da vitamina E no  
crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor  
experimental de Ehrlich**

Frankcinéia Aparecida de Assis

**Orientadora:** Prof. Dra. Denise Carmona Cara Machado

Deptº. Patologia Geral

**Co- orientadora:** Prof. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Deptº. Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte  
Agosto - 2007

Frankcinéia Aparecida de Assis

**Efeito do selênio orgânico e da vitamina E no  
crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor  
experimental de Ehrlich**

**Orientadora:** Prof. Dra. Denise Carmona Cara Machado

**Co- orientadora:** Prof. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Dissertação apresentada ao programa de  
Patologia da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal de Minas Gerais  
como requisito para obtenção do título  
de mestre em Patologia.

Belo Horizonte

Agosto - 2007

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios: Neuro-Imuno Patologia experimental (NIPE) e Imunobiologia (LIB) do instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte de luz, paz e alegria que nos momentos mais difíceis me iluminou e tranqüilizou.

Ao meu querido amigo e amante, Luiz Fernando, por todo o carinho, paciência e amor durante os percalços desse trabalho.

À minha família, mãe, irmãos, sobrinhos, cunhados e cunhada, sogro e sogra pela presença constante em minha vida e pela união e alegria que nos sonda.

À prof. Denise Carmona, por ter me dado um voto de confiança abrindo as portas de seu laboratório, e com seu jeito doce e carinhoso me conduzido pelos caminhos da pesquisa na área da patologia.

À Ana, com a qual tenho o prazer de conviver há 11 anos, durante os quais sempre me incentivou e me apoiou na caminhada da ciência.

Ao prof Nelson, responsável pela minha trajetória no LIB, pois senão fosse ele hoje não estaria aqui para contar essa história. A você meu muito obrigado.

Ao professor Tomaz pelas discussões de imunologia, que sempre nos faz questionar mais e mais, nos ensinando com seu jeito paciente e tranquilo.

Aos TODOS os meus grandes amigos do LIB, que sempre me ajudaram na parte experimental e durante as análises estatísticas desse trabalho, além dos momentos alegres e divertidos que passamos juntos ao longo desses anos, em especial a Elaine, Tatiani, Raphaela, Danielle, Andrezza e Archimedes.

À querida bruxinha Léia Andrade pela disposição e pela ajuda nas análises do Facs. O meu sempre obrigado.

Aos amigos do NIPE: Mariazinha, Lulu, Maria Letícia, Sandra, Thales, Martinha, Mirna, Silvia, Camila, Camilinha, Carol, Ferdinan, Eliane, Cláudia eo sempre presente Weverton pela constante alegria e amizade.

Aos alunos de iniciação científica Vinícius e Pércia, que me ajudaram nos cortes histológicos e repiques tumorais, além da amizade e disposição.

À minha grande amiga Tia Madrinha Vanessa, pelo convívio alegre durante as aulas de bioestatística e estudo na biblioteca da medicina. Lembra?

Às amigas Magda e Lílian, que compartilharam noites de experimento no LIB, e que deixam muitas saudades.

Aos amigos da pós-graduação: Paula, Márcia, Bia, Roberta, Gleidice e Keyla pelos momentos alegres e estressantes do curso.

À Juliana, aluna de mestrado do prof. Anilton, à prof. Luciana Moro e a Eloísa, aluna de IC do prof. Anilton pela ajuda na coloração e análise da apoptose das células.

Ao Ênio aluno do prof. Geovanni pela disposição na captura das imagens e fotografia das lâminas.

Aos funcionários do departamento de Patologia geral pela ajuda na inclusão dos blocos de parafina e coloração: Soraya, Vânia, Olinda e Jaqueline.

Aos professores do curso Anilton, Geovanni, Wagner e Ana Margarida pelo aprendizado e ensinamentos.

“Um amor tão puro que ainda não sabe

A força que tem

É teu e de mais ninguém

Te adoro em tudo, tudo, tudo

Quero mais que tudo, tudo, tudo

Te amar sem limites”

*(Djavan)*

Ao Fernando pelo amor e dedicação

À Ana,

Chefe, co-orientadora e amiga, palavras não seriam suficientes para te agradecer por tudo, mas alguns versos escrevo para que guardes no coração: Não sei o que combina mais contigo, uma poesia, um livro, uma pintura, sinceramente fico pensando como recompensar e agradecer te pelo incentivo e pelo impulso aos inúmeros degraus da minha vida profissional.

Á Denise Carmona com carinho

“O verdadeiro mestre, sente-se feliz quando percebe que o caminho que Ele abriu tem sido trilhado por muitos. O mestre tem a sua realização no aprendizado do pupilo, da passagem da experiência. É por isso que meras palavras não podem recompensar”.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvii
<b>RESUMO</b> .....	xviii
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1. Sistema Imune e Desenvolvimento Tumoral .....	22
1.2 O Papel do Selênio no Desenvolvimento Tumoral .....	30
1.3 A Ação da Vitamina E no Desenvolvimento Tumoral .....	32
1.4. O Tumor de Ehrlich .....	35
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	37
<b>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO</b> .....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	38
4.1 Animais.....	38
4.2 Preparo das dietas .....	38
4.3. Protocolo experimental .....	39
4.4. Tratamento dietético .....	39
4.5 Tumor experimental .....	40
4.5.1 – Manutenção do tumor de Ehrlich .....	40
4.5.2 - Preparo das células tumorais para inoculação .....	40
4.6. Avaliação do Crescimento tumoral .....	41
4.6.1 – Tamanho .....	41
4.6.2 – Histopatologia .....	41
4.6.3 – Avaliação da apoptose.....	41
4.7. Avaliação do peso corpóreo dos animais .....	41
4.8. Obtenção do sangue total e do soro .....	42

4.9. Confeção de esfregaço sanguíneo e coloração das lâminas .....	42
4.10. Contagem global de leucócitos .....	42
4.11. Contagem diferencial de leucócitos .....	42
4.12. Contagem de hemácias .....	43
4.13. Dosagem de glicose e albumina .....	43
4.14. Dosagem de proteínas totais .....	43
4.15. Preparação de suspensões celulares para citometria de fluxo .....	43
4.15A Preparação de suspensões de linfonodos e baço .....	44
4.15.B. Contagem de células .....	44
4.15.C. Preparação de células para Citometria .....	45
4.15.D. Tipos de marcadores fenotípicos celulares .....	45
4.16. Obtenção dos dados no citômetro de fluxo e análise dos resultados .....	46
4.16.A. Estratégia de análise .....	46
4.17. Preparações de células para cultura .....	46
4.17.A. Preparação das células do baço e linfonodo poplíteo .....	46
4.17.B. Coleta de Macrófago peritoneal .....	47
4.17.C. Medida da Produção de Citocinas por ELISA (Enzyme linked Immunoabsorbent Assay).....	47
4.17.D. Dosagem de óxido nítrico .....	48
4.18. Análise do índice apoptótico .....	48
4.19. Mensuração da área de necrose .....	48
4.20. Análise estatística .....	48
4.21. Soluções .....	49
4.21.1 Soluções usadas na contagem de hemácias e leucócitos .....	49
4.21.2. Soluções usadas na citometria de fluxo .....	49
4.21.3. Soluções usadas na cultura de células .....	49
4.21.4. Soluções usadas na dosagem de NO... .....	50
4.21.3. Soluções usadas na Elisa .....	50
4.21.3. Soluções usadas na histologia .....	50
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
5.1 Avaliação do peso corpóreo de animais inoculados ou não com Tumor de	

Ehrlich e suplementados ou não com selênio ou vitamina E.....	51
5.2. Efeito da suplementação dietética com vitamina E ou selênio no crescimento do tumor de Ehrlich na forma sólida.....	52
5.3. Medida sérica dos níveis de albumina, glicose e proteínas totais dos animais inoculados ou não com Tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E .....	54
5.4. Avaliação do número de hemácias no sangue total de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio .....	55
5.5. Avaliação do número de leucócitos no sangue total de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio .....	56
5.6. Análise fenotípica de células do sistema imune do linfonodo poplíteo de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com vitamina E ou selênio .....	57
5.7. Análise fenotípica de células do sistema imune do baço e de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com vitamina E ou selênio .....	60
5.8. Análise da Intensidade de Fluorescência de células linfóides presentes no baço e linfonodo poplíteos de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e tratados com vitamina E ou selênio .....	63
5.9. Produção de citocinas IL-10 por células linfóides linfonodo poplíteo e do baço de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E ou selênio .....	68
5.10. Produção de citocinas INF- $\gamma$ por células linfóides do baço e linfonodo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E ou selênio .....	71
5.11. Produção de óxido nítrico (NO) por células linfóides do baço e linfonodo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E ou selênio .....	73
5.12. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos do peritônio de	

animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E ou selênio .....	76
5.13. Análise histológica dos coxins plantar de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio .....	77
5.14. Mensuração da área de necrose .....	80
5.15. Análise de apoptose através do Shorr .....	81
5.16. Índice apoptótico .....	83
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	84
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	97
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b> .....	98
<b>9. ANEXOS</b> .....	109
Anexo 9.1 – Aprovação do projeto pelo comitê de ética .....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
dL	Decilitro
Kg	Quilograma
mcM	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
$\text{mm}^2$	Milímetro quadrado
$\text{mm}^3$	Milímetro cúbico
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pg	Picograma
ph	Pontencial hidro
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotação por minuto
ADCC	Anticorpos dependentes de citotoxicidade celular
AIN	Instituto americano de nutrição ( <i>American Institute of Nutrition</i> )
APC	Célula apresentadora de antígeno
AP-1	Proteína ativadora 1
CD	Grupo de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> )
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento
CEBIO	Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas
Con A	Concanavalina A
CSF	Fator estimulador de colônia
Cy	cianoficoeritrina
DCs	Células dendríticas
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima

FITC	Isocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
HE	Hematoxilina-eosina
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMF	Intensidade média de fluorescência
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MIF	Fator inibitório de migração de macrófago
ND	Não detectado
NF	Fator nuclear de transcrição
NK	Células matadoras naturais ( <i>natural killer</i> )
NO	Óxido nítrico
NO <sup>2</sup>	Nitrito
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Ortofenileno-diamino
PE	Ficoeritrina
PBS	Tampão salino fosfato
PGE	Prostaglandina E
PKC	Proteína quinase C
TAA	Antígeno associado a tumor
TGF	Fator de transformação e crescimento
Th	Linfócito auxiliar ( <i>T helper</i> )
Th1	Resposta celular tipo 1
Th2	Resposta celular tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TSA	Antígeno tumoral específico
VCAM	Molécula de adesão de célula vascular
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Protocolo experimental utilizado no estudo.	39
Figura 2: Estratégia de análise utilizada para caracterizar o fenótipo das células presentes no baço e linfonodo poplíteo dos animais em estudo.	46
Figura 3: Avaliação do peso corpóreo de animais inoculados com tumor de Ehrlich ou não e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E	51
Figura 4: Efeito da suplementação dietética com vitamina E ou selênio no crescimento do tumor de Ehrlich na forma sólida.	53
Figura 5: Características fenotípicas de linfócitos presentes no linfonodo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E.	58
Figura 6: Características fenotípicas de linfócitos presentes no linfonodo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio.	59
Figura 7: Características fenotípicas de linfócitos presentes no baço de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E.	61
Figura 8: Características fenotípicas de linfócitos presentes no baço de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio.	62
Figura 9a: Análise da expressão de CD69 por células NK presentes no linfonodo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E	64
Figura 9b: Análise da expressão de CD69 por células NK presentes no baço de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E.	65
Figura 9c: Análise da expressão de CD69 por linfócitos TCD8 <sup>+</sup> presentes no linfonodo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E.	66
Figura 9d: Análise da expressão de CD69 por linfócitos TCD8 <sup>+</sup> presentes no baço de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E.	67

Figura 10: Produção de citocina IL-10 por células do linfondo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E	69
Figura 11: Produção de IL-10 por células do baço de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E.	70
Figura 12: Produção de citocina IFN- $\gamma$ por células do linfondo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E.	71
Figura 13: Produção de citocina IFN- $\gamma$ por células do baço de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E.	72
Figura 14: Produção de NO por células do linfondo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E	73
Figura 15: Produção de NO por células do baço de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E.	74
Figura 16: Produção de NO por macrófagos peritoneais de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E	75
Figura 17a: Fotomicrografia em aumento de 10X do coxim plantar de camundongos BAL/c inoculados e tratados com suplementação de vitamina E e selênio comparados ao grupo sem suplementação e sem inoculação tumoral.em aumento de 20X corados por HE	78
Figura 17b: Fotomicrografia em aumento de 60X do coxim plantar de camundongos BAL/c inoculados e tratados com suplementação de vitamina E e selênio.corados por HE	79
Figura 18: Mensuração da área de necrose do coxim plantar de camundongos BAL/c inoculados e tratados com suplementação de vitamina E e selênio.	80
Figura 19: Fotomicrografia em aumento de 100X do coxim plantar de camundongos BAL/c inoculados e tratados com suplementação de vitamina E e selênio e corados por Shorr.	82
Figura 20: Índice apoptótico das células de tumor de Ehrlich inoculados em coxim plantar de camundongos BALB/c suplementados ou não com vitamina E ou selênio.	83



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Resultados comparativos dos níveis séricos de albumina, glicose e proteínas totais entre os animais inoculados com tumor de Ehrlich ou não e os animais suplementados ou não com vitamina E ou selênio. 54

Tabela 2: Resultados comparativos da contagem de hemácias presentes no sangue total entre animais inoculados com tumor de Ehrlich ou não e os animais suplementados ou não com vitamina E ou selênio. 55

Tabela 3: Resultados comparativos da contagem global e diferencial dos leucócitos entre os animais inoculados com tumor de Ehrlich ou não e os animais suplementados ou não com vitamina E ou selênio. 56

## RESUMO

O câncer tem aumentado em todo o mundo, e no Brasil essa doença é colocada como problema de saúde pública pelos órgãos responsáveis. Contudo, o estabelecimento do tumor no organismo depende do mecanismo de escape imunológico, no qual as células tumorais possuem estratégias para inibir o seu reconhecimento pelo sistema imune. Esse escape contribui com o crescimento e desenvolvimento do tumor, que evade o organismo, podendo causar danos graves e até mesmo a morte do indivíduo se não tratado em tempo hábil. Tem aumentado também pesquisas no intuito de descobrir a cura e melhorar a qualidade de vida de indivíduos portadores de câncer. Uma das linhas atuais de pesquisa refere-se a uso de antioxidantes na prevenção ou no tratamento do câncer. Entre os compostos mais estudados estão o selênio e a vitamina E. Neste trabalho, nós analisamos o efeito do selênio orgânico e da vitamina E no crescimento e na resposta imunológica ao tumor de Ehrlich na forma sólida. Camundongos fêmeas BALB/c de 8 semanas de idade separados em 6 grupos receberam as seguintes dietas: dieta sem suplementação, dieta suplementada com selênio e dieta suplementada com vitamina E. Após duas semanas de tratamento 3 grupos receberam  $2,5 \times 10^6$  células de tumor no coxim plantar esquerdo e os outros 3 grupos receberam salina a 0,9%. Esses animais permaneceram na dieta por mais 4 semanas, quando foram sacrificados e tiveram o baço, o linfonodo poplíteo, o coxim plantar, o sangue total e o soro coletados. Nossos resultados mostram que somente os animais suplementados com vitamina E e inoculados com tumor tiveram inibição no crescimento tumoral. Esses animais também apresentaram uma maior expressão de CD69 por células NK e linfócitos TCD8<sup>+</sup> no linfonodo poplíteo, que reflete uma maior ativação dessas células. Além disso, os animais suplementados com vitamina E sem inoculação tumoral apresentaram um maior percentual de células NK no linfonodo poplíteo e no baço, o mesmo resultado foi visto no baço de animais suplementados com selênio e sem inoculação tumoral. O tratamento com vitamina E também reduziu o percentual de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no baço, além de inibir a produção de IL-10 por células do linfonodo poplíteo e NO por células do baço. A histologia mostrou que ambos os tratamentos possuem a mesma característica, com área de necrose de mesmo tamanho e infiltrado característico de mononuclear. Contudo, a análise do índice de apoptose no corte histológico do coxim plantar com tumor mostrou que, os animais suplementados com vitamina E apresentaram um maior índice quando comparados aos demais grupos. Nossos resultados mostram que a suplementação com vitamina E é capaz de inibir o crescimento do tumor de Ehrlich, ativar células do sistema imunológico como e células NK, culminando na indução de apoptose das células tumorais.

## ABSTRACT

Cancer incidence has increased all over the world; in Brazil this disease has been considered a public health issue. However, tumor establishment in the organism depends on the immunologic escape mechanism in which tumors cells have strategies to inhibit the immune system recognition. This escape mechanism contributes to the tumor growth and development, so the tumor can invade the organism being able to cause serious damages or even death to the host if it is not treated in time. The number of researches has also increased intending to find out the healing or, at least a better quality of life for those individuals that suffer from cancer. One of the actual researches line refers to the usage of antioxidant for treating or preventing cancer. Between the composites utilized are the selenium and vitamin E. In this work, we studied the effect of organic selenium and vitamin E in Ehrlich tumor's (solid form) growth and immunologic answer to this tumor. Eight weeks old females mice BALB/c, split up into 6 groups were given the following diet: selenium supplemented diet, vitamin E supplemented diet and non supplemented diet. After two week's treatment three groups received  $2,5 \times 10^6$  tumor cells by footpad and other 3 groups received saline 0,9%. These animals were kept in diet for four weeks thereafter, then they were sacrificed and spleen, lymph nodes popliteal, footpad and blood were collected. Our results show that only those animals supplemented with vitamin E presented a tumor growth inhibition. These animals also had a higher CD69 expression by NK cells and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in the lymph nodes popliteal what reflects a higher activation of these cells. Furthermore, the animals supplemented with vitamin E without tumor inoculation showed a higher percentage of NK cells in the lymph nodes popliteal and spleen, the same result was seen in spleen from animals supplemented with selenium without tumor inoculation. The vitamin E treatment also reduced the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the spleen and inhibited IL-10 production by lymph nodes popliteal cells and NO production by spleen cells. Histology showed that both treatments have the same characteristic, with the same size and mononuclear infiltrated necrosis areas. However, apoptosis' rate analyses in the tumor footpad histology showed that animals treated with vitamin E presented a higher apoptosis' rate when compared with other groups. The results from our study showed that vitamin E supplementation is able to inhibit Ehrlich tumor's growth, activating immune system cells such as NK lymphocytes that culminate in apoptosis induction of tumor's cells.

# 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer atinge pelo menos 9 milhões de pessoas e mata cerca de 5 milhões no mundo, sendo considerado a segunda causa de morte por doença na maioria dos países, perdendo somente para as doenças cardiovasculares, e correspondendo a 12% do total de morte por todas as causas (CUPPARI, 2002).

No Brasil, o aumento da expectativa de vida, a urbanização, a industrialização entre outros fatores estão contribuindo para o aumento na incidência de câncer. Desta forma, os dados epidemiológicos colocam o câncer como problema de saúde pública no país, constituindo a segunda causa de morte por doença no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996; ABREU et al., 1993).

O câncer, utilizado popularmente como sinônimo de neoplasma, é definido como sendo um crescimento desordenado e autônomo de células, que escapam do controle de fatores reguladores (os quais mantêm a homeostase) desencadeando assim a formação de uma massa anormal de tecido ou tumor (FILHO et al., 1993). Essa massa anormal tem um crescimento que excede e não está coordenado com o crescimento dos tecidos normais, persistindo mesmo depois de retirada a causa que o provocou (CONTRAN et al., 2000).

Baseado em modelos murinos, o processo de carcinogênese foi dividido em três etapas:

## 1) Iniciação

Este processo inicia com o dano no DNA em uma célula exposta a agentes agressores como: químico, físico ou patogênico. Caso esse DNA não seja reparado, podem ocorrer mutações genéticas que, em alguns casos, podem originar o câncer. O câncer surge quando há aumento da proliferação e redução da apoptose na célula mutada. Essas mutações geralmente aumentam a função de proto-oncogenes (genes celulares que promovem o crescimento e a diferenciação normais, porém quando alterados levam a uma exacerbação do crescimento celular) e/ou inativam genes supressores de tumor (que regulam negativamente o crescimento da célula).

## 2) Promoção

Pode ser definida como um processo de expansão clonal de uma célula iniciada que levará à formação de células pré-neoplásicas produzindo nódulos, pólipos ou papilomas.

## 3) Progressão

Este estágio é caracterizado pela transformação de células pré-neoplásicas em tumores malignos capazes de invadir tecidos e formar metástases (JAKÓBISIAK et al., 2003; CONTRAN, 2000.).

Entretanto, para que uma célula transformada consiga se estabelecer e crescer, esta terá que escapar de vários mecanismos (como expressão de Fas entre outros descritos abaixo) do sistema imune, uma vez que este possui eficácia para operar em todos os estágios da carcinogênese, como também nos estágios de invasão e de metástase (JANEWAY et al., 2000; JAKÓBISIAK et al., 2003).

## **Sistema Imune e Desenvolvimento Tumoral**

Em 1909, Paul Ehrlich iniciou as discussões sobre a atuação do sistema imune na repressão do crescimento de carcinomas, imaginando que este processo ocorria com grande frequência e que, por isso, muitos tumores não se desenvolviam. A partir desta data, várias discussões em torno do papel imune na resposta a neoplasias iniciaram. Cinquenta anos mais tarde, Burnet e Thomas lançaram a teoria da imunovigilância (DUNN et al., 2004; SHREIBER, 2005).

Burnet acreditava que os antígenos novos formados pelos tumores poderiam provocar uma reação imunológica efetiva que culminaria na eliminação destes pelo organismo. Ele propunha ainda que a imunidade anti-tumoral se baseava na discriminação do próprio-não próprio pelo sistema imune. De maneira semelhante, Thomas acreditava que o organismo possuía mecanismos protetores contra as neoplasias, de forma semelhante a aqueles que ocorrem no processo de rejeição ao enxerto, considerando esta a defesa primária contra neoplasia. Inicialmente não houve muito suporte científico para essas hipóteses, mas as mesmas foram consideradas um avanço para o nosso entendimento em relação à resposta imune a imunogenicidade de (DUNN et al., 2004; SHREIBER, 2005; JAKOBISIAK et al., 2003).

Através de modelos experimentais, as idéias de Ehrlich, Burnet e Thomas ganharam suporte científico, e contribuíram para um maior conhecimento sobre o papel do sistema imune na resposta tumoral. Contudo, vários estudos falharam em provar a hipótese da imunovigilância. No início dos anos 90, a utilização de técnicas avançadas como produção de anticorpos monoclonais e manipulação gênica de camundongos, contribuiu com a validação da teoria de imunovigilância ao câncer, expandindo assim seu conceito e o incorporando as contribuições da imunidade inata e adaptativa à resposta ao câncer (DUNN et al., 2004; DUNN et al., 2002; JAKOBISIAK et al., 2003).

A hipótese da imunoedição, citada por Dunn, proporciona um melhor entendimento sobre o escape do tumor ao sistema imune. Esta hipótese parte da idéia de que o sistema imune tem um duplo papel no processo tumoral. Segundo Schreiber (2005) o sistema imune pode atuar no câncer de duas formas: protegendo o hospedeiro contra o desenvolvimento do tumor ou promovendo o desenvolvimento do mesmo através da seleção de variantes com reduzida imunogenicidade (DUNN et al., 2004; SHREIBER, 2005).

.A imunoeedição pode ser dividida em três fases, que dependerá da resposta imunológica (se eficaz ou não) e da resistência das células tumorais à essa resposta. As fases da imunoeedição são:

- Fase de eliminação: Representa o conceito clássico da imunovigilância, em que as células e moléculas da resposta imune inata e adaptativa reconhecem e destroem os tumores, protegendo o hospedeiro contra o câncer.
- Fase de equilíbrio: A fase acima pode erradicar uma grande quantidade de células transformadas, porém algumas podem resistir. Nesta fase, também chamada de período de “seleção Darwiniana”, muitas células tumorais são eliminadas e poucas sofrem mutações, estas poucas tornam-se resistentes ao ataque do sistema imune devido às mutações sofridas.
- Fase de escape: Neste período, as células que sofreram mutações tornaram-se resistentes à resposta imune e sobreviveram, iniciando crescimento exagerado de maneira descontrolada, iniciando assim o escape imunológico e o progresso tumoral (DUNN et al., 2002; DUNN et al., 2004; SHREIBER, 2005)

A imunidade inata tem como componentes principais: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs), complemento e células NK. Os neutrófilos e macrófagos podem fagocitar, lisar células através da citotoxicidade mediada por anticorpos dependentes de citotoxicidade celular (ADCC) quando ligados a tumores e secretar inúmeras citocinas com efeitos direto (TNF) ou indireto (IL-12 e IL-18) na atividade do tumor (DOUBROVINA et al., 2003; JAKOBISIAK et al., 2003).

As células dendríticas são consideradas células apresentadoras profissionais de antígeno (APCs), bem como os linfócitos B e os macrófagos. Elas captam os antígenos na periferia e migram para os linfonodos e apresentam os antígenos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> via MHC de classe II ou a CD8<sup>+</sup> via MHC de classe I. Porém, acredita-se que a apresentação de antígeno ocorra mais facilmente via MHC de classe II e com baixa dose de antígenos (SPIOTTO et al., 2003; OCHSENBEIN, 2002).

As células NK são uma subpopulação de linfócitos que não requerem proliferação para sua atuação, ao contrário dos demais linfócitos: B e T, que são capazes de mediar resposta imune inata inicial às infecções virais e reconhecerem células malignas transformadas. Muitos estudos têm mostrado que a atividade de células NK contra células tumorais, está correlacionada com a não expressão ou a redução na expressão de moléculas de MHC, principalmente o MHC de classe I, fenômeno este conhecido como “missing self”. Assim, as células NK induzem citólise de células alvos

que não expressam um marcador típico do self, o MHC I. Essas células não possuem especificidade anti-tumoral, elas apresentam apenas o receptor de superfície para fragmento Fc das IgG circulantes (CD16 ou FcRI). Se as IgGs circulantes corresponderem a anticorpos contra antígenos tumorais, as células NK poderão reconhecer a célula tumoral revestida de anticorpos e exercer sobre ela uma ação citolítica ou citostática pela citotoxicidade mediada por anticorpos dependentes de citotoxicidade celular (ADCC), provocando poros nas células via produção de perforina. Essa mesma ação citolítica pode induzir apoptose em células tumorais, via dependente ou não de caspases, além desse mecanismo de morte, a célula NK possui outros via CD95L-CD95 (Fas Ligante-Fas ou TNF-RTNF), os quais estão presentes nas membranas das células imunológicas como também células tumorais. As células NK produzem uma variedade de citocinas (incluindo IFN- $\gamma$  que pode ativar macrófagos) e são ativadas na presença de fatores co-estimulatórios como IL-12, IL-2, IL-15 ou IFNs em resposta a condições inflamatórias. Com todas essas características, as células NK podem atuar cooperando com a imunidade adaptativa, detectando rapidamente e eliminando células potencialmente danificadas (BACH et al., 1982; DOUBROVINA et al., 2003; TAKEDA & OKUMURA, 2004; JAKOBISIAK et al., 2003; SMYTH et al., 2001; KHONG & RESTIFO, 2002).

A atuação e o depósito de componentes do complemento em tecidos tumorais têm sido demonstrados em muitos estudos. Entretanto, seu papel na imunovigilância contra o câncer ainda é controverso. Numerosas observações têm mostrado que as células tumorais são protegidas contra os ataques mediados por complemento, porém ainda não se sabe se este mecanismo tem alguma importância na progressão neoplásica (JAKOBISIAK et al., 2003).

Além do importante papel da imunidade inata na resposta imune contra o crescimento e desenvolvimento de tumores, há também a grande participação da imunidade adaptativa composta pelos linfócitos B e T principalmente, além da co-participação de células da imunidade inata (DUNN et al., 2004).

Os linfócitos T são divididos em linfócitos TCD4<sup>+</sup> (auxiliares) e TCD8<sup>+</sup>(citotóxicos), ambos participam da resposta imune adaptativa contra o tumor de forma distinta.

Estudos têm mostrado que os linfócitos TCD4<sup>+</sup> atuam auxiliando na ativação de TCD8<sup>+</sup> através da liberação de citocinas e/ou na ativação de APCs pela interação entre CD40 ligante do TCD4<sup>+</sup> e CD40 da APC para apresentar antígenos para TCD8<sup>+</sup>. Os



linfócitos TCD4<sup>+</sup> têm efeito antitumoral por via independente aos dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> têm efeito anti-tumoral por via independente aos dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>. Eles reconhecem antígenos apresentados por APC restritos ao MHC de classe II, atuando diretamente nas respostas Th1, ativando macrófagos a produzir intermediários reativos de oxigênio (ROS) tais como óxido nítrico e superóxidos, e nas respostas Th2 ativando eosinófilos que liberam o conteúdo de seus grânulos. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup>, os macrófagos e os eosinófilos ativados completam a resposta antitumor levando a ativação de linfócitos TCD8<sup>+</sup>, os quais poderão atuar diretamente sob as células tumorais, na tentativa de eliminá-los. Quanto ao papel dos eosinófilos, pesquisas têm mostrado que a ausência desses prejudica a resposta anti-tumor, porém o mecanismo de ação desses leucócitos sobre as células tumorais, ainda não são esclarecidos. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> ativados tornam-se linfócitos de memória, podem migrar para o sítio do tumor atuando em conjunto com linfócitos TCD8<sup>+</sup> para eliminação das células tumorais, podendo amplificar a resposta imune, pela ativação de outras APCs, que por sua vez, ativam outros linfócitos TCD8<sup>+</sup> (PARDOLL & TOPALIAN, 1998; SMYTH et al., 2001).

Os linfócitos TCD8<sup>+</sup> são capazes de induzir morte das células tumorais por meio de lise da célula tumoral através da atuação de perforina e granzima B. Esta morte acontece quando linfócitos TCD8<sup>+</sup> reconhecem diretamente antígenos associados ao tumor (TAA), os quais são apresentados por APCs via MHC de classe I. As APCs, após capturar os antígenos tumorais, migram para o linfonodo drenante e apresentam estes aos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, os quais são ativados passando a linfócitos T citotóxicos, esses migram para o local onde está alojado o tumor para desempenhar a função citolítica. Uma vez ativado, o linfócito TCD8<sup>+</sup> pode produzir citocinas como IFN- $\gamma$ , que ativam APCs, favorecendo o aumento e a eficácia na apresentação de antígenos a linfócitos T, induzindo uma resposta imune do tipo Th1. Os peptídeos derivados de antígenos tumorais podem ser apresentados aos linfócitos TCD8<sup>+</sup> via MHC de classe I em órgãos linfóides secundários por duas vias: apresentação direta das células dendríticas que migraram, ou indiretamente após a captação e processamento de outras células contendo antígenos tumorais (como macrófagos ou neutrófilos), que serão apresentados por APCs, o que é chamado de apresentação cruzada (PARDOLL & TOPALIAN, 1998; SMYTH et al., 2001; POGGI & ZOCCHI, 2006; OCHSENBEIN, 2005).

Além dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup> e células NK, alguns estudos têm mostrado também a importância das células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) na resposta ao tumor. As

células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foram originalmente descritas por Sakaguchi e colaboradores na década de 90, como células reguladoras geradas no timo que contribuem para manutenção da tolerância imunológica aos próprios componentes do organismo e, por isto mesmo, suprimem doenças autoimunes. As células T reguladoras constituem aproximadamente 10% de todas as células TCD4<sup>+</sup> circulantes no sangue. Por definição, as células T reguladoras são caracterizadas pela expressão de CD25 (cadeia a do receptor de IL-2, expresso também em células T ativadas) e também por níveis variados de expressão de outras moléculas de ativação sendo descritas como CD45RB<sup>low</sup>, CD5<sup>high</sup>, CD44<sup>high</sup>, GITR<sup>high</sup> e CTLA-4<sup>+</sup>. Além disso, as células T reguladoras também expressam um outro marcador específico de célula Treg tímicas. Já foi demonstrado que as célula Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> medeiam sua ação supressora por contato e não pela ação de citocinas ou outros mediadores solúveis. Outras células T reguladoras geradas por ativação em órgãos linfóides periféricos foram posteriormente descritas e, entre elas, podemos citar as células Th3 que produzem predominantemente a citocina anti-inflamatórias TGF-β e as células Tr1 que medeiam sua ação modulatória pela produção de IL-10 (TERABE & BERZOFSKY, 2004; SAKAGUCHI et al., 1995; RUDGE et al., 2006; FEHERVARI e SAKAGUCHI, 2004).

Alguns autores mostram que a eliminação das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> leva uma resposta imune efetiva contra tumores singênicos. Muitos tumores expressam antígenos que são reconhecidos por células T autólogas, porém as células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, que mantêm a tolerância aos auto-componentes do organismo, podem impedir a geração e ativação de células T efetoras capazes de reconhecer as células tumorais autólogas. As células T reguladoras ocorrem naturalmente, têm capacidade de reconhecer antígenos próprios e não – próprios, e a maioria delas expressa a molécula CD25 (SAKAGUCHI, 2004).

Os linfócitos B também atuam na resposta tumoral com a colaboração de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e células dendríticas que auxiliam na sua ativação. Os linfócitos B produzem anticorpos que reagem com as proteínas tumorais. Porém, estes anticorpos por si só não são tóxicos aos tumores, mas podem atuar bloqueando moléculas de sinalização, na superfície celular, as quais são vitais para os tumores. Estes também podem atuar por mecanismos efetores secundários, como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Apesar da sua importância no mecanismo efetor contra o tumor, o CDC ainda não tem seu papel esclarecido in vivo, acredita-se que este seja limitado por proteínas

reguladoras do complemento das células tumorais. Por outro lado, tem sido relatado que a ADCC tem um papel dominante no mecanismo efetor contra tumores “*in vivo*”, uma vez que pode atuar de forma concomitante a células da imunidade inata, como as células NK (DRANOFF, 2004; OCHSENBEIN, 2002; OCHSENBEIN, 2005).

Em resumo, os antígenos tumorais são processados pelas APCs (macrófagos ou células dendríticas) e apresentados aos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, que produzem citocinas juntamente com as APCs para ativarem os linfócitos TCD8<sup>+</sup> e manterem a resposta ao tumor (PARDOLL & TOPALIAN, 1998.).

As células tumorais são semelhantes às células normais do corpo, por isso o sistema imune parece incapaz de eliminá-las efetivamente. A influência não se deve aos receptores, pois os tumores expressam peptídeos antigênicos que podem ser reconhecidos por linfócitos T específicos. Por exemplo, as células tumorais sofrem mutações que alteram os antígenos presentes na sua superfície celular, os quais podem ser reconhecidos por células do sistema imune. Estes “novos antígenos” são chamados antígenos tumorais ou antígenos tumorais específicos (TSAs), que estão presentes nas células tumorais e ausentes nas células normais. Existem também os antígenos que estão presentes tanto nas células normais como nas tumorais, sendo chamados de antígenos associados a tumores (TAAs). Todos esses antígenos podem ser reconhecidos pelo sistema imune, principalmente por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, e então, serem eliminados do organismo. Contudo, estes antígenos expressos pelos tumores são moléculas próprias podendo ser ignoradas pelo sistema imune levando a uma tolerância às células tumorais (SMYTH et al., 2001; JANEWAY et al., 2000).

As células tumorais possuem alguns mecanismos, pelos quais conseguem escapar do sistema imunológico.

Alguns autores sugerem que as células tumorais, assim como os linfócitos T e células NK, podem expressar FAS-Ligante (receptor da família do TNF, expresso por diferentes células - FasL) e, com isto, escapar da resposta imune. Quando os linfócitos T e células NK reconhecem e são ativados pelas células tumorais, esses produzem FasL para induzir a morte do tumor, por apoptose, porém alguns carcinomas adquirem mecanismos intracelulares que os permitem resistir à apoptose. Um dos mecanismos descrito na literatura é a produção de uma molécula que neutraliza o FasL, conhecido como DcR3 (Decoy receptor that neutralizes FasL) bloqueando a célula T efetora. Ao mesmo tempo, as células tumorais também podem expressar FasL induzindo a morte

dos linfócitos T e células NK na vizinhança ou apresentar reduzida produção de Fas resistindo assim à resposta imune (NAGATA, 1996; JAKOBISIAK et al., 2003 ).

Estudos mostraram que a perda parcial ou completa de MHC I pode ser um dos mecanismos de escape de tumores, porém as células NK poderiam reconhecer esses tipos de tumores. Contudo, em locais considerados estéreis, onde há a presença de células tumorais ou transplantes, os fatores co-estimulatórios (interleucinas) não estão disponíveis ou as células tumorais não as expressam, o que impede a ativação de células NK via CD28 e CD27, além da não maturação e não ativação de células dendríticas por falta de expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80, CD40, CD86 e CD70. Com isso, os tumores que não expressam MHC I conseguem escapar da resposta imune e se desenvolvem (KHONG & RESTIFO, 2002).

As células tumorais podem também aumentar a expressão em suas membranas de proteínas reguladoras (CD46, CD55 e CD59) que são responsáveis por inativar alguns componentes do sistema complemento (JAKOBISIAK et al., 2003).

Tumores expressam antígenos que podem ser reconhecidos, pelo sistema imune, mas que são perdidos devido à internalização induzida por anticorpos ou por variação gênica (JANEWAY et al., 2000).

Os tumores também podem escapar da rejeição através da produção de citocinas imunossupressoras, como TGF- $\beta$  (fator de crescimento e transformação  $\beta$ ) ou MIF (fator inibitório de migração de macrófago), que suprimem a resposta das células T inflamatórias, e assim, a imunidade celular que é necessária para controlar o crescimento tumoral. Estudos também mostraram que TGF- $\beta$  estimula a invasão tumoral e pode inibir a ativação, proliferação e atividade de linfócitos *in vivo*.(AKHURST & BALMAIN, 1999; KHONG & RESTIFO, 2002).

O crescimento tumoral provoca um dano tecidual causado pela liberação de radicais livres, redução de nutrientes local e do pH, resultando em processo de morte por necrose ou apoptose, que poderá refletir em um processo inflamatório com recrutamento de células gerando uma resposta imune que poderá ou não destruir o tumor. Caso os tumores consigam escapar do sistema imune, esse se estabelece, cresce, multiplica e gera metástases podendo ser fatal ao indivíduo (KHONG & RESTIFO, 2002).

Para o tratamento do câncer, existem hoje vários tratamentos efetivos que estão sendo utilizados. Entre eles: a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia, a imunoterapia e a terapia nutricional (FRANKS & TEICH, 1990).

A terapia nutricional é uma das formas de prevenir e ajudar os pacientes a conviverem melhor com o câncer. Hoje em dia tem-se usado muito a terapia antioxidante, utilizando-se alimentos ricos em vitamina A, C, E, além de micro nutrientes como zinco e selênio para melhorar e até mesmo tratar alguns tipos iniciais de câncer (SANTOS & CRUZ, 2001).

## **O Papel do Selênio no Desenvolvimento Tumoral**

O selênio é um micro-nutriente considerado antioxidante, que está presente em alimentos como castanha do Pará, em cereais, grãos e vegetais, e faz parte de componentes de várias enzimas como: glutathiona peroxidase e a tioredoxina redutase (TAPIERO et al., 2003; RAYMAN, 2000; FERGUSON et al., 2004).

Historicamente, o selênio foi considerado um elemento tóxico e carcinogênico. A partir da década de 25 começou a ter papel essencial na composição dietética de homens e animais. Já o uso como anticarcinogênico teve início após 1982, quando resultados de um estudo mostraram, em um simpósio, que o selênio funcionava como quimio-preventivo em carcinogênese mamária. A partir de então, o selênio passou a ser estudado como anticarcinogênico, e esse efeito tem sido demonstrado em vários modelos experimentais (THOMPSON, 1984; PETRIE et al, 1989; KOLLER et al, 1985).

Estudos relacionando a suplementação do selênio com a resposta imune, utilizando tumores como modelo, têm mostrado que este nutriente consegue em muitos casos reduzir ou inibir o crescimento destes seja em humanos ou em modelos murinos (BJORKHEM-BERGGMAN, et al., 2005; REID, et al., 2002).

Estudos epidemiológicos em humanos têm mostrado a relação inversa entre a ingestão de selênio e a incidência de câncer. Animais recebendo uma dieta suplementada com selênio mostram uma redução na incidência de tumores ou no tamanho do tumor. Contudo, o mecanismo responsável por este fenômeno ainda não é esclarecido, mas acredita-se que a ação do selênio em inibir o crescimento tumoral possa incluir os seguintes processos: atividade antioxidante sobre as selenoproteínas (Glutathiona peroxidase e tioredoxina redutase), efeito antiinflamatório derivado de interações com o sistema imune e a via de cicloxigenase-lipoxigenase, e também mudanças na expressão global de gene, que pode bloquear a progressão do ciclo celular ou induzir a apoptose em ambos precursores tumorais ou células estromais (WHANGER, 1983; PETRIE et al, 1989,; FELIX et al., 2004; SONN et al.,2005).

Segundo Petrie e colaboradores (1989), a suplementação de uma dieta balanceada com 4 ppm de selênio na forma de selenito de sódio (inorgânico), para camundongos inoculados com células de mastocitoma, resultou em aumento da atividade de células NK e linfócitos TCD8<sup>+</sup> e uma redução no tamanho tumoral.

Investigando o efeito do selênio na atividade de células NK, Koller e colaboradores (1985) mostraram que a suplementação de 2 ppm de selênio inorgânico,

na água, provocou um aumento na atividade dessas células. Contudo, o mecanismo pelo qual o selênio leva à ativação das células NK ainda não tinha sido concluído. Alguns estudos mostram que a suplementação com este micro-nutriente ativa estas células aumentando a expressão de IL-2 e IFN- $\gamma$ , e outros mostram que a suplementação induz a proliferação e ativação de linfócitos por via independente de citocinas (IL-2 como IL-1). A ação do selênio na resposta imune acomete a resposta mediada por célula, enquanto que a resposta imune humoral não tem sido afetada (BROOME et al., 2004; KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, et al., 1990; KOLLER et al., 1985; PETRIE et al., 1989; WHANGER, 2004).

Alguns estudos verificaram que o selênio é capaz de inibir a atividade de NF $\kappa$ - $\beta$ , proteína ativadora 1 (AP-1), e proteína quinase C (PKC), dessa forma o selênio estaria inibindo a proliferação celular e induzindo à apoptose, uma vez que fatores de transcrição estão envolvidos em ambos processos (ZELCO et al, 2002; KIM & MILNER, 2001; OPALAKRISHNA & GUNDIMEDA, 2001).

Com todo este conhecimento, o uso do selênio em câncer está sendo testado e tem mostrado alguns resultados relacionados à apoptose de células tumorais. Em pacientes com câncer de próstata ou câncer de mama, o tratamento com selênio levou à apoptose das células tumorais. Já o tratamento concomitantemente com quimioterápicos e selênio, em paciente com carcinoma de pulmão, levou a uma maciça apoptose das células tumorais, enquanto o tratamento quimioterápico resultou apenas em necrose dessas células. Estudos se fazem necessários para compreender melhor os mecanismo pelos quais o selênio pode induzir apoptose (BOREK, 2004).

## A Ação da Vitamina E no Desenvolvimento Tumoral

Outro antioxidante muito estudado no tratamento do câncer e que também vem mostrando resultados interessantes é a vitamina E, considerada o principal antioxidante da membrana celular, por ser capaz de inibir a ação dos radicais livres, prevenindo a peroxidação lipídica (COZZOLINO, 2005)

Ela foi descoberta na Universidade da Califórnia em Berkeley em 1922 por Evans e Bishop, quando demonstraram que um fator lipossolúvel (chamado até então fator X) prevenia morte fetal em animais alimentados com gordura rançosa (RIMBACH et al., 2002).

Além da ação como antioxidante, a vitamina E também tem sido descrita como anti-inflamatório, uma vez que possui capacidade de inibir adesão de leucócitos e agregação de plaquetas (KAGAN et al, 1990; BRIGELIUS-FLOHÉ et al, 2002).

Sabe-se que a vitamina E é composta por grupo de oito formas que ocorrem naturalmente incluindo: tocoferóis e tocotrienos com subtipos como:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ . E um dos constituintes mais abundantes e ativo biologicamente deste nutriente é o  $\alpha$ -tocoferol, capaz de seqüestrar radicais peroxil e impedir a peroxidação lipídica da membrana. O  $\alpha$ -tocoferol na forma de succinato tem recebido atenção especial pela sua potencial ação contra o câncer (KAGAN et al, 1990; BRIGELIUS-FLOHÉ et al, 2002; QUIN et al., 2004; BOREK, 2004; DURVALL, 2005).

A vitamina E é encontrada em diversos alimentos, como: óleos vegetais (girassol, milho, canola, amêndoa), azeite, gérmen de trigo e brócolis (COZZOLINO, 2005).

Diversos estudos têm mostrado que a ingestão de vitamina E, na forma de succinato de vitamina E, inibe o crescimento de alguns tipos de tumores *in vitro* e *in vivo*. Esta inibição tem sido relacionada à ativação do sistema imune, contudo mecanismos ainda estão sendo estudados (MALAFA et al, 2002; QUIN, J. et al, 2004; BOREK, 2004; MORIGUCHI et al., 1998).

Quanto a ação da vitamina E no sistema imune, esta tem sido avaliada em modelos utilizando animais idosos de 26 meses em média ou animais jovens. A utilização de suplementação de vitamina E em dietas de camundongos idosos tem mostrado que este nutriente é capaz de reverter o quadro de declínio da função imune que ocorre fisiologicamente com o envelhecimento. Estes trabalhos mostraram aumento da diferenciação de células T no timo com aumento da produção de IL-2 e redução na



produção de PGE2 por macrófagos em camundongos após suplementação com vitamina E quando comparado com animais não suplementados. Em outros trabalhos, estes resultados foram vistos em camundongos jovens. Houve aumento no número de células T e de suas atividades proliferativas. A vitamina E também aumentou a proliferação de células T e a função de células NK *in vitro*. (MORIGUCHI et al., 1998; WAKIKAWA et al., 1999; HSIEH & LIN, 2005; ASHFAQ et al., 2000).

Han e colaboradores (2000) mostraram, em um modelo de camundongos idosos infectados com o vírus da influenza, que a suplementação com 500 ppm de vitamina E levou a um aumento na resposta Th1 com aumento na produção de IFN- $\gamma$  ao analisar células do baço.

Outra atuação mostrada da suplementação de vitamina E tem sido o seu efeito na modulação do status redox afetando passos importantes da via de ativação do NF $\kappa$ - $\beta$ , que é responsável por controlar a expressão de diferentes genes relacionados à proliferação celular e inflamação. Dessa forma, a vitamina E pode influenciar na transcrição de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, bem como em moléculas de adesão como molécula de adesão intercelular (ICAM) e molécula de adesão de célula vascular (VCAM), que são dependentes de NF $\kappa$ - $\beta$ . Por causa dessa atuação anti-inflamatória da vitamina E, esta tem sido usada em experimentos e tratamentos de aterosclerose (NAKAMURA et al., 1998; ERL et al., 1997; CARVALHO et al., 2005).

Tem sido atribuída à vitamina E uma ação anticarcinogênica, uma vez que a suplementação com este nutriente leva à inibição no crescimento de tumores e na formação de metástases (BOREK, 2004).

Estudos utilizando células de melanoma *in vitro* mostraram que a vitamina E pode inibir o crescimento de células tumorais por vários mecanismos, dentre eles: modulação da adenilato ciclase, inibição da atividade de proteína quinase C, regulação de TGF- $\beta$ , aumento da expressão de receptores de TGF- $\beta$  tipo II, bloqueio do ciclo celular e interrupção da síntese de DNA. Em estudos de câncer de mama em camundongos nude, a vitamina E inibiu o crescimento tumoral através da inibição da expressão de gene de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (MALAFA et al., 2002; BOREK, 2004).

A utilização de injeção intraperitoneal de vitamina E em modelos murinos de melanoma revelou uma inibição no crescimento deste tumor, da mesma forma, a vitamina E diminuiu o crescimento de câncer de pulmão em modelo murino tanto *in*

*vivo* como *in vitro*. Contudo, o mecanismo pelo qual a vitamina E inibe o crescimento ou a metástase ainda necessita de maior esclarecimento (MALAFA et al, 2002; QUIN, et al., 2004).

Estudos em humanos ainda apresentam muitas controvérsias, alguns deles relatam que a suplementação de vitamina E levou à redução na incidência e na mortalidade de pacientes com câncer de próstata. Por outro lado, outros estudos em pacientes com câncer de próstata mostraram que a vitamina E não teve nenhum efeito. Uma vez que, a literatura apresenta resultados contraditórios, faz-se necessário conhecer melhor qual o efeito da suplementação de vitamina E no crescimento de tumores, bem como seu mecanismo (BRIGELIUS-FLOHÉ, et al., 2007; SONN et al., 2005).

## **O Tumor de Ehrlich**

Um grande avanço no estudo dos tumores tem sido utilizar métodos experimentais, onde são usados tumores transplantáveis ou transmissíveis. Esses são tumores de animais, mantidos em laboratório, pelo transplante de células tumorais a hospedeiros susceptíveis, como por exemplo, o tumor de Ehrlich (DAGLI, 1989).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, é correspondente a um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906. Originalmente, de crescimento sólido foi convertido na forma ascítica por Loewenthal and Jahn (1932), e desde então é estudado na forma sólida, quando as células são inoculadas no tecido subcutâneo, ou na forma ascítica, quando inoculado na cavidade peritoneal (EHRlich, 1906; KLEIN & KLEIN, 1956).

Segundo Dagli (DAGLI, 1989) a avaliação histológica do tumor de Ehrlich na forma sólida pode ser descrita como: células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares.

Este tumor é considerado pouco imunogênico por não expressar MHC de classe II durante o seu crescimento. Caracterizado por levar à baixa resposta de linfócito T a mitógenos e a uma progressiva perda na atividade de célula NK do baço. Além disso, o tumor na forma sólida provoca no hospedeiro uma acentuada esplenomegalia, hematopoiese esplênica e desenvolvimento de células supressoras (BERGAMI-SANTOS et al., 2004; SEGURA et al., 1997; MORALES et al., 1999).

Segura e colaboradores (1997) mostraram que o tumor de Ehrlich na forma ascítica induziu uma redução no número de linfócitos TCD4<sup>+</sup> no baço e o total destas células expressando IFN- $\gamma$ , também provocou um aumento de macrófagos e células CD18, sugerindo uma modulação da resposta de linfócitos Th1, que contribuiu com o crescimento tumoral. Estes dados sugerem que os linfócitos são previamente ativados, porém estes não migraram para o local do tumor, favorecendo o crescimento do mesmo. Os autores acreditam que a retenção dos linfócitos ativados no baço pode ser explicada pelo aumento de macrófagos supressivos, que liberam substâncias inibitórias ao sistema imune como PGE2 ou pela produção de TGF- $\beta$  pelo próprio tumor, que leva à inibição da ativação de células T. Neste estudo também foi verificado um aumento no número de linfócitos B.

## 2. JUSTIFICATIVA

Com base nos dados da literatura, nós acreditamos que o selênio e a vitamina E, considerados anticarcinogênicos, possam exercer sua ação antineoplásica sobre as células do tumor de Ehrlich. Nossa hipótese é de que esses nutrientes exerçam sua ação anticarcinogênica através da ativação de células como NK e linfócitos TCD8<sup>+</sup>, os quais podem desencadear mecanismos de morte, como por exemplo apoptose, através da ligação Faz-Faz ligante ou TNF-RTNF, dessa forma contribuindo com a redução do tumor ou eliminação das células tumorais via apoptose das células neoplásicas.

Para provar nossa hipótese de trabalho, pretendemos submeter camundongos fêmeas de 8 semanas portadoras de tumor de Ehrlich, na forma sólida, a uma dieta balanceada suplementada com selênio ou vitamina E, para que estes nutrientes possam exercer sua atividade anti-tumoral e impedir ou reduzir o crescimento do tumor. No final do experimento será verificado este efeito através de uma coloração especial para verificar presença ou não de apoptose, e análise fenotípica de células do sistema imune presentes nos órgãos linfóides destes animais, como baço e linfonodo poplíteo para verificação da atividade das células NK e linfócitos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 . OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito de uma dieta suplementada com selênio ou vitamina E no crescimento e na resposta imunológica ao tumor de Ehrlich na forma sólida inoculado em camundongos BALB/c.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito do selênio e da vitamina E no crescimento do tumor de Ehrlich na forma sólida em camundongos BALB/C, quanto aos seguintes parâmetros:
  - Crescimento do tumor
  - Quadro histológico do tumor
  - Índice de apoptose celular das células do tumor de Ehrlich.
  
- Avaliar o efeito do selênio e da vitamina E em animais com ou sem tumor de Ehrlich, nos seguintes parâmetros orgânicos:
  - Peso corpóreo do animal
  - Estado nutricional através da dosagem sérica de glicose, albumina e proteínas totais
  - Contagem de leucócitos totais e diferenciais
  - Contagem de hemácias .
  
- Avaliar o efeito do selênio e da vitamina E no sistema imune na presença e ausência do tumor, com as seguintes análises:
  - Perfil da população de células linfóides presentes no baço e linfonodos poplíteos;
  - Perfil de citocinas produzidas por macrófagos peritoneais;
  - Níveis de óxido nítrico produzidos por estes macrófagos;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1) ANIMAIS**

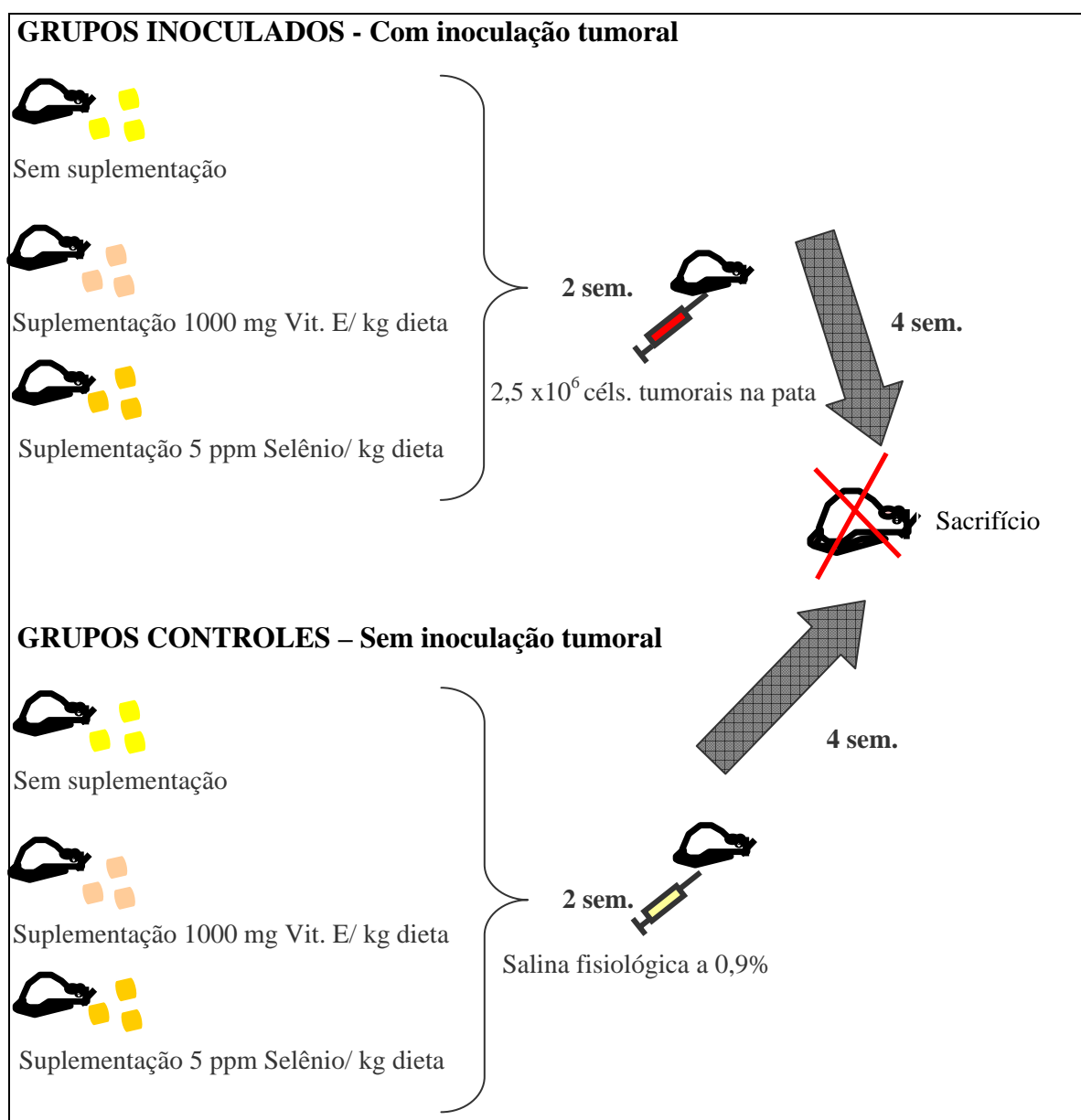
Para realização deste projeto foram utilizados camundongos de 8 semanas de idade (2 meses), fêmeas da linhagem BALB/C, provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, os quais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Geral sob condições controladas de luz e temperatura. Assim que chegaram do CEBIO, os camundongos receberam Invermictina a 1% (Chemitec, Brasil) para controle parasitológico por sete dias. Após uma semana de tratamento descrito anteriormente, os foram divididos em grupos e os experimentos iniciados.

### **4.2) PREPARO DAS DIETAS**

A dieta foi preparada de acordo com os manuais do American Institute of Nutrition (AIN 93G), cuja composição detalhada foi anteriormente publicada (REEVES, 1997). Essas dietas foram administradas *ad libitum* em forma sólida 2 semanas antes da inoculação tumoral para adaptação dos animais, e continuamente durante as quatro semanas subsequentes do experimento.

Cada quilo da dieta foi suplementada com 5 ppm de selênio (SEL-PREX) ou 1000 mg de vitamina E (na forma de succinato), que foi administrada para os grupos experimentais correspondentes.

#### 4.3) PROTOCOLO EXPERIMENTAL



**Figura 1: Protocolo experimental.** O trabalho foi realizado com 6 grupos experimentais de camundongos BALB/c, contendo 5 animais em cada grupo. Os animais receberam uma dieta suplementada ou não com vitamina E ou selênio conforme o esquema acima por duas semanas, após esse período os animais dos grupos inoculados receberam células de tumor de Ehrlich na concentração de  $2,5 \times 10^6$  no coxim plantar esquerdo de cada animal. Enquanto os animais dos grupos controles receberam uma injeção no coxim plantar de salina fisiológica a 0,9%. Depois da inoculação dos animais, esses permaneceram no tratamento dietético por mais quatro semanas, quando foram sacrificados. No dia do sacrifício foram coletados: baço, linfonodo poplíteo, macrófagos peritoneais, coxim plantar e sangue de cada animal dos grupos experimentais para avaliação de parâmetros imunológicos, histológicos e nutricionais.

#### 4.4) TRATAMENTO DIETÉTICO

Os animais receberam dieta balanceada com caseína (AIN 93G), ou a mesma dieta suplementada com selênio (SEL-PREX), na dose de 5 ppm/ kg de dieta; ou outra suplementada com vitamina E na dose de 1000 mg de vitamina E (na forma de

succinato) por kg de dieta. Estes tratamentos foram administrados durante todo o experimento, logo após a vermifugação.

#### **4.5) TUMOR EXPERIMENTAL**

O tumor experimental utilizado foi o Tumor Ascítico de Ehrlich, o qual foi mantido na forma ascítica em camundongos Swiss.

##### **4.5.1) Manutenção do Tumor de Ehrlich**

O Tumor de Ehrlich foi mantido em nosso Biotério na forma ascítica, em camundongos Swiss. Semanalmente, cerca de 0,2 mL de fluído ascítico foram colhidos destes animais e imediatamente inoculado intra-peritonealmente em outros animais sadios. Três semanas antes de iniciar o experimento, o fluído ascítico foi transferido para animais BALB/c Este procedimento foi repetido três vezes antes da inoculação das células no coxim plantar dos animais sadios dos grupos inoculados.

##### **4.5.2) Preparo das células Tumorais para inoculação**

No dia da inoculação tumoral, foram coletados 3,0 mL de fluído ascítico de camundongos pré-inoculados há aproximadamente 10 dias com tumor de Ehrlich. Esse fluído foi centrifugado (3000 rpm) durante três minutos. O sobrenadante foi então descartado, e as células ressuspensas em salina fisiológica e centrifugadas novamente. Esse procedimento foi repetido por três vezes ou até a obtenção de um sobrenadante límpido, claro e denso, que correspondia a uma suspensão celular com o mínimo de fibrina e hemácias.

Para ajuste da concentração de células, foi realizada a contagem e o teste de viabilidade dessas células tumorais. Para isto, 20 µl de suspensão celular foram adicionados a 1980 µl de salina fisiológica. Depois de homogeneizar, foram retirados 100 µl dessa suspensão diluída, e adicionada a 100 µl de corante azul de Tripán a 0,1%. A contagem foi feita em câmara de Neubauer, sendo contadas as células contidas nos quatro quadrantes externos. As células coradas em azul, devido ao corante, foram consideradas inviáveis, e as células translúcidas consideradas viáveis. Para inoculação, a viabilidade considerada foi em torno de 90%. Para o experimento,  $2,5 \times 10^6$  células do tumor de Ehrlich num volume de 0,05 mL foram administradas no coxim plantar do membro posterior esquerdo para obtenção do tumor na forma sólida. A fórmula final



para determinação do número de células viáveis foi deduzida, segundo DAGLI e colaboradores (1992):

Número de células por mL= Número de células contatas X Fator de correção

Sendo que:

Fator de correção = Fator de profundidade X Fator de diluição

#### **4.6) AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL**

##### **4.6.1) Tamanho**

Por 30 dias, o crescimento tumoral foi mensurado por dois dias nas quatro semanas de acompanhamento, através de um micrômetro as patas dos animais forma medidas, e, ao final, esses animais foram sacrificados utilizando anestésicos compostos por uma mistura de xilazina (ROMPUM) – 10 mg/Kg e ketamina (DOPALEN) – 100 mg/Kg.

##### **4.6.2) Histopatologia**

No final do experimento, os animais foram sacrificados e o coxim plantar coletado para análise histopatológica. O material foi fixado em formol tamponado a 10%, desidratado em soluções sucessivas de álcoois e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo, obtendo-se cortes de 5 µm, que posteriormente foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) para confirmação do diagnóstico e avaliação microscópica do processo neoplásico e inflamatório e mensuração da área de necrose.

##### **4.6.3) Avaliação da apoptose:**

Foi coletado o coxim plantar para detecção de apoptose em lâminas coradas por Shorr. Esta coloração segue os passos da coloração de Hematoxílina-Eosina (H-E), porém a eosina é substituída pelo corante tricômico de Shorr. Esta coloração evidencia os núcleos possibilitando diferenciar células normais de células em processo de apoptose. A confirmação foi feita por um especialista em apoptose.

#### **4.7) AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO DOS ANIMAIS**

O peso dos animais foi verificado antes da inoculação do tumor e da administração da dieta, bem como durante todo o tratamento e no dia anterior ao sacrifício.

#### **4.8) OBTENÇÃO DO SANGUE TOTAL E DO SORO**

As sangrias foram feitas no dia do sacrifício, através dos vasos axilares, em camundongos anestesiados como uma mistura de xilazina (ROMPUM)- 10 mg/ kg e Ketamina (DOPALEN)- 100 mg/Kg. Parte da amostra foi colocada em microtubos contendo anticoagulante EDTA para contagem de leucócitos e hemácias. A outra parte da amostra foi colocada na estufa a 37 °C e após 30 minutos foi para geladeira por mais 30 minutos, sendo logo após centrifugadas a 1500 rpm por 8 minutos. O soro foi coletado e armazenado em microtubos em freezer para dosagem de glicose, albumina e proteínas totais.

#### **4.9) CONFECÇÃO DE ESFREGAÇO SANGUÍNEO E COLORAÇÃO DAS LÂMINAS**

Uma gota do sangue total foi colocada sobre uma lâmina limpa, e com ajuda de outra lâmina em uma inclinação de 45 °C, a qual deslizou sobre a gota de sangue em sentido contrário, confeccionando assim o esfregaço. As lâminas foram coradas por May-Grunwald e Giemsa.

#### **4.10) CONTAGEM GLOBAL DE LEUCÓCITOS**

Em 400 µl de uma solução de ácido acético a 2%, própria para contagem global de leucócitos, foram adicionados 20 µl de sangue total. Agitou-se bem e cerca de 50 µl dessa diluição foi colocada em uma câmara de Neubauer para realização da contagem, utilizando os quatro campos externos da câmara. Após a contagem, o valor encontrado foi calculado pela fórmula:

$$\text{Leucócitos por mm}^3 \text{ de sangue} = \frac{\text{valor contado} \times 10 \times \text{Diluição}}{\text{Número de campos}}$$

10 = fator de conversão para 1 mm<sup>3</sup>

#### **4.11) CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS**

Os leucócitos foram contados em um esfregaço sanguíneo corado. Essas células foram contadas até se obter uma soma igual a 100 de todos os leucócitos, o que está relacionado ao percentual de leucócitos no esfregaço. Após a contagem, o percentual encontrado foi multiplicado pelo valor global de leucócitos para encontrar o valor em mm<sup>3</sup>.

#### **4.12) CONTAGEM DE HEMÁCIAS**

Foram transferidos para 4,0 mL de uma solução de citrato de sódio a 4%, 20 µl de sangue colhido em EDTA. Desta diluição foram coletados 50 µl para colocar na Câmara de Neubauer . Após sedimentação por 5 minutos contou-se cinco campos da parte central da câmara. Após a contagem o valor encontrado foi multiplicado por 10.000, o qual é um fator que corresponde à profundidade da câmara, à diluição e ao número de campos contados.

#### **4.13) DOSAGEM DE GLICOSE E ALBUMINA**

A avaliação dos níveis de glicemia e albumina dos animais foi realizada através de um Kit da Bioclin, onde 10 µl de soro dos animais ou do padrão (de glicose e albumina) foram colocados em 1000 µl de reagente de cor específico. Para glicose, a reação foi colocada em banho-maria por 10 minutos, e para albumina foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo logo após realizada a leitura em um espectrofotômetro com filtro de 500 nm para glicose e 630 nm para albumina. A absorbância lida foi multiplicada pelo fator de calibração, o qual está relacionado com a absorbância do padrão. Este fator é calculado da seguinte forma:

Fator = Concentração do padrão (glicose ou albumina)/absorbância do padrão.

Concentração do padrão de glicose: 100 mg/dL;

Concentração do padrão de albumina: 4,0 g/dL

#### **4.14) DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS**

Proteína Total foi medida utilizando também um Kit da Bioclin, onde 50 µl de soro dos animais ou do padrão foram colocados em 2,5 ml de Reagente de Biureto, os quais ficaram por 10 minutos à temperatura ambiente, logo após a leitura foi realizada em um espectrofotômetro com filtro de 545 nm. A absorbância lida foi multiplicada pelo fator, o qual também é calculado conforme os fatores de albumina e glicose, sendo que a concentração do padrão de proteínas totais é 4,0 g/dL.

#### **4.15) PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES PARA CITOMETRIA DE FLUXO**

#### A. Preparação de suspensões de linfonodos e baço

As suspensões de células do baço e linfonodos poplíteos foram preparadas de acordo com o método descrito por Taylor e colaboradores (1987). Toda técnica foi feita em gelo.

Após o sacrifício dos animais, o baço foi retirado cuidadosamente com uma pinça cirúrgica, e colocado em um tubo Falcon de 15 ml contendo 3 mL de meio RPMI 1640. Este órgão foi macerado com ajuda de um macerador da SIGMA, e depois transferido novamente para o tubo Falcon, onde foram acrescentados mais 2 mL de meio RPMI. Esse tubo foi centrifugado a 1200 rpm por 7 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi desgrudado do fundo sob agitação, logo após foi acrescentado 9 mL de água e 1 mL de PBS 10X concentrado à células retidas no fundo do tubo. Essa suspensão foi centrifugada novamente a 1200 rpm por 7 minutos em 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e o concentrado celular ressuspendido em 1 mL de meio RPMI 1640, para contagem.

O linfonodo poplíteo foi retirado e colocado em um tubo Falcon de 15 ml contendo 3 ml de RPMI 1640 completo. Este órgão foi macerado com ajuda de duas lâminas de vidro. Sob uma placa de Petri e utilizando a parte fosca destas lâminas, o linfonodo políteo foi pressionado entre as duas extremidades destas até a ruptura da cápsula e liberação das células do órgão. As células foram coletadas e transferidas para o tubo Falcon novamente, e o volume completado para 4 ml de RPMI 1640 completo. Essa suspensão foi centrifugada a 1200 rpm por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e o concentrado celular ressuspendido em 1 mL de meio RPMI 1640 completo, para contagem.

#### B. Contagem de células

Para contagem das células viáveis utilizamos uma solução de eritrocina, que cora células mortas. Para contagem de células do baço, 2 µl de suspensão de célula foram adicionados a 798 µl de meio completo, e posteriormente 50 µl dessa suspensão celular foram adicionados a 50 µl de eritrocina. Para contagem de células do linfonodo poplíteo, 5 µl de suspensão da célula foram adicionados a 495 µl de meio completo, e posteriormente 50 µl dessa suspensão celular foram adicionados a 50 µl de eritrocina. Essa mistura foi colocada em uma quantidade suficiente para preencher a Câmara de

Neubauer, para contagem das células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas), utilizando os quatros campos externos. O valor encontrado foi calculado pela fórmula:  
$$\text{N}^\circ \text{ de céls/ml} = (\text{n}^\circ \text{ cels. Viáveis} \times \text{diluição} \times 10^4) / \text{N}^\circ \text{ campos contados na câmara de Neubauer.}$$

#### C. Preparação de células para Citometria

Para análise da presença de células específicas, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, com a ajuda do aparelho FACSCAN. Para tanto, 25 µl de uma suspensão celular contendo  $2 \times 10^7$  células./mL foram incubados com 10 µl de anticorpo específico diluído marcado com fluorocromos (PE, FITC ou Cy5) em uma placa de fundo em U por 30 minutos em câmara escura na geladeira. Após este tempo foram adicionados à placa 175 µl de PBS 1X com 0,01% de azida para lavagem da suspensão. Esta placa foi centrifugada a 1200 rpm por 7 minutos em 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o procedimento realizado por mais 2 vezes. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e adicionados 200 µl do fixador (Macs Facs Fix), a alíquota foi transferida para tubos de contagem. As amostras foram levadas para o citômetro para análise das mesmas.

#### D. Tipos de marcadores fenotípicos celulares

Para obtenção de dados qualitativos sobre os fenótipos apresentados pelas células linfóides do baço e do linfonodo, foram utilizados as seguintes combinações de anticorpos anti-moléculas de superfície de camundongos:

CD3CyChrome/ CD4 FITC/ CD8 PE – Sub-populações de linfócitos T

CD3 CyChrome/ NK PE/ CD69 FITC – Células NK ativadas

CD4 FITC/ CD25 PE –Células T ativadas

CD3 CyChrome/ CD8 PE/ CD69 FITC – Sub-população de Linfócitos TCD8<sup>+</sup> ativados

CD19 PE – Sub-população de Linfócitos B

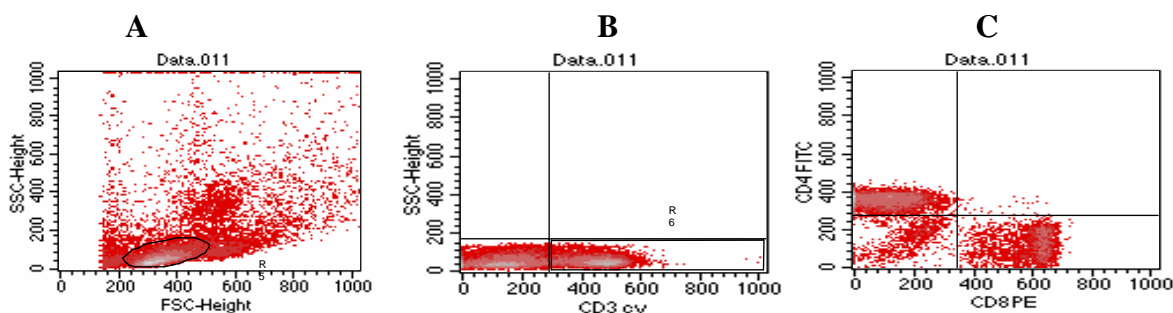
Em todas células dos órgãos estudados, foram utilizados os anticorpos IgG2a FITC e IgG2a PE para o controle negativo, consistindo de células incubadas com imunoglobulinas do mesmo isotipo usado no anticorpo marcado.

#### 4.16) OBTENÇÃO DOS DADOS NO CITÔMETRO DE FLUXO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise de citometria de fluxo foi feita usando o FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, Califórnia). A porcentagem de células positivas foi analisada através do software Cell Quest em comparação ao controle negativo. Foram adquiridos 30.000 eventos para análise. A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual de populações e sub-populações celulares, foi realizada através de um sistema computacional acoplado ao citômetro.

##### A. Estratégia de análise

A Figura 2 mostra, de maneira esquemática, a seqüência de procedimentos necessários para análise dos dados no fenótipo celular. O primeiro passo consiste na identificação de populações de leucócitos de interesse: os linfócitos. Na Figura 2a temos um gráfico do tipo pontual (dot plot) onde se avalia o tamanho celular (FCS) e a granulosidade (SSC) dos leucócitos. Após a seleção dos linfócitos, estes são analisados utilizando-se a intensidade de fluorescência apresentada por eles, em um gráfico de fluorescência 3 (fluorescência roxa obtida pela marcação do CyChrome) versus SSC (Figura 2b). A população positiva para FL3 é selecionada, e um novo gráfico é feito cruzando-se a fluorescência FL1 (fluorescência verde obtida pela marcação com FITC) com a fluorescência FL2 (fluorescência vermelha pela marcação com PE) (Figura 2c)



**Figura 2: Análise de leucócitos do baço por citometria de fluxo.**

A Figura 1a representa um perfil celular de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), onde foi selecionada a região R1 correspondente à população de linfócitos. A Figura 2b representa um perfil celular obtido em gráfico de FL3 (CD3-CyChrome) versus SSC, em que foi selecionado a população de células CD3 positivas (região R2), dentro da região R1. A Figura 2c representa um perfil celular obtido em gráfico de FL1 (CD4 FITC) versus FL2 (CD8 PE), selecionada a partir das regiões R1 e R3.

#### 4.17) PREPARAÇÕES DE CÉLULAS PARA CULTURA

##### A. Preparação das células do baço e linfonodo popliteo

As suspensões de células do baço e linfonodos foram preparadas de acordo com o método descrito por Taylor e colaboradores (1987). A suspensão de células foi ajustada para a concentração de  $1,0 \times 10^6$  células por mL, a qual foi estimulada com Concanavalina A por 24 horas e 72 horas ou não (controle- meio). Após estes períodos, o sobrenadante foi coletado para medir os níveis de citocinas através do método de Elisa e óxido nítrico (NO) pela reação de Griess.

#### B. Coleta de Macrófago peritoneal

Os animais receberam uma injeção de tioglicotato a 3% no peritônio 3 dias antes do sacrifício. No dia do sacrifício sob condições assépticas, 10 mL de meio RPMI 1640 incompleto estéril foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. O peritônio foi agitado para liberação das células, e o volume injetado foi coletado novamente e colocado em um tubo Falcon de 15 ml e mantido no gelo. Após a coleta de todas as células, os tubos foram centrifugados a 1200 rpm por 7 minutos em 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas em 1 ml de RPMI 1640 completo e contadas conforme o item 15.B.

Após ajuste das células na concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml, a suspensão celular foi plaqueada (100 µl/ poço) em triplicata em duas placas de 96 poços, mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 3 horas para facilitar a adesão de macrófagos nas placas. Após esse tempo, os sobrenadantes foram retirados e as placas cuidadosamente lavadas 3 vezes com 200 µl de meio incompleto por poço. Após lavagem, as células foram incubadas com 200 µl/poço de uma solução de meio RPMI completo contendo 20 ng/poço de LPS ou somente meio, mantidas em cultura na estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 72 horas. Após esse tempo, os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C para posterior medida de NO.

#### C. Medida da Produção de Citocinas por ELISA (Enzyme linked Immunoabsorbent Assay)

As placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal purificado contra IL-10 e IFN- $\gamma$  diluídos em tampão de cobertura, e mantidas por toda a noite a 4°C. No dia seguinte, os sobrenadantes e os padrões foram colocados nas placas, e estas mantidas na geladeira por mais uma noite. No terceiro dia, foram colocadas as soluções de tampão citrato contendo o anticorpo de detecção específico marcado com biotina para IL-10 e

IFN- $\gamma$  e, posteriormente, contendo estreptavidina-peroxidase. A placa foi revelada com água oxigenada e um cromógeno (OPD), a reação interrompida pela adição do ácido sulfúrico. Estas foram lidas em leitor automático para Elisa, usando o filtro 492 nm.

#### D. Dosagem de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes de cultura foi medida indiretamente pela produção de nitrito (NO<sup>2</sup>) pela reação de Griess. Em resumo, 50  $\mu$ l das amostras foram incubadas com 1% de dihidroclorato de N-naftil-etileno-diamina em 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura desta reação foi feita usando um leitor automático para Elisa com filtro de 540 nm.

#### **4.18) ANÁLISE DO ÍNDICE APOPTÓTICO**

Foi coletado o coxim plantar para detecção de apoptose, utilizando a coloração de Shorr. Esta coloração evidencia os núcleos celulares proporcionando a caracterização de células em apoptose. Os passos seguidos são semelhantes à coloração de HE, porém a eosina é substituída pelo corante tricômico de Shorr.

As imagens foram capturadas utilizando-se um sistema de vídeo câmera acoplado a um microscópio em um aumento de 100x. Posteriormente, a contagem das células apoptóticas/campo (sendo que o campo corresponde à  $2,61 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) foi realizada utilizando-se um analisador de imagens digital da Kontron Elektronik, programa KS 300; versão 2.0. Foram contados 10 campos por lâmina, sendo 5 lâminas por grupo. No final foi realizado a somatória dos campos.

#### **4.19) MENSURAÇÃO DA ÁREA DE NECROSE**

A imagem do tecido do coxim plantar, corado por HE, foi capturada em um aumento de 4x para mensurar as áreas de necrose presentes nos cortes avaliados. As imagens foram capturadas com ajuda de um sistema de microscópio acoplado a uma vídeo câmera acoplado a um microscópio. Utilizando o software KS 300 (ICB/UFMG), a área de necrose foi mensurada em micrometro/campo. No aumento de 4x o campo analisado foi de  $2610000 \mu\text{m}^2$ .

#### **4.20) ANÁLISE ESTATÍSTICA**



Para análise dos grupos experimentais foram utilizados os teste de ANOVA e o TESTE T DE STUDENT para comparações entre os grupos em estudo.

#### 4.21) SOLUÇÕES

##### 4.21.1- Soluções usadas na contagem de Hemácias e leucócitos

###### Contagem de Leucócito

Ácido acético 2%

1% de solução de azul de metileno a 1%

Água bidestilada q.s.p.

###### Contagem de Hemácias

Citrato de sódio 3,8%

2% Formol a 40%

Água bidestilada q.s.p.

##### 4.21.2 – soluções usadas na Citometria de Fluxo

###### PBS 1X pH 7,2

0,0015 M NaCl

0,137 M g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

0,0081 M KCl

0,0027M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

###### PBS-Azida

Tampão PBS pH 7,2

Azida sódica 0,01%

###### PSB-W

Tampão PBS pH 7,2

BSA (Albumina sérica bovina) 5%

###### Mac Facs Fix – Fixador

Nacl 0,15M

Cacodilato de sódio 1,2%

Paraformaldeído 1%

##### 4.21.3 Soluções usadas na cultura de células

###### Meio RPMI 1640 – GIBCO pH 7,0

###### RPMI completo

10% Soro fetal Bovino

1% solução de piruvato

1% L-glutamina  
1% solução de aminoácidos não essenciais  
0,1% 2-mercaptoetanol  
mg de fungizone  
mg gentamicina

#### 4.21.4 - Soluções usadas na dosagem de NO

dihidrocloreto de N-naftil-etileno-diamina em 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

#### 18.5- Soluções usadas na Elisa

##### PBS-Caseína

Tampão fosfato pH 7,2  
Caseína 0,25%

##### Salina Tween

Salina fisiológica 0,85%  
Tween 20 0,05%

##### Tampão Citrato pH 5,0

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M  
Ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) 0,1 M

##### Solução de ácido sulfúrico 2N

#### 4.21.6- Soluções usadas na histologia

##### Formol tamponado 10%

Tampão Fosfato pH 7,2  
Formol 10%

Álcool etílico a 70, 80 e 90%.

Xilol a 70, 80 e 90%.

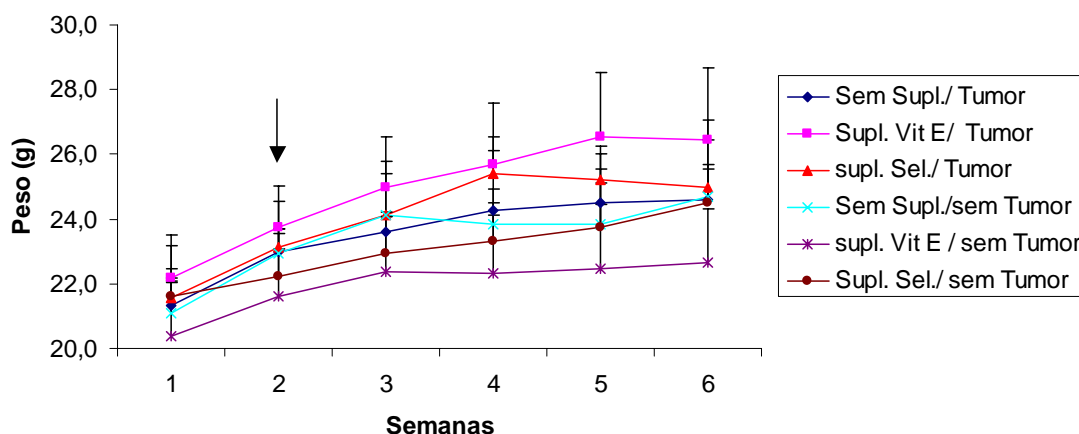
## 5. RESULTADOS

### 5.1) Avaliação do peso corpóreo de animais inoculados ou não com Tumor de Ehrlich e suplementados ou não com selênio ou vitamina E

Resolvemos avaliar o estado nutricional dos animais, frente à inoculação do tumor e ao tratamento dietético, pois se sabe que o tumor leva a um quadro de caquexia, podendo ser verificado através da perda de peso. Nesta avaliação analisamos o peso corpóreo, dosagem sérica de albumina, proteínas totais e glicose dos animais, como também número total e diferencial de leucócitos.

Para avaliação do peso corpóreo, os camundongos foram pesados semanalmente a partir do dia zero (correspondente à introdução da dieta) até o dia do sacrifício.

#### Avaliação do peso corpóreo



**Figura 3: Avaliação do peso corpóreo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados com selênio ou vitamina E** Camundongos BALB/c foram tratados com uma dieta balanceada ou com a mesma dieta suplementada com selênio ou vitamina E durante 6 semanas consecutivas. Durante esse tempo o ganho de peso foi avaliado através de pesagens semanais dos animais. Os grupos controles representam os animais que não foram inoculados com tumor de Ehrlich e apenas tratados com as dietas em estudo. A seta representa o dia da inoculação de células tumorais. Cada ponto representa a média do peso de 5 camundongos.

De acordo com a Figura 3, não foram encontradas diferenças estatísticas no peso corpóreo dos animais inoculados com tumor quando comparados com os animais controles. Em relação à inoculação tumoral, também não foi verificada nenhuma diferença no peso corpóreo destes animais quando suplementados ou não com vitamina E ou selênio

## **5.2) Efeito da suplementação dietética com vitamina E ou selênio no crescimento do tumor de Ehrlich na forma sólida**

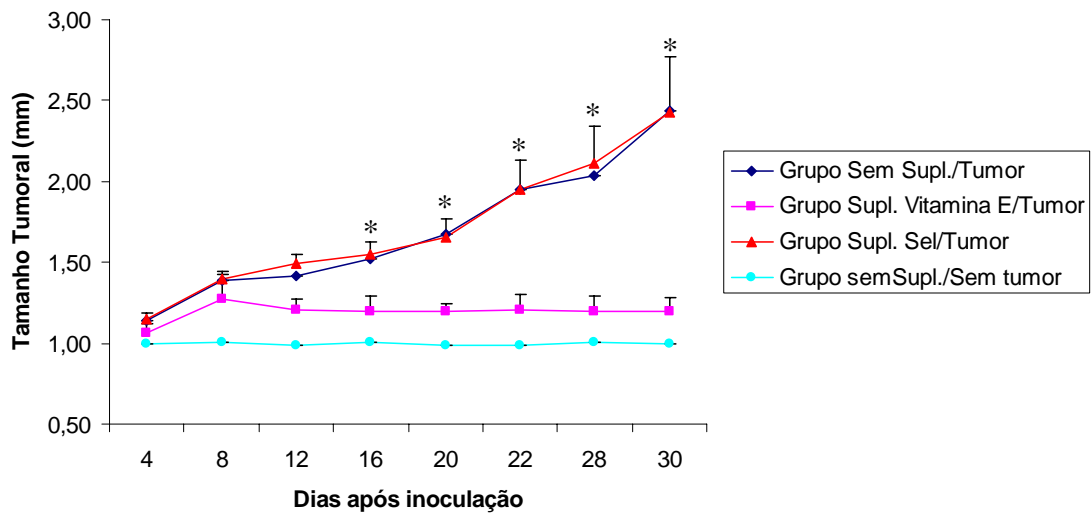
Para avaliarmos o efeito da suplementação com vitamina E ou selênio no crescimento tumoral, as patas inoculadas com tumor foram mensuradas duas vezes na semana com a ajuda de um micrômetro. A mensuração foi realizada 3 vezes em cada pata, o resultado expresso reflete a média das medidas. Foram mensuradas as patas inoculadas e não inoculadas com tumor de Ehrlich para obtenção apenas do crescimento do tumor, descartando assim a espessura da pata. Após quatro semanas, os animais foram sacrificados.

Estes animais receberam uma dieta balanceada conforme descrito por Reeves, 1997. Esta dieta foi suplementada com 1000 mg de vitamina E/ kg de dieta, que equivaleu a uma ingestão diária de 5 mg de vitamina E por camundongo. Essa foi administrada 2 semanas antes da inoculação tumoral, e o tratamento permaneceu até o sacrifício dos animais.

A espessura da pata controle é de um animal normal sem suplementação e sem inoculação tumoral.

O efeito do selênio sobre o crescimento tumoral também foi avaliado de forma semelhante à avaliação da suplementação com vitamina E. Porém a quantidade suplementada de selênio foi 5 ppm por kg de dieta, dando um total de ingestão/dia de 25 µg/dia para cada camundongo.

### Avaliação do crescimento do tumor de Ehrlich



**Figura 4: Avaliação do crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c suplementados ou não com vitamina E ou selênio.** Após duas semanas de tratamento dietético os animais foram inoculados  $5 \times 10^6$  células/mL (0,05 mL), no coxim plantar, via subcutânea, permanecendo 4 semanas em tratamento com dieta suplementada com vitamina E ou selênio ou dieta não suplementada. Foram mensuradas as patas inoculadas e não inoculadas com tumor de Ehrlich para obtenção do tamanho real do crescimento tumoral. Cada ponto representa a média da espessura das patas de 5 camundongos de cada grupo. \* representa a significância ( $p < 0,05$ ) em relação entre os grupos sem suplementação e suplementado com selênio com o grupo suplementado com vitamina E.

Podemos observar na Figura 4, que os animais suplementados com vitamina E tiveram uma inibição no crescimento tumoral quando comparado com os animais não suplementados. Contrário aos resultados obtidos com suplementação com vitamina E, o tratamento com selênio não foi capaz de inibir o crescimento do tumor.

**5.3) Medida sérica dos níveis de albumina, glicose e proteínas totais dos animais inoculados ou não com Tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de selênio ou vitamina E.**

Como mencionado no itens 4.13 e 4.14 analisamos também o estado nutricional dos animais quanto aos níveis séricos de albumina, proteínas totais e glicose e contagem de hemácias. Todos esses parâmetros poderiam estar alterados em caso de caquexia (GORDON et al., 2005).

<b>Grupos/Dosagens</b>	<b>Albumina (mg/dL)</b>	<b>Glicose (mg/dL)</b>	<b>Proteínas Totais (mg/dL)</b>
<b>Sem supl./ Sem tumor</b>	3,3 ± 0,21	100,8 ± 32,0	5,4 ± 0,4
<b>Supl. Vitamina E/ Sem Tumor</b>	3,7 ± 0,33	110,5 ± 27,7	5,2 ± 0,4
<b>Supl. selênio/ Sem tumor</b>	2,2 ± 0,1	80,9 ± 7,1	4,9 ± 0,35
<b>Sem suplementação/Tumor</b>	3,3 ± 0,15	82,7 ± 5,5	5,8 ± 1,1
<b>Supl. Vitamina E/Tumor</b>	3,3 ± 0,36	90,0 ± 10,3	5,3 ± 0,7
<b>Supl. selênio/Tumor</b>	3,3 ± 0,16	80,0 ± 6,6	4,8 ± 0,83

**Tabela 1: Mensuração dos níveis de albumina, glicose e proteínas totais no soro de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com selênio ou vitamina E.** Quatro semanas após inoculação do tumor, os animais foram sacrificados e o soro obtido por sangria axilar. Cada linha representa a média dos níveis de albumina, glicose e proteínas totais ± desvio padrão médio de 5 camundongos dos diferentes grupos experimentais.

Ao analisarmos a Tabela 1, podemos observar que não houve diferença entre os grupos nos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos avaliados, quando comparados aos níveis dos animais controles (sem tumor).

**5.4) Avaliação do número de hemácias no sangue total de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio.**

<b>Grupos/Dosagens</b>	<b>Número de hemácias x 1000/mm<sup>3</sup></b>
<b>Sem supl./ Sem tumor</b>	7685 ± 850,9
<b>Supl. Vitamina E/ Sem Tumor</b>	8500 ± 962,90
<b>Supl. selênio/ Sem tumor</b>	8160 ± 1229,7
<b>Sem suplementação/Tumor</b>	7212 ± 403,4
<b>Supl. Vitamina E/Tumor</b>	8939 ± 1429,3
<b>Supl. selênio/Tumor</b>	7492,2 ± 327,7

**Tabela 2: Contagem do número de hemácias do sangue total de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E e selênio.** Os animais foram sangrados no dia do sacrifício via sangria axilar e o sangue coletado em EDTA. As linhas representam a média do número de hemácias x 1000/mm<sup>3</sup> de 5 camundongos dos grupos experimentais. O asterisco representa diferença significativa dos grupos em relação aos seus controles.

Da mesma forma que a avaliação do peso corpóreo e as medidas séricas de albumina, glicose e proteínas totais, a Tabela 2 mostra que não houve diferença quanto à contagem de hemácias nos animais estudados.

**5.5) Avaliação do número de leucócitos no sangue total de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio.**

Grupos	Leucócitos Totais (mm <sup>3</sup> )	Leucócitos Diferenciais (mm <sup>3</sup> )		
		Neutrófilo	Mononuclear	Eosinófilo
<b>Sem supl./Sem tumor</b>	4712,0 ± 1300,0	1050,0 ± 807,0 (13,5%)	4645,0 ± 1226,0 (85,8%)	54,0 ± 63,0 (0,7%)
<b>Supl. Vitamina E/Sem tumor</b>	5650,0 ± 1285,0	487,0 ± 182,0 (10,2%)	5084,0 ± 1286,0 (88,8%)	79,4 ± 38,0 (1,0%)
<b>Supl. Selênio/Sem tumor</b>	5120,0 ± 735,0	662,0 ± 140,0 (13,2%)	4368,1 ± 582,0 (85,2%)	90,1 ± 51,5 (1,6%)
<b>Sem supl./Tumor.</b>	3810,0 ± 373,0	1155,0 ± 421,0 (28%)	2582,0 ± 280,0* (70%)	74,0 ± 16,6 (2%)
<b>Supl. Vitamina E/Tumor</b>	4180,0 ± 961,0	637,0 ± 158,0 (16,2%)	3512,0 ± 823,0 (83,2%)	31,1 ± 7,1 (0,6%)
<b>Supl. Selênio/Tumor</b>	3640,0 ± 444,6	827,0 ± 242,0 (23,0%)	2792,0 ± 526,0* (76,04%)	21,4 ± 14,0 (0,6%)

**Tabela 3: Contagem do número total e diferencial de leucócitos periféricos do sangue de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E e selênio.** Os animais foram sangrados no dia do sacrifício via sangria axilar e o sangue coletado em EDTA. As linhas representam a média do número de leucócitos/mm<sup>3</sup> de 5 camundongos dos grupos experimentais. O asterisco representa diferença significativa dos grupos em relação aos seus controles (p<0,05).

O desenvolvimento do tumor provoca uma inflamação, levando a um grande influxo de células para o local do tumor na tentativa de resolver o processo. Por isso resolvemos avaliar se a contagem total e diferencial de leucócitos destes animais estavam alterados. Além disso, o número global de leucócitos pode ser relacionado ao estado nutricional do hospedeiro com tumor.

Ao observarmos a Tabela 3, verificamos que os animais inoculados com tumor e não suplementados apresentaram uma redução no número de células mononuclear quando comparado ao seu grupo controle sem inoculação tumoral. O mesmo foi verificado com os animais do grupo inoculado e suplementados com selênio quando comparados ao seu grupo controle. Por outro lado, os animais suplementados com



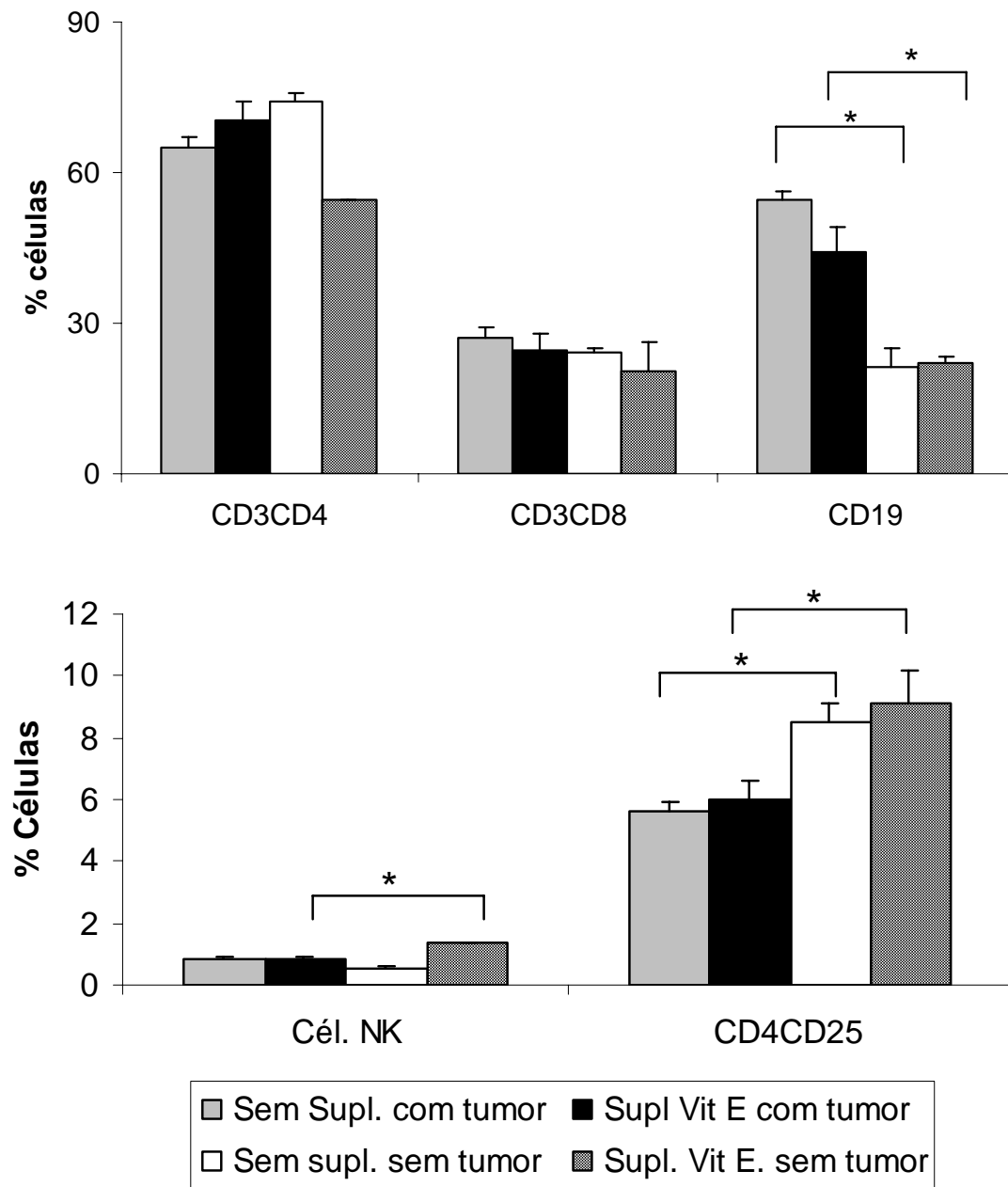
vitamina E e inoculados com tumor não apresentaram redução ou diferença na contagem de leucócitos quando comparado ao seu grupo controle.

#### **5.6) Análise fenotípica de células do sistema imune do linfonodo poplíteo de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com vitamina E ou selênio.**

Embora o tumor e/ou tratamento com suplementação não tenham alterado o número total de células circulantes, o tratamento ou até mesmo o crescimento tumoral poderia alterar a população de células em órgãos como baço e linfonodo poplíteo. Então resolvemos analisar o perfil de células linfóides nesses órgãos através da técnica de citometria de fluxo.

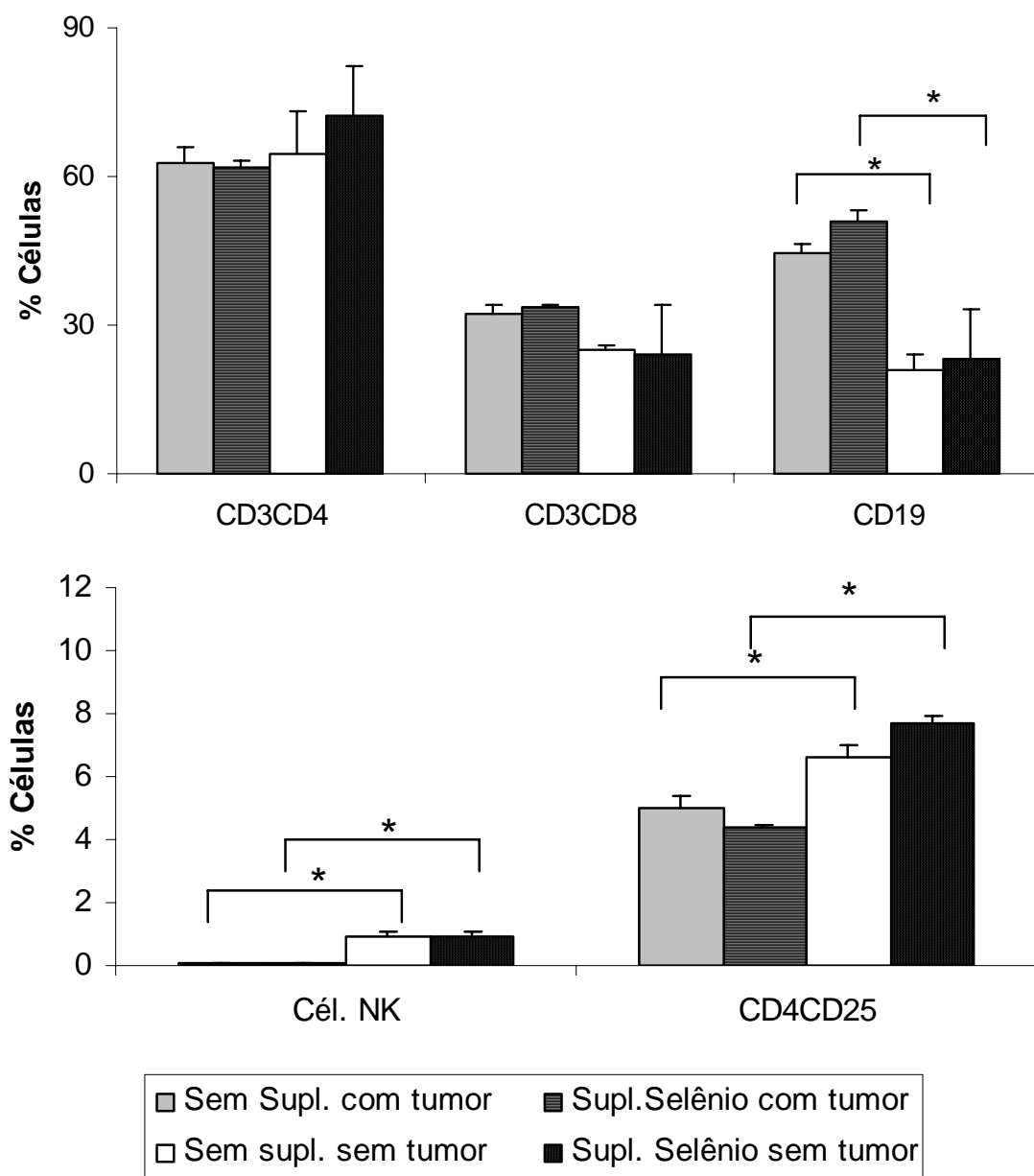
Foi realizada análise fenotípica de células do linfonodo poplíteo e baço dos animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados com vitamina E ou selênio. Para isso, os órgãos foram separados, e as células coletadas, incubadas e marcadas com anticorpos específicos conjugados a um fluorescente, para o tipo de molécula de superfície desejada para análise, no nosso caso utilizamos os anticorpos descritos no **item 4.15D**.

### Linfonodo poplíteo



**Figura 5: Característica fenotípica de linfócitos presentes no linfonodo poplíteo de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com vitamina E.** Os resultados representam a média do valor percentual da população de linfócitos de camundongos inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente

### Linfonodo poplíteo



**Figura 6: Característica fenotípica de linfócitos presentes no linfonodo poplíteo de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com selênio.** Os resultados representam a média do valor percentual da população de linfócitos de camundongos inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com selênio. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre o grupo inoculado com tumor e não inoculado ( $n=5$ ).

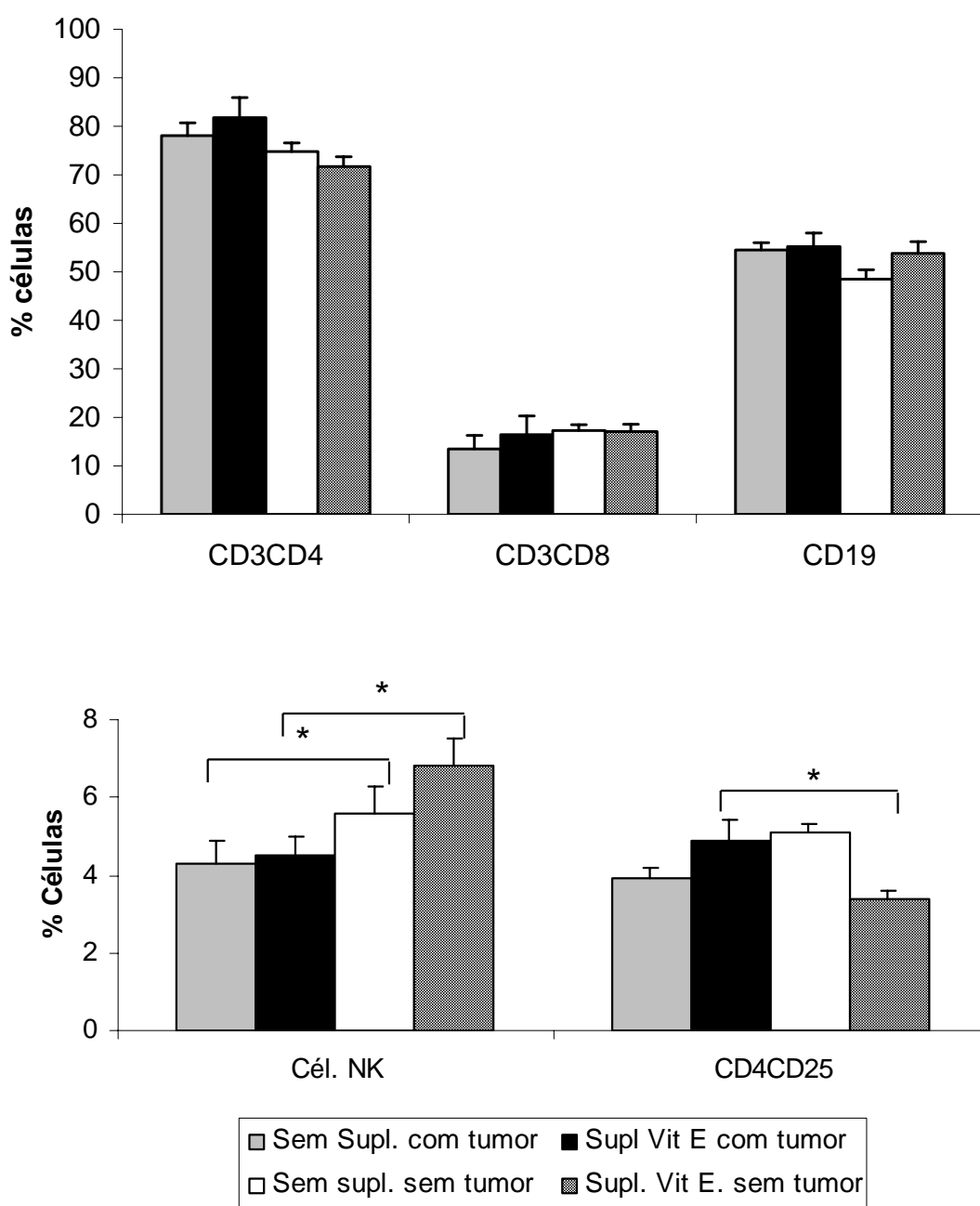
Ao analisarmos a população linfóide do linfonodo poplíteo, podemos observar que a inoculação do tumor de Ehrlich levou a um aumento no percentual de linfócitos B e uma redução na população de células  $CD4^+CD25^+$  quando comparados aos animais sem inoculação, independente do nutriente suplementado.

Quanto à análise fenotípica das células NK, verificamos um aumento significativo no percentual destas células somente nos animais sem inoculação de células tumorais e suplementados com vitamina E, quando comparado aos animais inoculados com tumor e suplementados ou não e ao animal sem suplementação e sem tumor. Os animais sem tumor suplementados ou não com selênio também apresentaram um maior percentual de células NK, ao compará-los com os animais inoculados com tumor.

#### **5.7) Análise fenotípica de células do sistema imune do baço e de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com vitamina E ou selênio.**

Analisando as Figuras 7 e 8, verificamos o efeito da suplementação da vitamina E sobre as características fenotípicas das células presentes no baço, podemos observar que a suplementação de vitamina E levou ao aumento significativo no percentual de células NK e uma redução significativa na percentagem de células CD4CD25 neste órgão, o que foi visto somente nos animais não inoculados com tumor de Ehrlich. Nenhuma outra diferença significativa no percentual das outras populações de células entre os grupos analisados foi verificada.

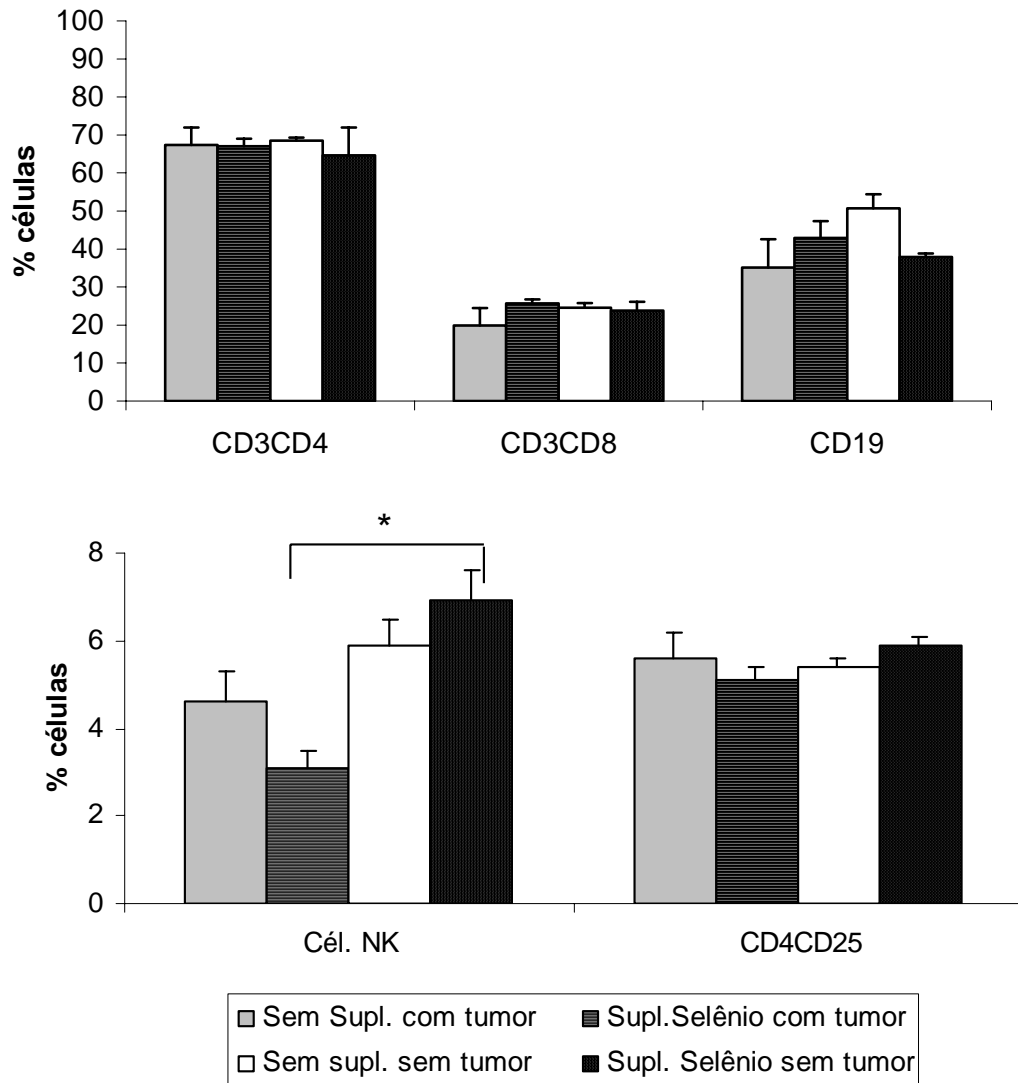
## Baço



**Figura 7: Característica fenotípica de linfócitos presentes no baço de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com vitamina E.** Os resultados representam a média do valor percentual da população de linfócitos de camundongos inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre o grupo inoculado com tumor e não inoculado ( $n=5$ ).

Analisando o efeito da suplementação com selênio na população de células do baço (Figura 8) podemos observar que o selênio proporcionou um aumento no percentual de células NK assim como a suplementação com vitamina E. Contudo, nenhuma outra alteração foi encontrada nas demais populações analisadas.

## Baço



**Figura 8: Característica fenotípica de linfócitos presentes no baço de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com selênio.** Os resultados representam a média do valor percentual da população de linfócitos de camundongos inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com selênio. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre o grupo inoculado com tumor e não inoculado ( $n=5$ ).

### **5.8) Análise da Intensidade de Fluorescência de células linfóides presentes no baço e linfonodos poplíteos de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e tratados com vitamina E ou selênio.**

Além de ser observado um aumento no percentual de células NK, resolvemos, também, analisar a atividade dessas células, através da citometria de fluxo utilizando o canal médio de fluorescência para o marcador CD69 (marcador de ativação).

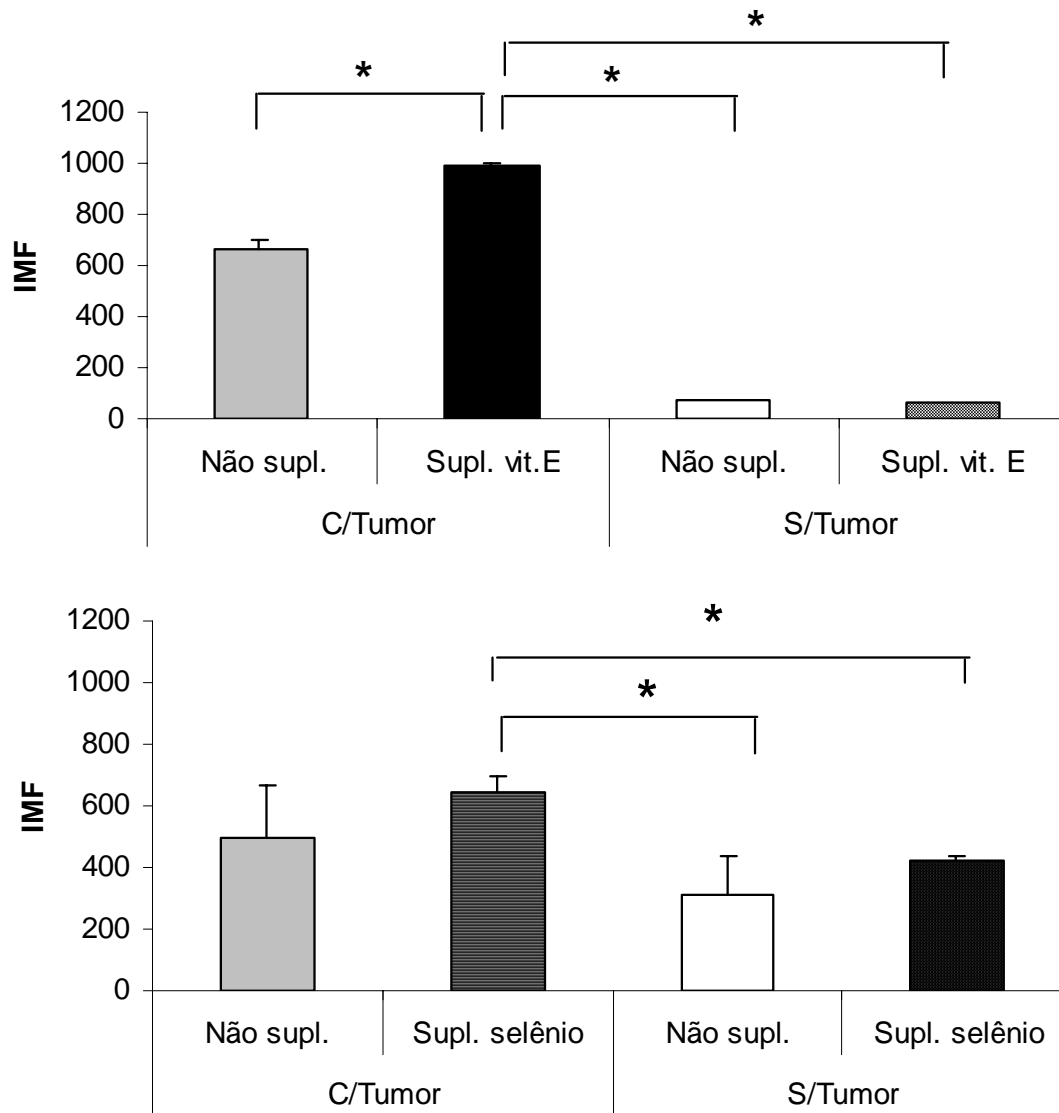
A molécula CD69 é o produto de um gene expresso pelas células T, após estimulação antigênica, que atua como molécula co-estimuladora para ativação e proliferação de células T. Sua expressão pode ser induzida também em células B, células NK e neutrófilos (ZIEGLER, S.F. et al, 1994; ZIEGLER, S.F. et al, 1999).

Para confirmar nossa hipótese de que a redução do tumor pode está relacionada com uma maior ativação de células do sistema imune dos animais suplementados com vitamina E, resolvemos, avaliar a atividade de algumas células, que fazem parte da resposta efetora contra tumores e que possam induzir mecanismo de morte via apoptose ou necrose, como as células NK e linfócitos TCD8<sup>+</sup>.

De acordo com a Figura 9a podemos verificar uma maior intensidade média de fluorescência na expressão da molécula CD69 na população de células NK do linfonodo poplíteo de animais inoculados com tumor e suplementados com vitamina E ou selênio, quando comparados aos animais inoculados com tumor sem suplementação. Ao analisarmos a Figura 9b, verificamos, que a suplementação com selênio conseguiu aumentar a expressão de CD69 pelas células NK, apenas nos animais sem tumor. Não apresentando nenhum efeito em animais com tumor.

A Análise da intensidade média de fluorescência da molécula CD69 na população de linfócitos TCD8<sup>+</sup> (Figura 9c e 9d), mostra uma tendência à maior ativação do linfócito TCD8<sup>+</sup> do linfonodo poplíteo de animais inoculados com tumor e suplementados com vitamina E (p<0,06). Nos animais sem tumor e suplementados com selênio podemos observar uma maior expressão de CD69 pelos linfócitos TCD8<sup>+</sup> neste mesmo órgão ao compara-la aos grupos inoculados com tumor. Por outro lado, essas mesmas células no baço não apresentaram nenhuma alteração quanto à expressão de CD69, independente da suplementação utilizada (Figuras 9c e 9d).

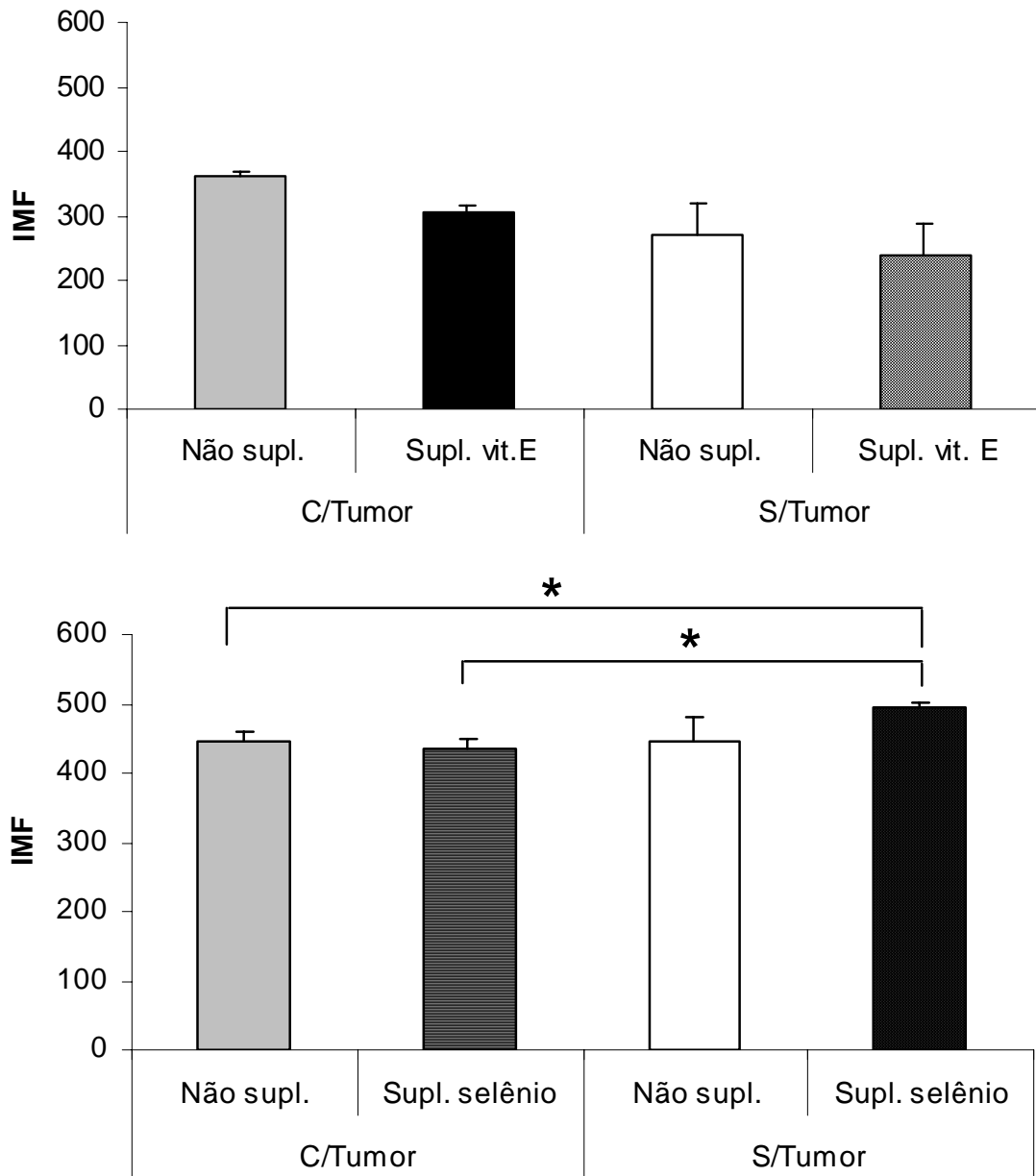
### CD 69 expressa por células NK presentes no linfonodo poplíteo



**Figura 9a: Intensidade média de fluorescência da molécula CD69 presente em células NK do linfonodo poplíteo de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com vitamina E ou selênio.** Os resultados representam a média da intensidade de fluorescência do marcador CD69 presente nas células NK de camundongos inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos inoculados com tumor e suplementados ou não com vitamina E ou selênio ( $n=5$ ).

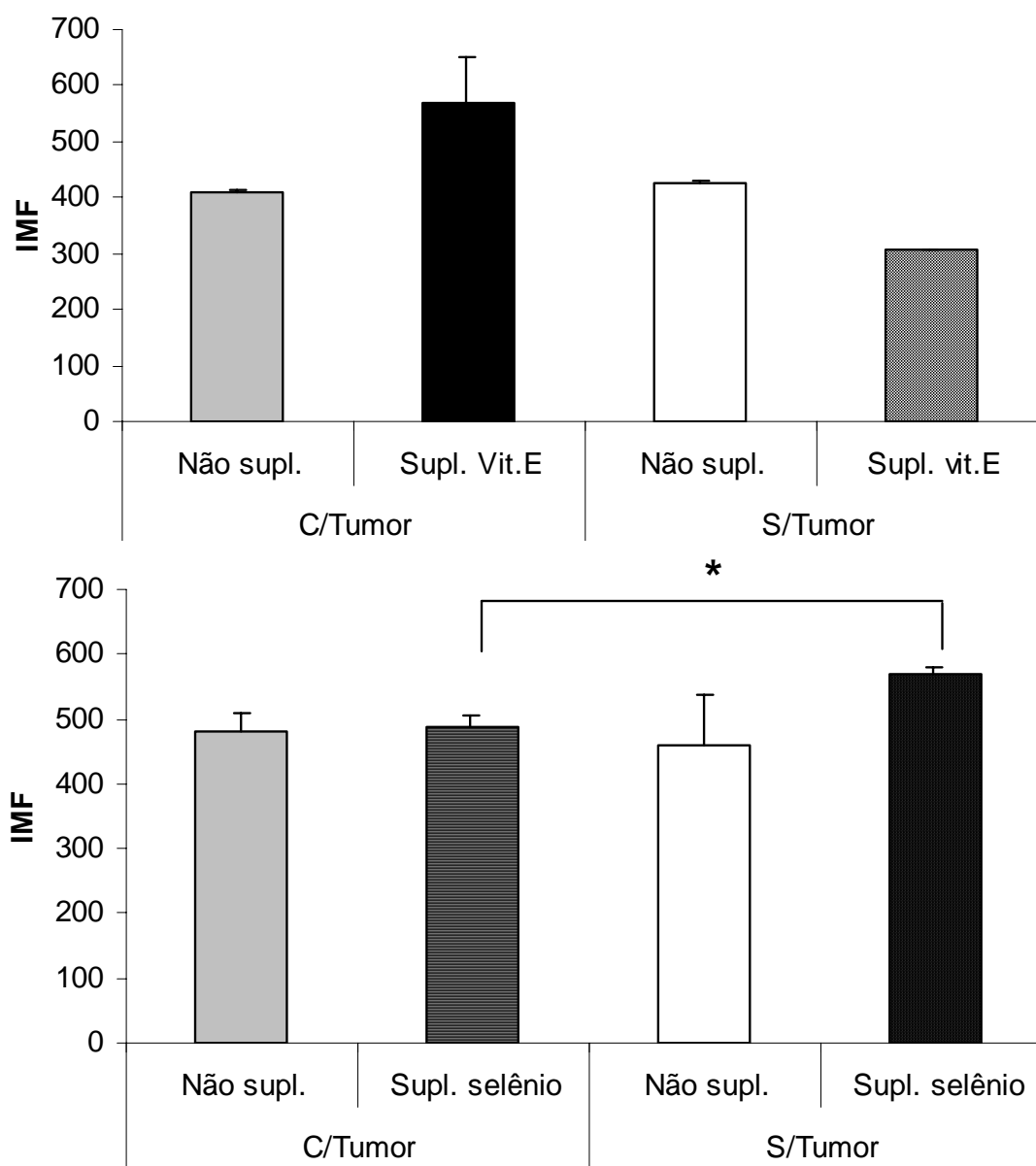


### CD 69 expressa por células NK presentes no baço



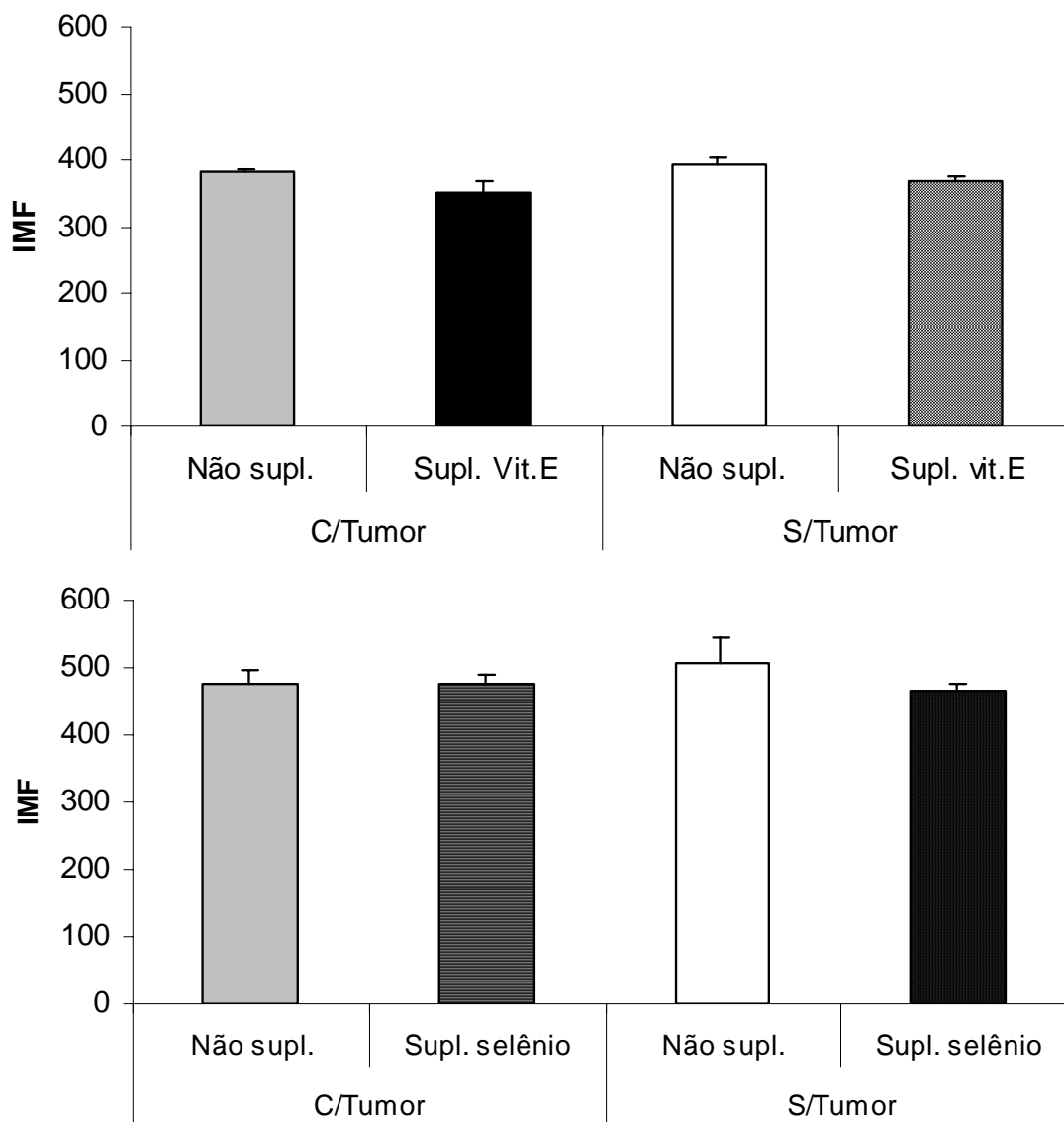
**Figura 9b:** Intensidade média de fluorescência da molécula CD69 presente em células NK do baço de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com vitamina E ou selênio. Os resultados representam a média da intensidade de fluorescência do marcador CD69 presente células NK de camundongos inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio (n=5).

### CD 69 expressa por linfócitos TCD8<sup>+</sup> presentes no linfonodo poplíteo



**Figura 9c: Intensidade média de fluorescência da molécula CD69 em linfócitos TCD8<sup>+</sup> presentes no linfonodo poplíteo de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com selênio.** Os resultados representam a média da intensidade de fluorescência do marcador CD69 presente em linfócitos TCD8<sup>+</sup> de camundongos inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio (n=5). O asterisco indica diferença estatística entre o grupo não inoculado e inoculado com tumor e suplementados com selênio.

### CD 69 expressa por linfócitos TCD8<sup>+</sup> presentes no linfonodo poplíteo



**Figura 9d: Intensidade média de fluorescência da molécula CD69 de linfócitos TCD8 presentes no baço de animais inoculados com Tumor de Ehrlich e suplementados com vitamina E ou selênio.** Os resultados representam a média da intensidade de fluorescência do marcador CD69 presente no linfócito T CD8 de camundongos inoculados ou não com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com selênio (n=5).

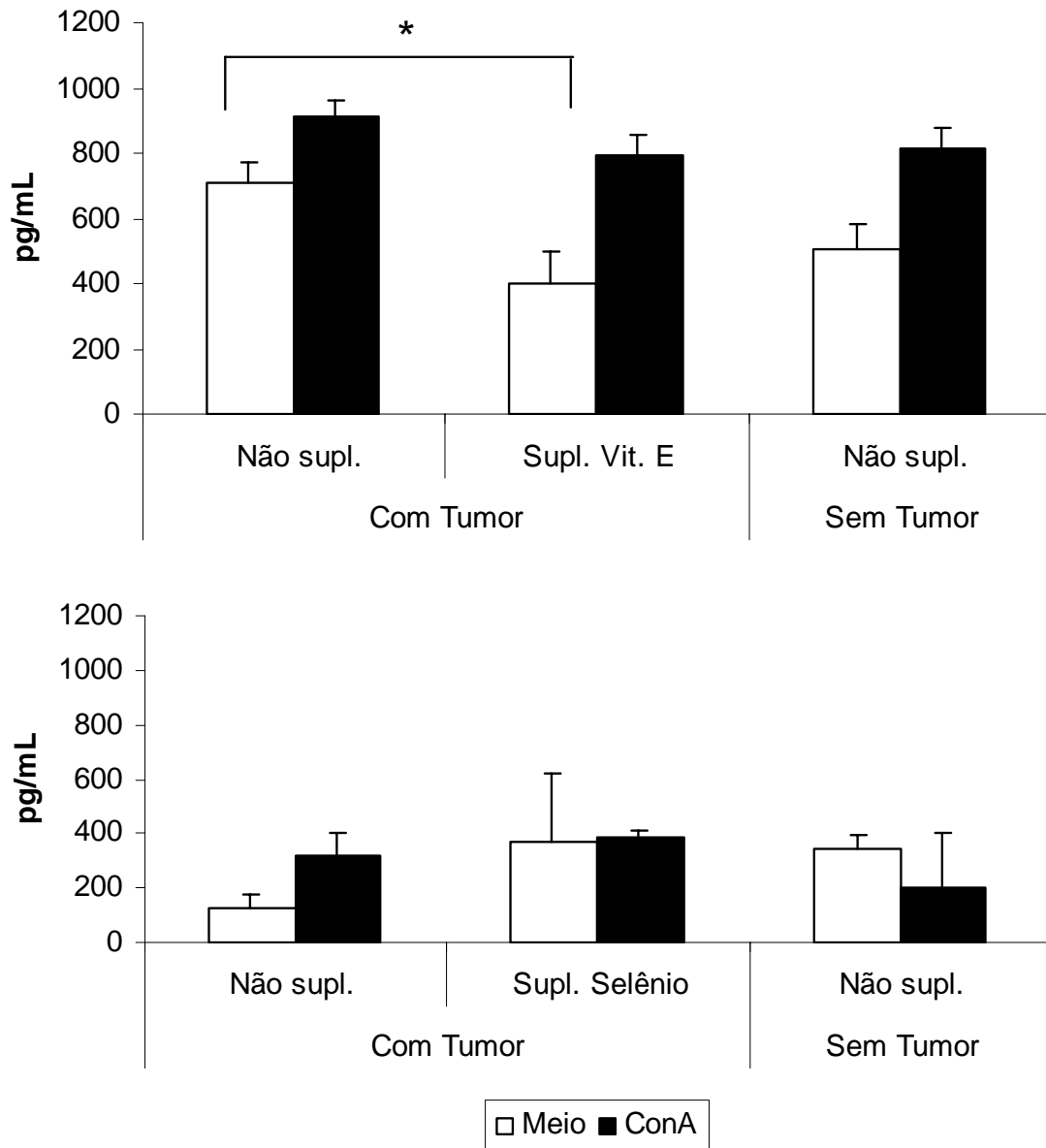
### **5.9) Produção de citocinas IL-10 por células linfóides do linfonodo poplíteo e do baço de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E ou selênio**

A resposta imunológica depende não somente da interação entre as células como também de substâncias que contribuem com essa interação, que interferem na ativação e diferenciação das células. Essas substâncias são as citocinas, que podem ser produzidas por várias células inclusive as células tumorais (ABBAS et al., 2005).

Considerando a importância das citocinas na resposta ao tumor, e tendo conhecimento que os antioxidantes podem influenciar no perfil dessas substâncias, resolvemos avaliar os níveis de citocinas produzidas pelas células desses animais com e sem tumor e suplementados com vitamina E e selênio.

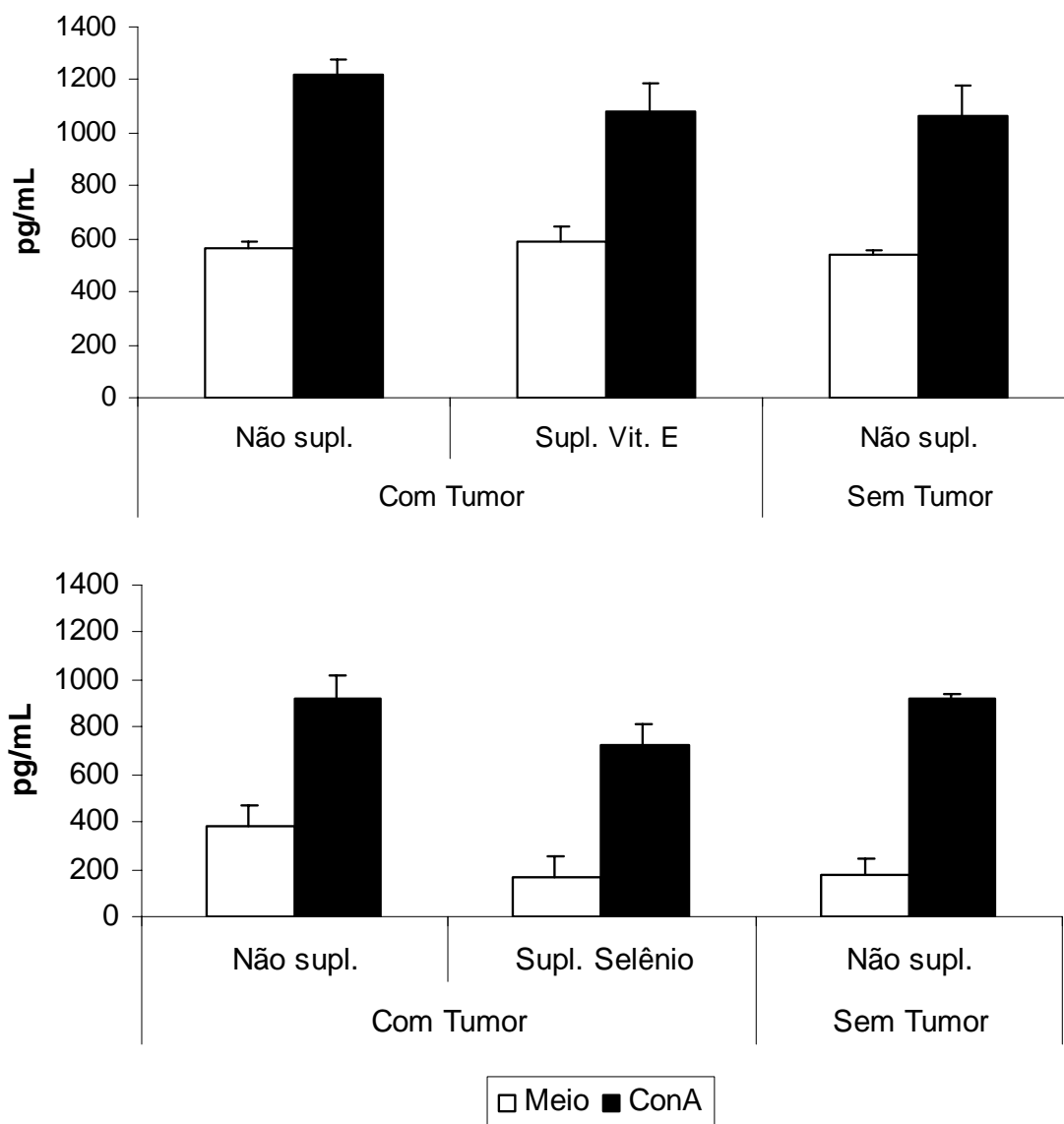
Para tanto, seguimos o protocolo de preparação das células para cultura e medida de citocinas descrito nos itens **4.17A** e **4.17C**.

### Produção de IL-10 de células do linfonodo poplíteo



**Figura 10: Produção de IL-10 por células do linfonodo poplíteo dosada no sobrenadante de cultura de células presentes neste órgão.** Células do linfonodo poplíteo de animais BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo ConA (Concanavalina A) como estímulo, o sobrenadante coletado após 72 horas de cultivo e testados por ELISA para detecção de IL-10. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida para IL-10 recombinante. As barras representam a média das concentrações obtida em cada grupo (n=5). O asterisco indica diferença estatística entre os grupos inoculados com tumor de Ehrlich e não suplementado ou suplementado com vitamina E.

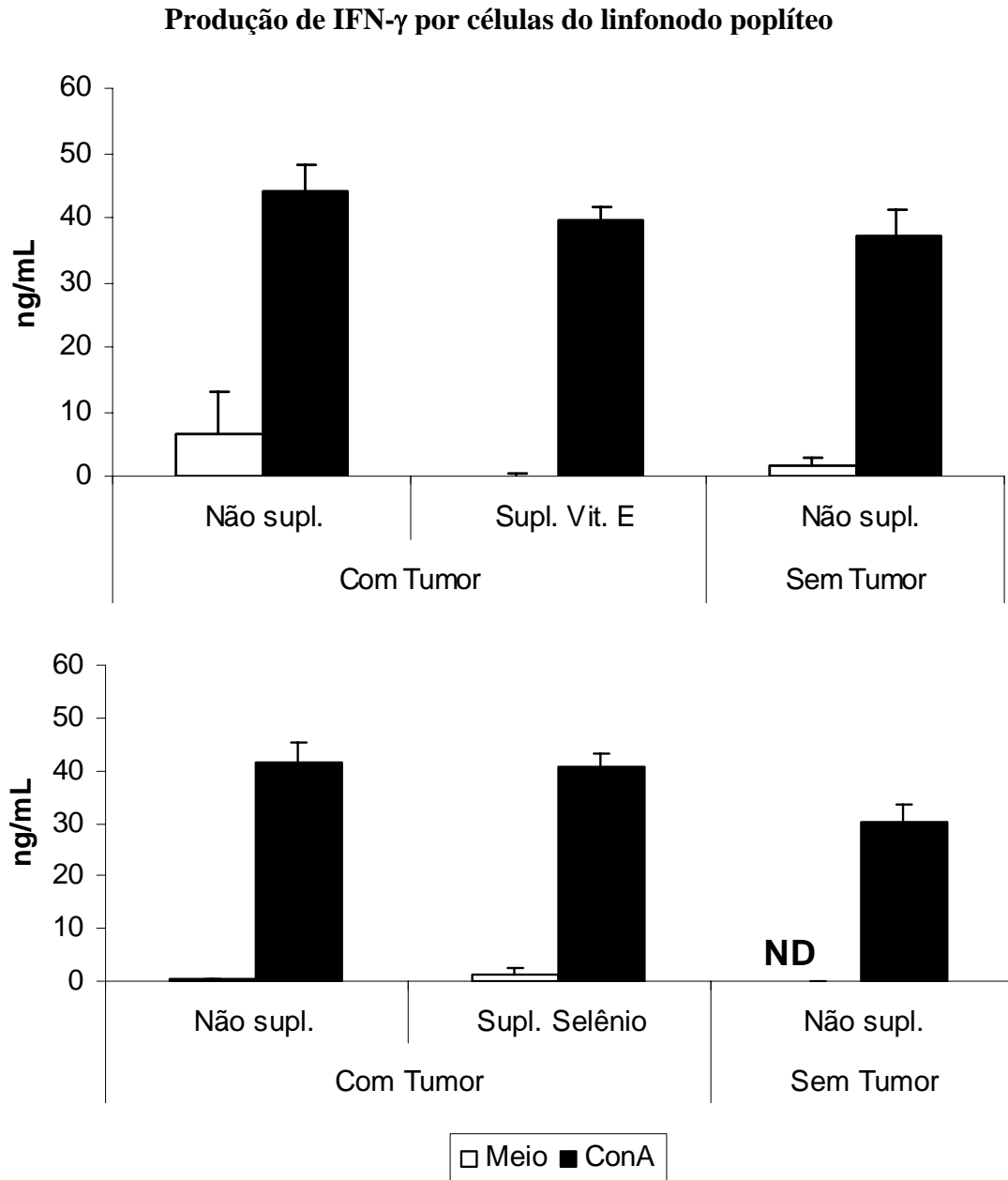
### Produção de IL-10 por células do baço



**Figura 11: Produção de IL-10 por células do baço dosada no sobrenadante de cultura de esplenócitos.** Células do baço de animais BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo ConA (Concanavalina A) como estímulo, o sobrenadante coletado após 72 horas de cultivo e testados por ELISA para detecção de IL-10. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida para IL-10 recombinante. As barras representam a média das concentrações obtida em cada grupo (n=5).

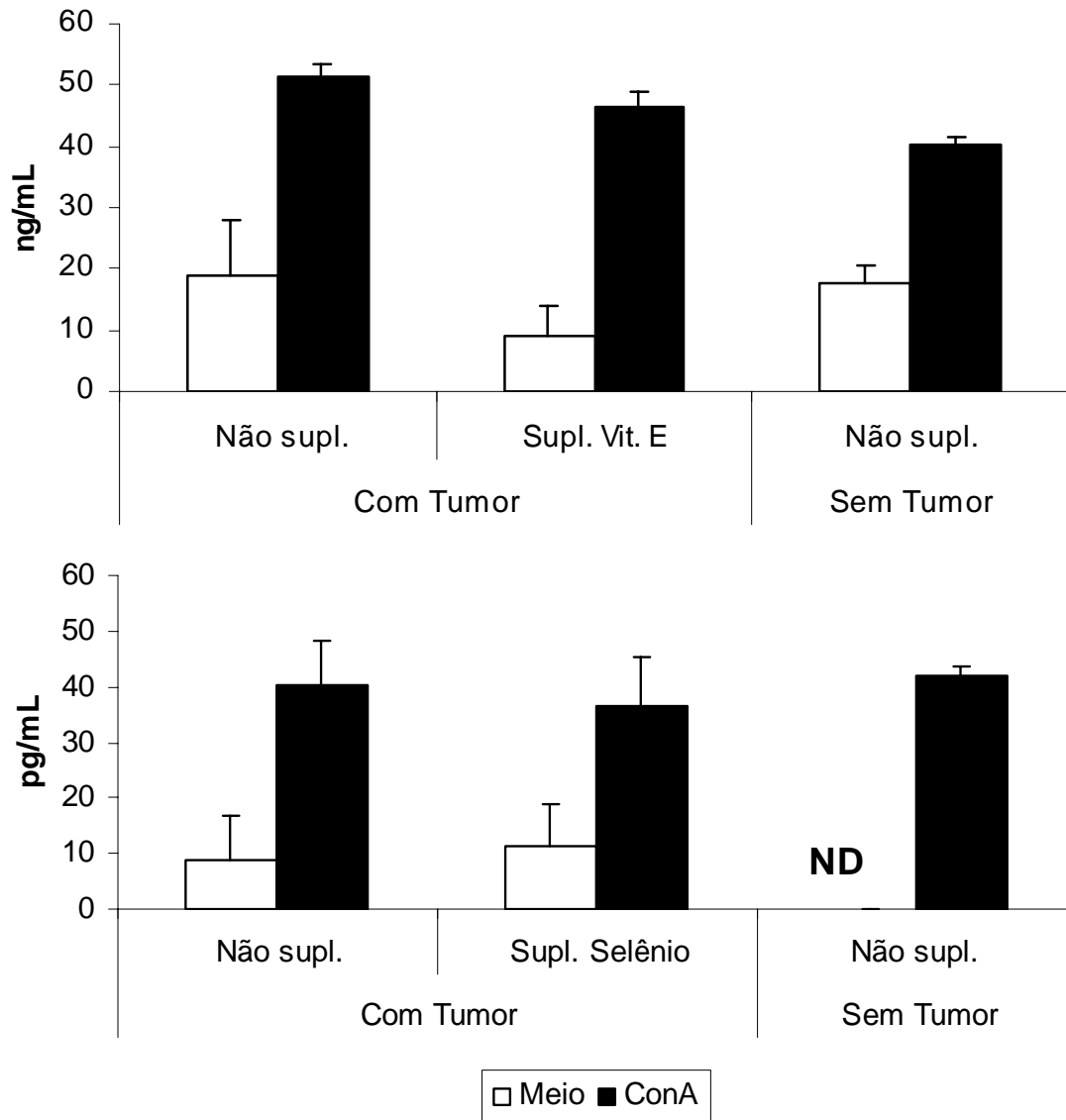
Ao analisarmos as medidas de IL-10 nas células do baço não encontramos diferença entre os grupos, contudo nas células do linfonodo poplíteo observamos diferença estatística apenas entre o grupo suplementado e não suplementado com vitamina E e inoculado com tumor, nas células sem estímulo. Os demais resultados não apresentaram diferença estatística significativa.

**5.10) Produção de citocinas IFN- $\gamma$  por células linfóides do baço e linfonodo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E ou selênio**



**Figura 12: Produção de IFN- $\gamma$  por células do linfonodo poplíteo dosada no sobrenadante de cultura de células deste órgão.** Células do linfonodo poplíteo de animais BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo ConA (Concanavalina A) como estímulo, o sobrenadante coletado após 72 horas de cultivo e testados por ELISA para detecção de IFN- $\gamma$ . As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade óptica obtida para IFN- $\gamma$  recombinante. As barras representam a média das concentrações obtida em cada grupo (n=5).

### Produção de IFN- $\gamma$ por células do baço



**Figura 13: Produção de IFN- $\gamma$  por células do baço dosada no sobrenadante de cultura de esplenócitos.** Células do baço de animais BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo ConA (Concanavalina A) como estímulo, o sobrenadante coletado após 72 horas de cultivo e testados por ELISA para detecção de IFN- $\gamma$ . As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida para IFN- $\gamma$  recombinante. As barras representam a média das concentrações obtida em cada grupo (n=5).

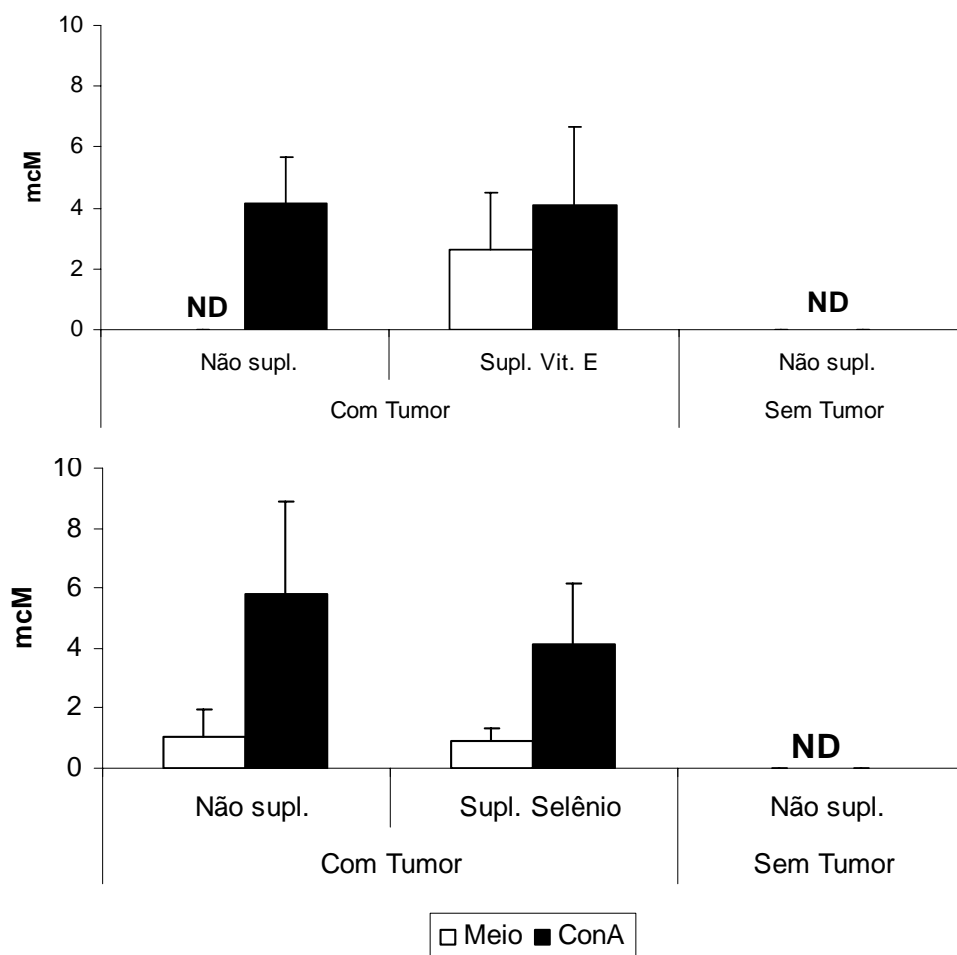
A análise da medida de IFN- $\gamma$  nas células linfóides do baço ou linfonodo poplíteo não mostrou nenhuma diferença estatística entre os grupos estudados.



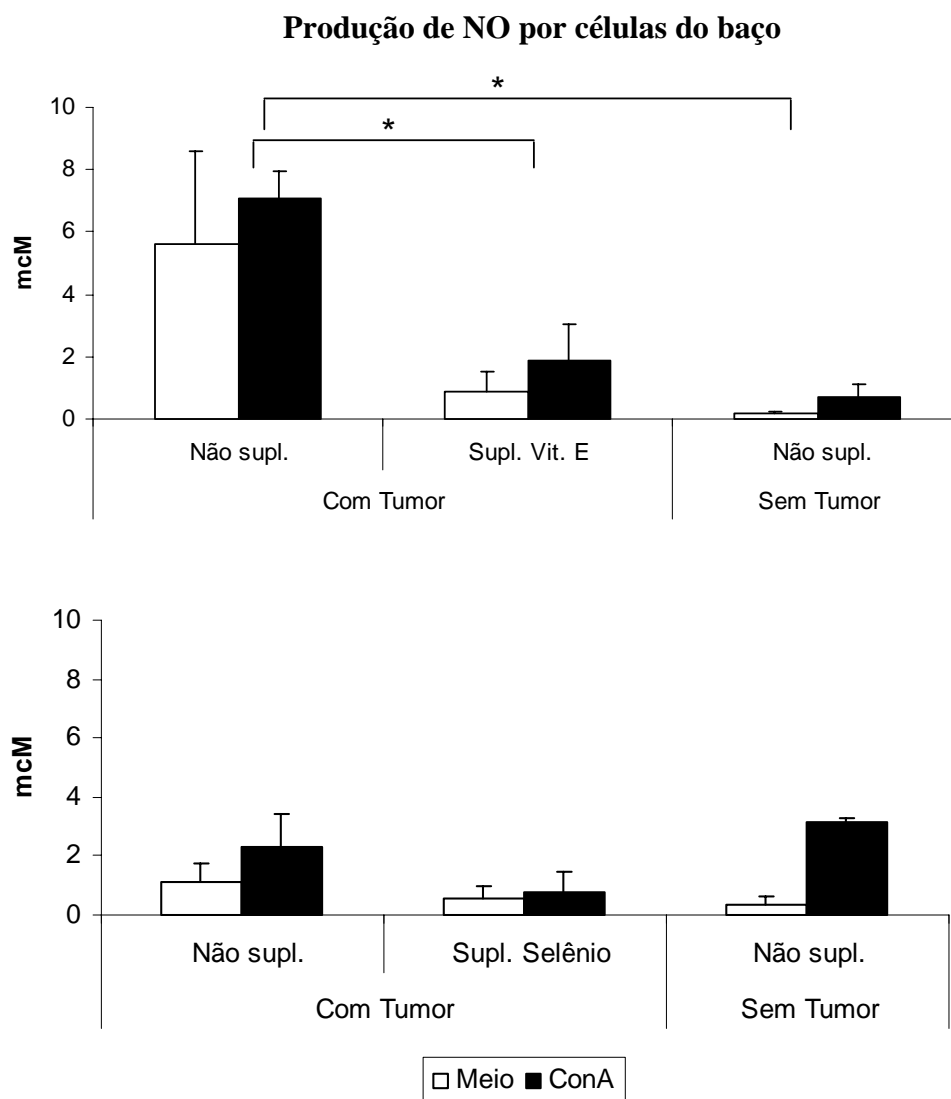
### 5.11) Produção de óxido nítrico (NO) por células linfóides do baço e linfonodo poplíteo de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E ou selênio

É sabido que o macrófago pode matar células tumorais através da produção de óxido nítrico (NO), um mediador inflamatório capaz de matar uma proporção de tumores de diferentes origens e graus. Vários são os mecanismos propostos para atuação do NO na morte de células tumorais, dentre eles: inibição da síntese de DNA e dano na fisiologia da mitocôndria, reduzindo o consumo de O<sub>2</sub> e o transporte de elétron (XU et al., 2002).

**Produção de NO por células do linfonodo poplíteo**



**Figura 14: Produção de NO medida em sobrenadante de cultura de células do linfonodo poplíteo.** Após 30 dias de crescimento tumoral as células do linfonodo poplíteo de animais BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo ConA (Concanavalina A) como estímulo, o sobrenadante foi coletado após 72 horas de cultivo e o NO medido pela reação de Griess. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida de 125 mcM de NaNO<sub>3</sub>. As barras representam a média ± EP das concentrações obtida em cada grupo (n=5) da concentração de nitrito.



**Figura 15: Produção de NO por células do baço medida no sobrenadante de cultura de esplenócitos.** Após 30 dias de crescimento tumoral as células do baço de animais BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo ConA (Concanavalina A) como estímulo, o sobrenadante foi coletado após 72 horas de cultivo e através da reação de Greiss. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade óptica obtida 125 mM de NaNO<sub>3</sub>. As barras representam a média ± EP das concentrações obtida em cada grupo (n=5) da concentração de nitrito.

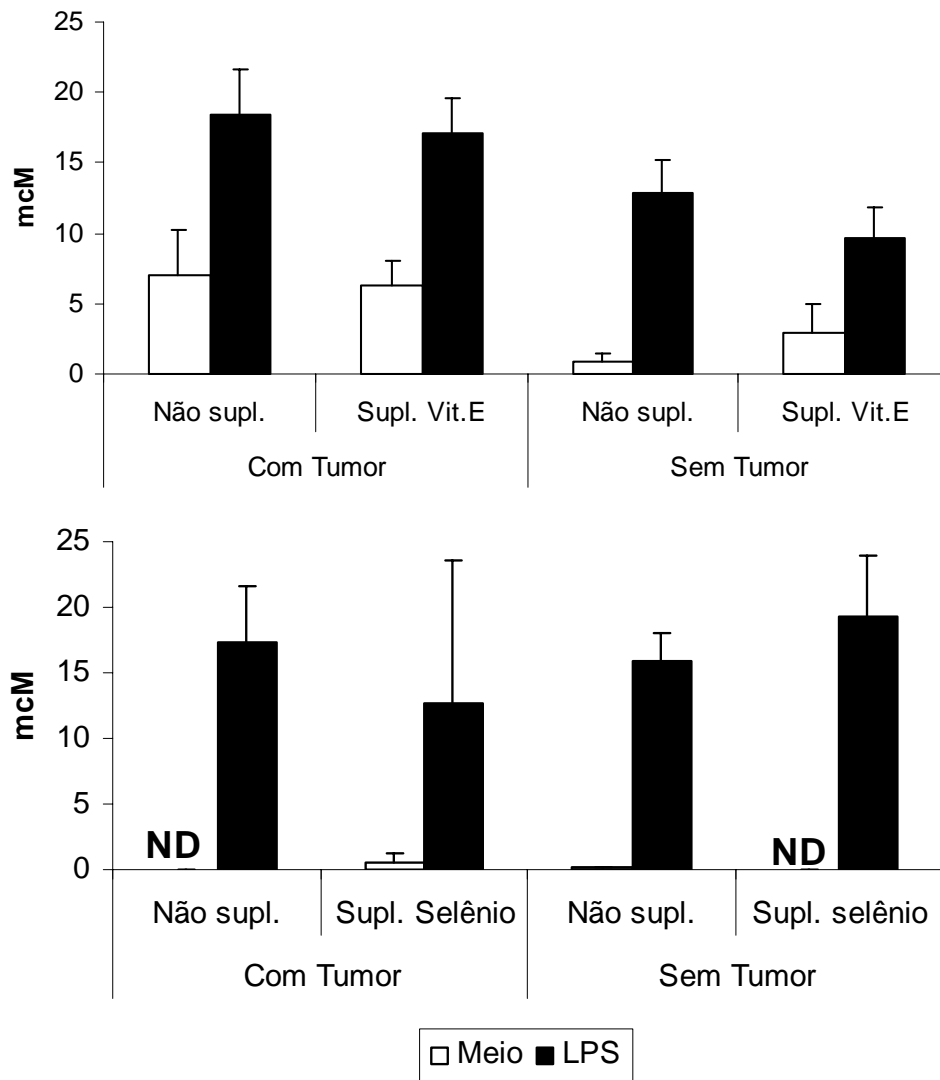
A medida de NO nas células presentes no linfonodo poplíteo desses animais não apresentou nenhuma diferença independente do tratamento dietético. Contudo, verificamos um aumento nos níveis de NO nas células do baço dos animais com tumor e sem suplementação, quando comparado aos animais tratados com vitamina E ou sem tumor. Essa redução pode ser explicada pela ação antioxidante da vitamina E. Essa vitamina pode ter captado NO (considerado um radical livre), destruindo-o e dessa forma contribuindo com a redução nos níveis desse pelas células do baço. Por outro lado, a ausência desse possível efeito no linfonodo poplíteo, talvez se relacione ao

número de células produtoras de NO (principalmente macrófagos). Uma vez que, essas células são encontradas com pouca frequência nesse órgão, e mais facilmente no baço.

#### **5.12) Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos do peritônio de animais inoculados ou não com tumor de Ehrlich e tratados ou não com suplementação de vitamina E ou selênio**

Uma vez não verificando diferença na medida de NO nas células do linfonodo poplíteo, e encontramos diferença na produção de NO por células do baço dos animais estudados; resolvemos medir o óxido nítrico apenas dos macrófagos separadamente, para tanto recrutamos os macrófagos do peritônio.

### Produção de NO por macrófagos do peritônio



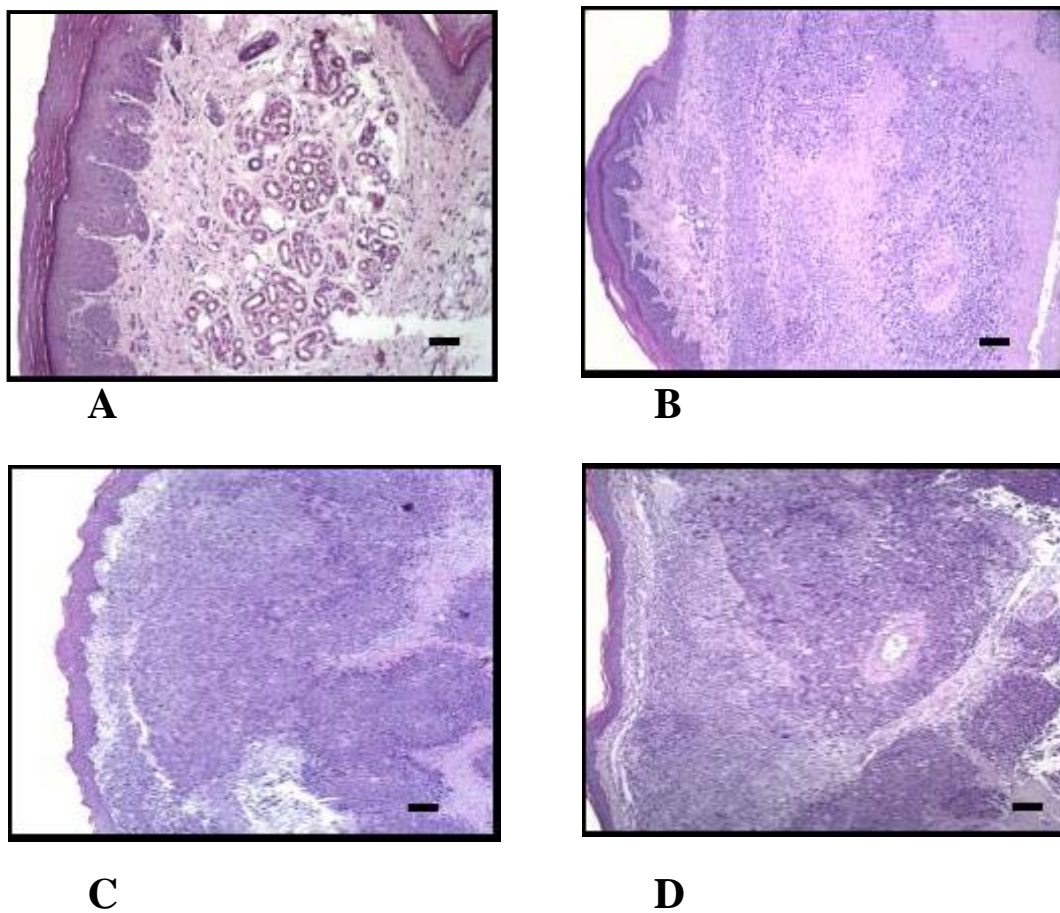
**Figura 16: Produção de NO por macrófagos do peritônio dosada no sobrenadante de cultura de células destas células.** Macrófagos do peritônio de animais BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo LPS como estímulo, o sobrenadante coletado após 72 horas de cultivo e através da reação de Greiss. Com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida de 125 mcM de  $\text{NaNO}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  EP das concentrações obtidas em cada grupo (n=5) da concentração de nitrito.

Da mesma forma que nas medidas de NO por células linfonodo poplíteo, não verificamos diferença entre os grupos estudados quando medimos os níveis de NO produzidos pelos macrófagos do peritônio independente do estímulo in vitro utilizado.

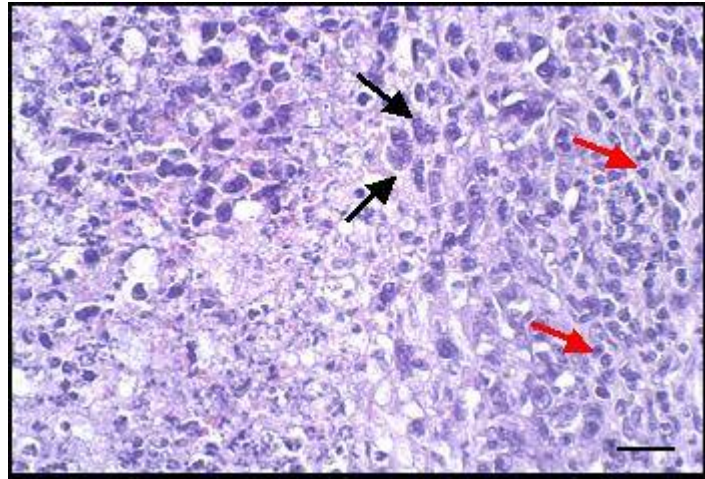
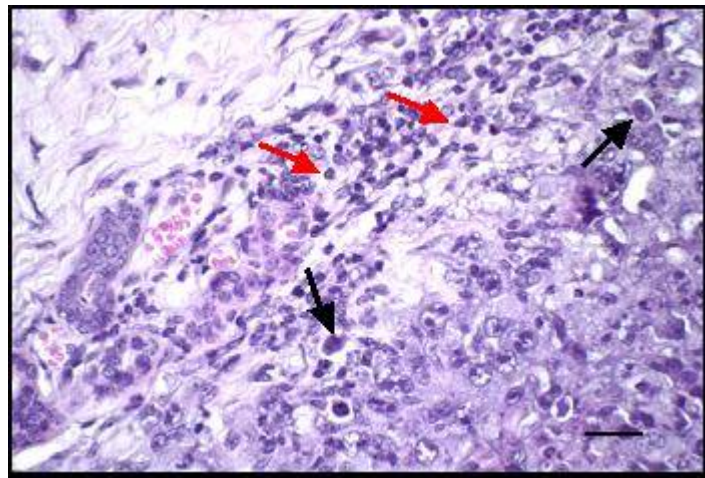
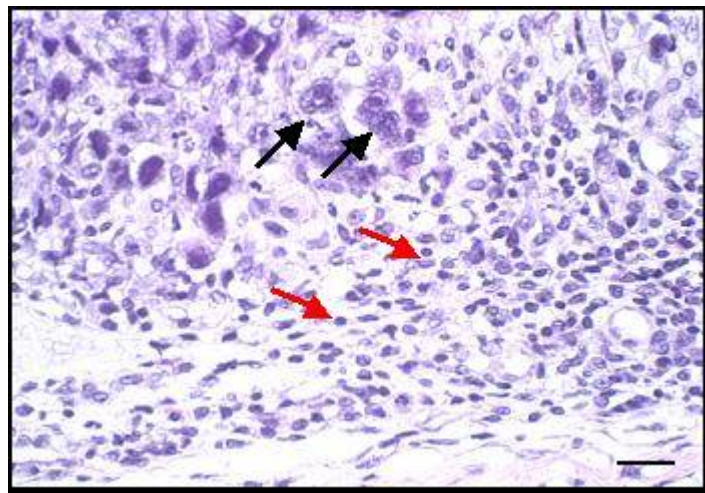
### **5.13) Análise histológica, morfológica e morfométrica dos coxins plantar de animais inoculados com tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio.**

Ao analisarmos o coxim plantar dos animais inoculados com tumor (Figura 18a), verificamos que os animais não suplementados (B) ou suplementados com selênio (C) apresentaram uma extensa área de necrose. Por outro lado, os animais suplementados com vitamina E mostram uma área de necrose reduzida em meio às células tumorais (D).

O aumento maior (60x) nos possibilitou analisar as características das células tumorais e do infiltrado inflamatório presente no corte. Na Figura 18b, podemos observar que há um predomínio de infiltrado inflamatório mononuclear em todos os cortes histológicos. Aparentemente, não há diferença entre os grupos quanto à intensidade do processo inflamatório. Em todos os grupos foi observada a presença de células tumorais volumosas, pouco diferenciadas, e que mostram cromatina irregularmente distribuída. São encontradas várias figuras de mitose em todos os grupos. Presença de células em apoptose, onde podemos observar suas características típicas, como retração celular, condensação da cromatina e formação de bolhas em torno da célula em apoptose. A presença de apoptose parece estar aumentada no corte histológico dos camundongos suplementados com vitamina E (G), quando comparamos com os cortes histológicos de animais não suplementados (E) e suplementados com selênio (F).



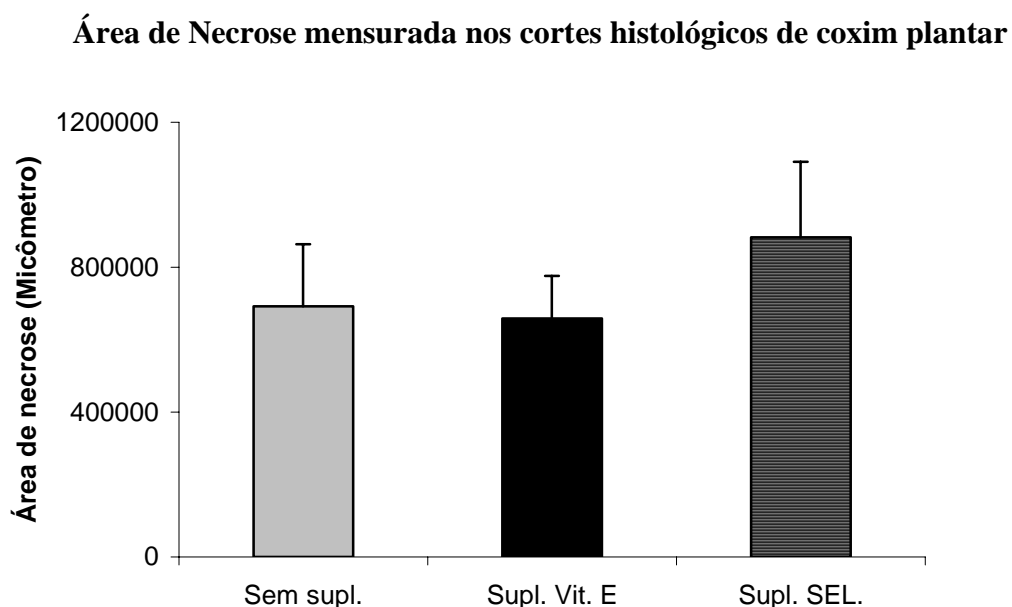
**Figura 17a:** Fotomicrografia de coxim plantar de camundongos inoculados ou não com Tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio. A: controle (sem tumor) – 20X; B: camundongo não suplementado – 10X; C: camundongo suplementado com selênio – 10X; D: camundongo suplementado com vitamina E – 10X. As imagens representam cortes histológicos de coxim plantar após 30 dias de inoculação tumoral corados por hematoxilina-eosina (HE). As setas pretas mostram a área de necrose

**A****B****C**

**Figura 17b: Fotomicrografia de coxim plantar de camundongos inoculados ou não com Tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio. E: camundongo não suplementado – 60X; F: camundongo suplementado com selênio – 60X; G: camundongo suplementado com vitamina E – 60X. As imagens representam cortes histológicos de coxim plantar após 30 dias de inoculação tumoral corados por hematoxilina-eosina (HE). As setas vermelhas mostram presença de infiltrado inflamatório e as setas pretas mostram células tumorais pleomórficas, atípicas e arredondadas.**

#### 5.14) Mensuração da área de necrose

Durante a análise histológica dos coxins plantar dos camundongos inoculados com tumor, verificamos uma extensa área de necrose presente no coxim plantar dos animais sem suplementação e suplementados com selênio, enquanto o tecido dos animais inoculados com tumor e suplementados com vitamina E apresentou um menor área de necrose (Figura 17a). Para confirmar essa diferença encontrada na análise morfológica, resolvemos quantificar as áreas de necrose.



**Figura 18: Mensuração da área de necrose no coxim plantar dos camundongos inoculados com tumor de Ehrlich, suplementados ou não com vitamina E ou selênio.** Imagens de lâminas coradas por HE foram capturadas em aumento de 4x através de um sistema de microscópio acoplado a uma vídeo-câmera, o qual transmitia as imagens para um computador. Com a ajuda de um software KS 300, as imagens capturadas foram analisadas mensurando dessa forma as áreas de necrose.

Apesar de verificar uma aparente diferença nas áreas de necrose entre os animais suplementados com vitamina e os não suplementados ou suplementados com selênio (Figura 17a), não encontramos diferença significativa entre os grupos após a mensuração dessas áreas.

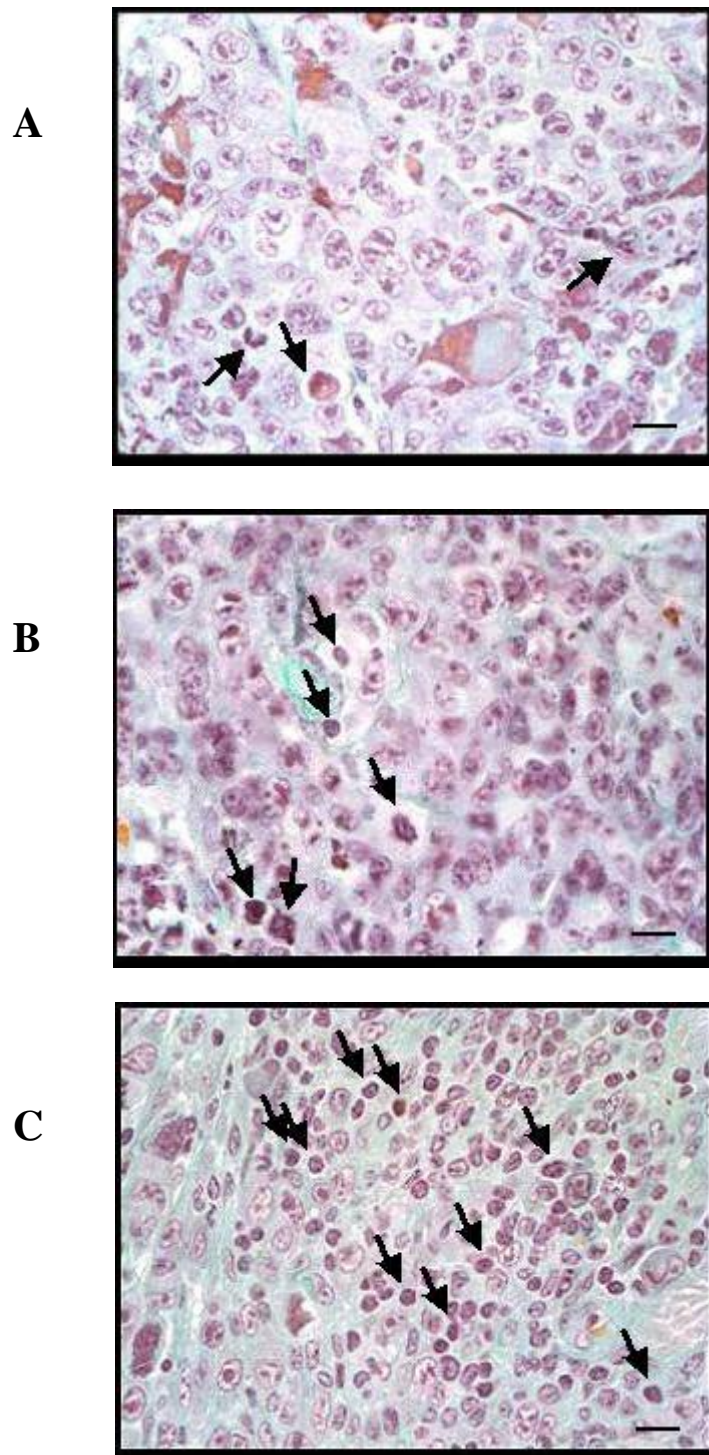


### **5.15) Avaliação do índice apoptótico por coloração de Shorr**

A apoptose, um tipo de morte celular programada e ativa, que tem várias funções dentre elas, eliminar células potencialmente prejudiciais para a manutenção da homeostase, tem sido implicada na morte de tumores via ativação do sistema imunológico.

Por isso resolvemos avaliar se no tratamento com vitamina E, a redução do crescimento do tumor, é mediada por apoptose. Para tanto realizamos uma coloração especial, chamada Shorr, para evidenciar os núcleos das células e através dessa estratégia evidenciar as células em apoptose.

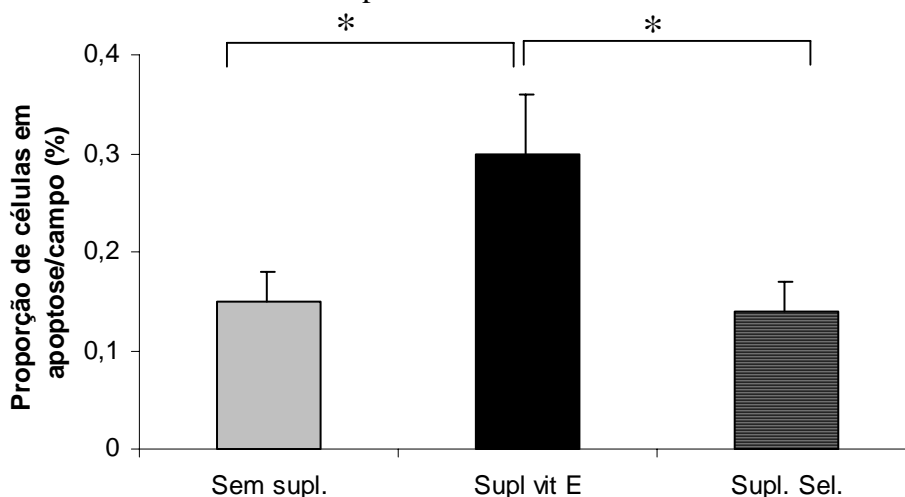
Podemos verificar através dessa coloração que as células em apoptose apresentam-se reduzidas de tamanho (picnose), com a cromatina mais condensada e algumas ainda apresentam um halo branco envolto (anoiquia). As setas mostram as células em apoptose.



**Figura 19: Fotomicrografia de coxim plantar de camundongos inoculados ou não com Tumor de Ehrlich e suplementados ou não com vitamina E ou selênio.** A: camundongo não suplementado – 100X; B: camundongo suplementado com selênio – 100X; C: camundongo suplementado com vitamina E – 100X. As imagens representam cortes histológicos de coxim plantar após 30 dias de inoculação tumoral corados por Shorr. As setas pretas mostram presença de células em apoptose.

### 5.16) Índice apoptótico

Através da coloração de Shorr, o índice apoptótico foi calculado, considerando o número total de células/lâminas/campo.



**Figura 20: Índice apoptótico das células de tumor de Ehrlich inoculados em coxim plantar de camundongos BALB/c suplementados ou não com vitamina E ou selênio.** Imagens de lâminas coradas por Shorr foram capturadas em aumento de 100x através de um sistema de microscópio acoplado a uma vídeo-câmera, o qual transmitia as imagens para um computador. Com a ajuda de um software KS 300, as imagens foram capturadas e as células em apoptose bem como o total de células por campo foram contados para obtenção do percentual de células em apoptose presente em cada campo. Foram capturados 10 campos por lâminas, e 5 lâminas por animal de cada grupo. O asterisco indica diferença significativa entre os grupos suplementados com vitamina E e sem suplementação e entre o suplementado com selênio, comparados pelo ANOVA e pelo pós-teste Newman-Keuls .

A contagem das células em apoptose mostrou que os animais suplementados com vitamina E apresentaram um maior índice apoptótico quando comparados aos demais grupos, evidenciando, assim, que a redução no crescimento tumoral desses camundongos pode estar relacionada à morte das células tumorais via apoptose.

## 6. DISCUSSÃO

Com o passar dos anos a incidência de câncer tem aumentado na população mundial, a estimativa para o ano de 2006 era de 472.050 novos casos no Brasil, considerando os tipos mais incidentes, o câncer de próstata no homem e de mama e colo uterino na mulher. No mundo a estimativa era de 58 milhões de morte para o ano de 2005, o câncer é considerado a segunda causa de morte por doença na maioria dos países. Esse aumento está relacionado com alguns fatores como: predisposição genética, hábito de fumar, estresse, tipo de dieta, entre outros. Ao mesmo tempo em que a incidência de câncer aumenta, as pesquisas também avançam com objetivo de prevenir ou até mesmo descobrir a cura definitiva para tal doença (TRICHOPOULOS, et al., 1996; INCA, 2006; OMS, 2006).

Com relação às pesquisas em torno dessa doença, vários estudos têm procurado descobrir novas terapias para o combate ao câncer utilizando alguns fatores dietéticos. Dentre esses fatores, encontram-se os antioxidantes, que têm mostrado resultados interessantes na inibição do crescimento tumoral e na ativação da função imune. Os antioxidantes mais estudados no efeito sobre o câncer e no sistema imune são as vitaminas A, C e E, e os micronutrientes selênio e zinco (BIRT, 1986; SANDERS & KLINE, 1995; LOPEZ-VARELA et al., 2002).

Em nosso estudo resolvemos avaliar o efeito de dois antioxidantes descritos na literatura como anticarcinogênicos: selênio e vitamina E, em um modelo experimental de neoplasia chamado de tumor de Ehrlich.

Esse tipo de tumor considerado um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, pode crescer na forma ascítica e sólida dependendo do local de inoculação tumoral. Alguns autores têm mostrado que a forma ascítica cresce rápido e agressivamente levando ao óbito do camundongo em aproximadamente 15 dias com um quadro de caquexia. Já o tumor na forma sólida cresce de maneira mais lenta e o aparecimento da caquexia dependerá do tamanho, progressão e presença de metástases do tumor (KLEIN & KLEIN, 1956; LUO et al., 1998; CULO et al., 1978).

A caquexia no câncer é uma síndrome caracterizada por anorexia, atrofia do músculo esquelético, perda de peso corpóreo, fraqueza e perda tecidual, e está associada com anemia e alterações na função imune. Ela pode ser causada por um aumento na expressão de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Essa alteração no perfil de citocinas pode resultar em hipoalbuminemia (diminuição de albumina sérica), uma vez que a produção

de albumina diminui devido à ação de citocinas no tecido hepático; bem como em alteração nos níveis de glicemia, a qual pode sofrer influência de citocinas e hormônios produzidos pelo tecido tumoral (GORDON et al., 2005; MOLDAWER & COPELAND, 1997; VIAL & DESCOTES, 1995).

Considerando um possível quadro de caquexia em nossos animais por causa do crescimento das células tumorais, nós avaliamos o estado nutricional dos camundongos inoculados com tumor ou não e tratados com suplementação ou não de selênio ou vitamina. Utilizamos como critérios nutricionais a medida de glicose, de albumina e de proteínas totais bem como o peso corporal.

A análise do peso corpóreo revelou que todos os animais avaliados ganharam peso regularmente no decorrer do experimento, não sendo observadas diferenças significativas de ganho de peso entre os grupos com ou sem tumor e suplementados ou não (Figura 4). Da mesma forma, as medidas de glicose, albumina e proteínas totais não mostraram diferenças relevantes entre os grupos estudados (Tabela 1). Analisando os parâmetros acima, que podem está relacionados ao processo de caquexia, e não verificando nenhuma diferença entre os grupos, era de se esperar também que a contagem de hemácias não se alterasse. (Tabela 2). Esses resultados indicam que o crescimento do tumor de Ehrlich não acarretou alterações nutricionais e nem um quadro de caquexia nos animais durante o experimento.

Como descrito anteriormente, avaliamos nesse trabalho o efeito da vitamina E e do selênio no crescimento do tumor de Ehrlich e na resposta imunológica a esse tumor.

Nossos resultados mostram que a suplementação com vitamina E foi capaz de reduzir o crescimento do tumor de Ehrlich na forma sólida de forma significativa quando comparada com animais não suplementados (Figura 3). Malafa e colaboradores (2002) mostraram que o tratamento com vitamina E em camundongos inoculados com melanoma proporcionou uma redução no tamanho do tumor. O mesmo resultado foi encontrado por Quin e colaboradores (2004) em um modelo com tumor de câncer de pulmão em camundongos. Entretanto, em ambos os estudos o tratamento com vitamina E foi realizado via injeções intraperitoneais nos camundongos portadores dos tumores, na concentração de 150 mg/kg/dia de vitamina E o que diferencia esses trabalhos do nosso. Utilizamos a via oral para administração usando dietas suplementadas, testando assim uma forma natural de ingestão desse nutriente. Alguns trabalhos mostram que a suplementação com vitamina E em pacientes portadores de câncer de próstata tem um efeito supressor no crescimento desse tumor, porém outros estudos não têm encontrado

tal relação. Apesar das controvérsias a respeito da suplementação de vitamina E em pacientes com câncer, em modelo animal, o tratamento com esse antioxidante está bem estabelecido com resultados positivos (PAK et. al, 2002; SONN et. al, 2005; BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2007)

Ao contrário dos resultados encontrados com a suplementação da vitamina E, o tratamento com selênio não resultou em inibição do crescimento do tumor de Ehrlich (Figura 3). Esse resultado é oposto a vários trabalhos encontrados na literatura relacionando o tratamento com selênio e crescimento tumoral. Em uma revisão escrita por Milner (1984), o autor relata alguns estudos utilizando tratamento com selênio e tumor de Ehrlich, em que o selênio foi capaz de retardar o crescimento tumoral. Porém a forma utilizada do selênio nesse estudo foi o selenito de sódio (selênio inorgânico) considerado na literatura como a forma mais efetiva desse nutriente, sendo administrado por via parenteral (CLEMENT & GANTHER,1990). Um outro estudo utilizou várias formas de selênio (via peritoneal na concentração de 1 µg/g de peso como o selenito de sódio e a metilselenocisteína) no tratamento do tumor de Ehrlich na forma ascítica, resultando na inibição do crescimento desse tumor por todas as formas utilizadas do nutriente. No nosso trabalho, utilizamos o selênio orgânico na forma de selenometionina, esse tipo de selênio não é tão efetivo na inibição de tumores quimicamente induzidos ou em células neoplásicas transplantáveis quanto o selenito de sódio. Alguns fatores podem ter contribuído com o resultado negativo do selênio em nosso estudo:

a) A biodisponibilidade (capacidade de um nutriente absorvido de ser utilizado fisiologicamente pelos tecidos e ser estocado) do selênio depende da conversão do selênio absorvido em forma ativa biologicamente e da retenção pelo tecido. A biodisponibilidade pode ser influenciada por fatores endógenos incluindo: crescimento, gestação, lactação, eficiência da digestão, tempo de trânsito do nutriente no intestino e a presença de desordens ou doença gastrointestinal (TAPIERO et al., 2003).

b) Segundo Lu e colaboradores (1995) citado por Sinha e colaboradores (1996), as diferentes formas de selênio podem ter mecanismos distintos para inibir o crescimento de células in vitro, bem como algumas formas são mais eficazes que outras. Este é o caso do selenito de sódio (selênio inorgânico).

c) Além disso, a via de administração e a dosagem também podem influenciar o efeito do selênio no crescimento tumoral. Poirier e Milner (1983) compararam diferentes formas de administração de selênio (gavagem, intraperitoneal e dietética) no

crescimento do tumor de Ehrlich e verificaram que a gavagem e a administração dietética foram menos eficazes na redução do tumor quando comparadas a injeções intraperitoneais. Em um trabalho avaliando várias doses de diferentes formas de selênio, foi verificado que o selênio na forma de selenometionina somente foi eficaz em uma concentração de 2 µg/g de peso, enquanto que as demais formas foram eficazes também nas dosagens de 1,0 e 0,25 µg/g de peso (GREEDER & MILNER, 1980).

Em nosso trabalho, administramos o selênio por via oral através de suplementação de dieta em uma concentração de 25 µg/dia, que em relação ao peso do animal equivale a 1 µg/g de peso, o que seria uma concentração muito inferior à descrita por Poirier e Milner (1983) considerada eficaz para a selenometionina.

Tem sido mostrado que várias neoplasias humanas ou murinas tais como: sarcomas, mesoteliomas, melanomas e carcinomas podem produzir fator estimulador de colônia (CSF) e receptores de CSF. O efeito desse CSF em câncer experimental ou humano inclui neutrofilia, trombocitose, hipercalcemia e hematopoiese extramedular com esplenomegalia. Foi descrito que o crescimento do tumor de Ehrlich inoculado em camundongos na forma sólida é acompanhado de esplenomegalia e hematopoiese esplênica. Esses efeitos são dependentes de CSF produzido pelas células tumorais (MORALES et al., 1999). Em nosso experimento, verificamos uma esplenomegalia nos animais inoculados com tumor de Ehrlich, porém não verificamos nenhuma alteração na contagem de leucócitos globais (Tabela 3). A contagem diferencial dos leucócitos mostrou uma redução no número de leucócitos mononucleares no sangue total dos camundongos inoculados com tumor de Ehrlich, suplementados ou não com selênio. Por outro lado, a suplementação com vitamina E foi eficaz na manutenção do número de células mononucleares (Tabela 3).

Após análise do efeito da suplementação com selênio ou vitamina E sobre o crescimento do tumor de Ehrlich, avaliamos os efeitos desses antioxidantes na resposta imunológica ao tumor. É descrito que o tumor de Ehrlich na forma ascítica causa uma redução na população total de células TCD4<sup>+</sup> do baço e na expressão de IFN-γ por esses linfócitos, quando estimulados com mitógenos. Esses resultados foram verificados até 10 dias após inoculação tumoral. Além disso, esse tumor tem um efeito inibitório na proliferação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e na atividade de células NK, bem como um efeito estimulatório na produção de anticorpos do tipo IgM. Uma das explicações da inibição dessas populações de células é a secreção de TGF-β pelas células do tumor de Ehrlich,

que suprime a função imune. Embora o TGF- $\beta$  seja considerado um potente inibidor de muitos tipos de células, ele não afeta a proliferação do tumor de Ehrlich, porque essas células tumorais não expressam receptores capazes de se ligar ao TGF- $\beta$ , tornando o tumor incapaz de responder ao estímulo dessa citocina. (SEGURA et al., 1997; SEGURA et al., 2000; MIYAZONO et al., 2003; ELEXPURU et al., 1997; PARHAR & LALA, 1985).

Uma vez que utilizamos o tumor na forma sólida ao invés da forma ascítica, diferenciando assim do trabalho de Segura e colaboradores (1997), não verificamos a redução no número de células CD4<sup>+</sup> presente no baço e muito menos nos linfonodos poplíteos (Figuras 7 e 8). Contudo podemos observar uma redução nos percentuais de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (possivelmente células T reguladoras responsáveis por manter a tolerância aos componentes próprios do organismo) presentes nos linfonodos poplíteos dos animais inoculados com tumor independentemente de suplementação. Essas células também se encontraram reduzidas em animais sem tumor e suplementados com vitamina E (Figuras 7 e 8). Shimizu et al.(1999) mostraram que a depleção *in vitro* de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> leva à geração de células NK ativas capazes de matar o tumor. Eles também mostraram que a remoção de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pode reverter a falta de resposta aos tumores, levando ao desenvolvimento espontâneo de células efetoras tumor-específicas. Por isso, a possível capacidade da vitamina E em ativar célula NK (Figura 9a) e reduzir células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Figura 7) pode contribuir com a redução no crescimento tumoral. Por outro lado, a redução no percentual de células foi observada em animais com tumor sem suplementação ou suplementados com selênio, e esse resultado não se relacionou com uma maior atividade de células NK ao comparamos os animais com tumor. Com isso, podemos inferir que a redução no percentual das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se deve a uma possível tentativa do sistema imune em montar uma resposta efetiva contra o tumor de Ehrlich. Porém, essa tentativa falhou por ativar células efetoras, pois não basta apenas uma redução no percentual dessas células. É preciso ativação de células NK e linfócitos TCD8<sup>+</sup> para que esses exerçam suas atividades anti-tumora. A redução no percentual de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, pode ser explicada pelo modelo tumoral utilizado, considerando um tumor pouco imunogênico. Sabemos que a imunogenicidade é importante tanto na estimulação de respostas imunes como também na indução de mecanismos imuno-moduladores e tolerância. Esta pode ser a explicação para não encontrarmos inibição no crescimento do tumor em animais não suplementados como nos suplementados com selênio.



Observou-se um percentual aumentado da população de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) no linfonodo poplíteo de animais inoculados com o tumor, independentemente de suplementação, indicando que esse tipo de tumor gera um aumento na produção de anticorpos.

Já o percentual de células NK, presente nos linfonodos poplíteos, apresentou-se reduzido em todos os animais inoculados com tumor comparados aos animais sem tumor (Figura 7), comprovando os dados de Segura e colaboradores (2000), de que o tumor de Ehrlich leva a uma redução no número de células NK.

Avaliando o efeito da suplementação com selênio sobre essa população de células, nenhuma alteração foi observada em seu percentual nos linfonodos poplíteos (Figura 7), entretanto no baço o percentual de células NK aumentou nos animais suplementados e sem inoculação tumoral quando comparados aos animais inoculados com tumor (Figura 8). Dados da literatura mostram que a suplementação com selênio tem influência sobre a atividade de células NK do baço em camundongos com tumor inoculado intraperitonealmente. Koller e colaboradores (1985) também mostraram que a suplementação da água com 2,0 ppm de selênio na forma de selenito de sódio promoveu uma maior atividade citotóxica de células NK presentes no baço de ratos tratados (PETRIE et al, 1989; KIREMIDJIAN-SCHUMACHER et al., 1996). A dose utilizada em nosso trabalho não foi eficaz na redução do tamanho do tumor, talvez por causa da via de administração, da forma tumoral utilizada (sólida e não ascítica) ou pelo fato de utilizarmos a forma orgânica como selenometionina, considerada uma forma pouco eficaz na resposta anticarcinogênica. Todos esses fatores podem ter influenciado no nosso resultado.

Por outro lado, a suplementação com vitamina E proporcionou um aumento no percentual de células NK em ambos os órgãos estudados (Figuras 5 e 6). Moriguchi & Muraga (2000) escreveram uma revisão sobre o efeito da vitamina E na imunidade, descrevendo que a suplementação com essa vitamina em ratos e camundongos proporciona um aumento significativo na atividade de células NK do baço.

Com base nos dados da literatura de que ambos os nutrientes estimulam a atividade de células NK, resolvemos avaliar a atividade dessas células no baço e no linfonodo poplíteo dos grupos experimentais em estudo, utilizando o marcador CD69. Essa molécula é o produto de um gene expresso pelas células T após estimulação antigênica que, uma vez expressa, atua como molécula co-estimuladora para ativação e

proliferação dessas células. Sua expressão pode ser induzida também em células B, células NK e neutrófilos (ZIEGLER. et al, 1994; ZIEGLER et al., 1994).

Nossos resultados mostraram um aumento na atividade das células NK nos linfonodos poplíteos dos animais inoculados e suplementados com ambos os antioxidantes (Figura 9), porém esse resultado não foi encontrado no baço (Figura 10), contradizendo os resultados relatados na literatura. O aumento da atividade de células NK foi avaliado através de uma maior expressão da molécula CD69 por essas células. Uma maior atividade dessas células somente no linfonodo poplíteo, pode ser explicada pelo fato de que, a inoculação tumoral usada no estudo foi a forma sólida implantada no coxim plantar do animal e esse linfonodo drena o local inoculado, representando assim uma resposta imunológica local. Os trabalhos que mostram o aumento da atividade de células NK no baço se relacionam a tumores localizados na região abdominal. Por isso nossos resultados no baço são diferentes.

Ao analisar a população de células do baço e do linfonodo poplíteo quanto aos fenótipos de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> não foi verificada alteração no percentual dessas células (Figuras 5,6,7 e 8) para todos os animais independente da suplementação ou não. Da mesma forma que a atividade de células NK é influenciada pela suplementação de selênio e vitamina E, há trabalho mostrando também que esses antioxidantes podem estimular linfócitos T a proliferar e aumentar sua atividade citolítica (PETRIE et al, 1989; ADOLFSSON et al., 2001).

Considerando esses trabalhos, analisamos a atividade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> através da expressão de molécula CD69, verificando que não houve diferença significativa entre os grupos estudados quando analisamos as populações de células do baço. Porém, podemos observar que houve uma maior expressão de CD69 nos linfócitos TCD8<sup>+</sup> presentes nos linfonodos poplíteos ( $p > 0,06$ ) de animais inoculados com tumor e suplementados com vitamina E quando comparado com os animais sem suplementação (Figura 11). Além disso, a suplementação com selênio em animais sem tumor resultou também em uma maior atividade de linfócitos TCD8<sup>+</sup>, verificada através do aumento na expressão de CD69 (Figura 11). Esses dados confirmam o efeito desses dois antioxidantes na ativação de linfócitos TCD8<sup>+</sup>.

Os trabalhos de Kiremidjian-Schumacher e colaboradores (1990 e 1992) mostraram que a suplementação com selênio *in vivo* e *in vitro* foi capaz de aumentar a capacidade proliferativa de linfócitos T presentes no baço, levando a uma maior

liberação da citocina IL-2 por essas células. A maior produção de IL-2, por sua vez, resultou no aumento da expansão clonal e da citotoxicidade dessa célula.

Unindo o efeito da suplementação de vitamina E encontrado em nosso resultado no crescimento tumoral com seu efeito na resposta imunológica, podemos inferir que esse antioxidante foi capaz de inibir o crescimento do tumor de Ehrlich e que provavelmente essa inibição ocorreu por causa da maior ativação das células NK e de linfócitos TCD8<sup>+</sup> provocada por esse tratamento. Essas células são conhecidamente responsivas a antígenos tumorais sendo capazes de matar tumores.

O efeito da suplementação de vitamina E sobre as células T tem sido relatado por vários autores. Moriguchi e colaboradores (1998) e Moriguchi & Muraga (2000) mostraram, em modelo experimental de camundongos velhos quando o sistema imunológico está em declínio, que a suplementação com vitamina E provoca aumento na diferenciação de linfócitos T no timo. Esses autores revisaram o efeito da vitamina E na resposta imunológica em camundongos velhos e em humanos idosos, relatando que a suplementação com essa vitamina induziu o aumento na produção de IL-2, refletido na proliferação celular desses linfócitos, tanto em humanos como em camundongos. Em um outro trabalho também com camundongos velhos, Adolfsson e colaboradores (2001) mostraram que a suplementação com vitamina E não somente aumentou os níveis de IL-2 produzida por linfócitos T, como também foi capaz de induzir divisão celular e a produção dessa citocina por células T virgens, e não por células T de memória. Esses autores demonstraram que a vitamina E tem capacidade de ativar e influenciar células T virgens em camundongos velhos, não afetando as células de memória, o que pode contribuir para uma resposta rápida e eficiente frente a estímulos. Han & Meydani (2000) e Han e colaboradores (2000) utilizaram um modelo de influenza viral em camundongos velhos mostrando que a vitamina E foi capaz de induzir resistência a infecção pelo vírus da influenza, através do aumento de citocinas do tipo 1 (Th1). A infecção de macrófagos de camundongos por esse vírus resulta em produção de TNF- $\alpha$ , IFNs e prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) Suplementando esses camundongos com vitamina E, ocorreu um aumento na produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  e uma redução nos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

Há dois possíveis mecanismos que explicam a regulação da vitamina E sobre a produção de citocinas:

1) A vitamina E pode atuar sobre os fatores de transcrição, os quais são regulados pelo status redox, dentre eles NF-kB (fator nuclear) e AP-1 (proteína ativadora). Uma vez que essa vitamina pode atuar sobre o potencial de redução e oxidação das células, captando radicais livres e inibindo-os, e por ser o balanço entre redução e oxidação importante para que ocorra a ligação do DNA, a vitamina E pode ativar a transcrição nas células. Dessa forma, a vitamina E pode regular a transcrição de citocinas. Estudos têm mostrado que a vitamina E e seus derivados podem inibir a ativação de NF-kB em camundongos. Como muitas citocinas possuem locais que se ligam à NF-kB e AP-1 para promoverem e aumentarem as regiões de codificação gênica delas próprias, ao inibir a ativação desse fator de transcrição a vitamina E pode promover ou inibir algum tipo de citocina (NAKAMURA et al., 1998).

2) Além disso, a vitamina E pode influenciar na síntese de PGE<sub>2</sub>, a qual desempenha um papel na resposta Th1 e na regulação de citocinas pró-inflamatória. A PGE<sub>2</sub> atua de forma direta nos estágios iniciais da ativação de linfócitos T, resultando na redução da produção e expressão de receptor para IL-2. Além disso, a PGE<sub>2</sub> pode modular a secreção de citocinas Th1 e Th2 através do seu efeito na IL-12, a qual aumenta resposta Th1 por promover diferenciação de células T virgens em células Th1 capazes de produzir IFN- $\gamma$ . Estudos com camundongos têm mostrado que a suplementação com vitamina E pode inibir atividade de cicloxigenase, precursor de PGE<sub>2</sub>, reduzindo assim a produção de prostaglandina (HAN & MEYDANI, 2000).

O papel da PGE<sub>2</sub> no tumor de Ehrlich foi descrito por Parhar & Lala (1988). Eles mostraram que o tumor de Ehrlich na forma sólida induz produção de PGE<sub>2</sub> (considerada imunossupressora *in vivo* e *in vitro*) pelos macrófagos do baço, e discutiram que essa prostaglandina poderia atuar na inativação de células NK, linfócitos T e linfócitos B favorecendo o crescimento tumoral

È bem estabelecido que citocinas podem potencializar o crescimento, a diferenciação e a ativação de células imunes para que possam desempenhar suas funções. Elas são liberadas por células imunes em resposta a diversas variações de estresse celular incluindo injúria induzida por carcinógenos, infecção e inflamação. Contudo, alguns tumores também possuem capacidade de liberar citocinas e o tumor de Ehrlich não foge à regra. Uma das citocinas produzidas pelo tumor de Ehrlich é o TGF- $\beta$  (OPPENHEIM & FUJIWARA, 1996; DRANOFF, 2004).

Foi realizada então a mensuração de algumas citocinas no baço e linfonodo poplíteo dos animais em estudo. As mensurações da citocina IL-10 na população de

células do linfonodo poplíteo mostrou diferença estatisticamente significativa apenas nas células sem estímulo *in vitro*, entre os grupos suplementados com vitamina E e sem suplementação (Figura 10). Ao analisar a população de células do baço não encontramos diferenças entre os grupos, da mesma forma que a suplementação com selênio também não afetou o perfil dessa citocina em nenhum dos órgãos estudados (Figura 11). A medição da citocina IFN- $\gamma$  também não mostrou diferença entre os grupos em nenhuma das células dos órgãos analisados (Figuras 12 e 13).

Uma possível explicação para não encontrarmos alterações no perfil de citocinas dos animais inoculados com tumor, se deve ao fato de que as alterações nos níveis dessas substâncias ocorreram talvez nos primeiros instantes da resposta, momento crucial para definir uma resposta efetiva ao tumor ou um escape imunológico do mesmo. O trabalho de Belo (2005) mostrou que as alterações no perfil de IFN- $\gamma$  em tumor de Ehrlich ocorreram nos primeiros dias de inoculação, após o 10<sup>o</sup> dia os níveis tendem a reduzir e igualar aos níveis dos animais controle.

Embora Hsieh & Lin (2005) tenham mostrado que a suplementação com vitamina E leva a um aumento na produção de IL-10 por células do baço quando estimuladas *in vitro* com Con-A ou PMA, nossos dados não mostram tal efeito. A produção de IL-10 pelas células do linfonodo poplíteo de animais suplementados com vitamina E mostrou-se reduzida, enquanto que no baço não foi observada diferença nos níveis dessa citocina entre os grupos estudados. A redução nos níveis dessa citocina apresentada em nosso estudo pode se relacionar ao efeito do tumor de Ehrlich na diminuição do percentual de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no linfonodo poplíteo observada nos animais suplementados com vitamina E ou selênio ou não suplementados (Figuras 5 e 6). As citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  são imunossupressoras e são secretadas principalmente por células Tr1 e Th3 que não são as mesmas Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mas também são células com atividade reguladora. A vitamina E pode estar exercendo um efeito importante na inibição do crescimento ou atividade de células T reguladoras em geral. Além disso, a vitamina E provocou uma redução no percentual de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> do baço, observado nos animais sem tumor (Figuras 7). Unindo esses resultados, encontramos uma possível explicação para a redução nos níveis basais de IL-10 pelas células do linfonodo poplíteo em animais suplementados com vitamina E, uma vez que observamos a redução das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nos animais com tumor e sem tumor tratados com essa vitamina. (TERABE & BERZOFISKY, 2004; KIM et al., 2005).

Além das citocinas, medimos uma outra substância importante na resposta tumoral, chamada óxido nítrico. O óxido nítrico é produzido por macrófagos ativados para matar as células tumorais. Esse apresenta um efeito citotóxico sobre as células tumorais que ocorre pela inibição da respiração mitocondrial e da síntese de ATP sob baixas concentrações de oxigênio. Ele atua também provocando uma inibição da replicação celular pela inativação de enzimas como redutase ribonucleotídea, que afeta a síntese de DNA do tumor (NISHIKAWA et al., 2004). Nossos dados mostraram que as células do baço de animais sem suplementação e inoculados com tumor apresentaram um aumento nos níveis de NO quando comparado aos animais sem tumor ou com tumor e suplementados com vitamina E. Já as células do linfonodo poplíteo não apresentaram diferenças quanto ao nível de NO; os animais com tratamento com selênio também não apresentaram diferença entre si (Figuras 14, 15 e 16).

Ao avaliar o tumor histologicamente, verificamos a presença de um grande influxo de infiltrado inflamatório circundando o tumor; nesse infiltrado predominavam as células mononucleares. As células tumorais apresentaram-se pleomórficas, arredondadas, atípicas, algumas apresentando núcleo ovalado e central (Figuras 16 e 17). Também evidenciamos, nos cortes histológicos corados por HE, uma extensa área de necrose que aparentemente apresentou-se em maior proporção em animais sem suplementação e suplementados com selênio. Contudo a mensuração da área de necrose dos grupos inoculados não apresentou diferença entre os grupos. A presença de necrose pode estar relacionada à falta de oxigênio para as células.

As células tumorais têm a capacidade de produzir fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, e quando a taxa de crescimento é muito alta e a produção desses fatores não é proporcional, as células tumorais sofrem hipóxia e morrem por necrose (MONTENEGRO & FRANCO, 1999). Essa pode ser a explicação da presença de extensa área de necrose nos cortes histológicos dos animais não suplementados e suplementados com selênio, pois ambos não apresentaram redução no crescimento tumoral.

Embora o tratamento com vitamina E tenha levado à redução no crescimento tumoral, a mensuração da área de necrose não se apresentou reduzida em relação aos outros grupos inoculados com tumor. Esse fato talvez se relacione com a ação das células do sistema imunológico sobre as células tumorais, e não com a falta ou a redução de oxigênio devido ao crescimento tumoral exagerado, já que esse estava reduzido nos animais suplementados com vitamina E. As células NK, bem como os

linfócitos T CD8<sup>+</sup>, possuem em seu interior substâncias que quando liberadas podem culminar na formação de poros da célula alvo e a indução de morte celular (perforinas e granzima B). Essas substâncias podem formar poros e ativar caspases e levar a morte das células tumorais via apoptose ou podem através do mecanismo de citotoxicidade direta ou osmótica lisar essas células, favorecendo a liberação do conteúdo presente nos lisossomos dos tumores, como enzimas, que prejudicariam o micro-ambiente em volta, provocando a lise das estruturas e células adjacentes, além de induzir a um processo inflamatório local (MAJNO & JORIS, 1995; JANEWAY et al., 2000). Nossos resultados indicam que o mecanismo envolvido na morte das células tumorais inoculados em animais suplementados com vitamina E não é via necrose.

Um dos mecanismos propostos que culmina na morte das células tumorais é a apoptose, que pode ocorrer através da expressão de Fas ligante (FasL) por células NK ou linfócitos T citotóxicos, essa molécula se liga ao receptor Fas presente na membrana das células tumorais ativando vias apoptóticas intrínsecas, como a cascata de caspases (NAGATA, 1996). Além disso, a expressão de TNF pelas células do sistema imune ligando-se a seu receptor (RTNF) presente na membrana de células tumorais pode provocar também a apoptose dessas (JANEWAY et al., 2000; CONTRAN et al., 2000).

A apoptose é um tipo de morte celular programada, em que a célula alvo não sofre lise, não liberando seus conteúdos celulares, os quais são transformados em corpos apoptóticos e esses são fagocitados por macrófagos ou fagócitos adjacentes, impedindo assim um processo inflamatório (MAJNO & JORIS, 1995).

Em nosso trabalho, verificamos que os camundongos suplementados com vitamina E apresentaram um maior índice apoptótico quando comparamos com os animais não suplementados ou suplementados com selênio. Esse resultado confirma dados da literatura que mostram o efeito da vitamina E na indução de apoptose *in vivo* e *in vitro*. Malafa e colaboradores (2002) mostraram que o tratamento com vitamina E por via intraperitoneal inibiu o crescimento do melanoma por apoptose dessas células. Trabalhos com suplementação com vitamina E mostraram que esse antioxidante foi capaz de induzir apoptose em células de câncer de próstata, câncer de mama, leucemia e glioblastomas em pacientes. (BOREK, 2004). Porém, o mecanismo pelo qual a vitamina E induz a apoptose de células tumorais ainda permanece desconhecido.

Nossos resultados nos conduzem a inferir que o provável mecanismo pelo qual a suplementação com vitamina E reduziu o crescimento do tumor de Ehrlich foi através da indução de apoptose dessas células. Apoptose essa induzida provavelmente por

células NK e possivelmente por linfócitos TCD8<sup>+</sup> que, uma vez ativados, atuaram sobre o tumor inibindo seu crescimento por meio de morte celular. Por outro lado, a suplementação com selênio na forma de selenometionina e na dose utilizada, não foi eficaz em inibir o crescimento do tumor de Ehrlich, talvez por não causar nenhum aumento em percentual ou atividade de células efectoras contra o tumor. Embora esse tratamento tenha conseguido aumentar o percentual e a atividade de células NK como também a atividade de linfócitos TCD8<sup>+</sup> no baço, efeitos observados somente em animais sem tumor, os animais com tumor não apresentaram nenhuma alteração imunológica favorável à eliminação tumoral.



## 7. CONCLUSÕES

Os animais inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com dieta suplementada com vitamina E, apresentaram uma redução no crescimento do tumor. Essa redução está relacionada com a diferença histológica no local da inoculação tumoral, onde verificou-se um aumento no índice de apoptose de células tumorais. Além disso, outra explicação para a redução no crescimento tumoral é uma maior ativação das células do sistema imune, observado pela expressão de CD69 pelas células NK no linfonodo poplíteo de camundongos inoculados com tumor e tratados com vitamina E. Além dessa alteração a vitamina E também gerou aumento no percentual de células NK no linfonodo poplíteo e baço, bem como redução no percentual de célula  $CD4^+CD25^+$  e nos níveis de IL-10 produzidos pelas células do linfonodo poplíteo.

Por outro lado, a suplementação com selênio não levou a redução do crescimento tumoral, bem como nenhuma alteração histológica. Entretanto, o selênio foi capaz de gerar um aumento no percentual de células NK no baço de animais sem tumor, bem como uma maior ativação nessas células. Já no linfonodo poplíteo verificou-se apenas uma maior ativação das células NK, sem alteração no número dessas e em qualquer outra população de células, o que não foi suficiente para inibir o crescimento do tumor.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A.K. et al. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABREU et al. **O problema do Câncer no Brasil**. 3. ed. Rio de Janeiro, 1993.

ADOLFSSON, O. et al. Vitamin E enhanced IL-2 production in old mice: naive but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2 producing capacity. *J. Immunol.*, 167: 3809-3817, 2001.

AKHURST, R.J & BALMAIN, A. genetic events and the role of TGF- $\beta$  in epithelial tumor- progression. *J. Pathol.*, 187: 82-90, 1999.

ASHFAQ, M.K. et al. vitamin E and b-carotene affect natural killer cell function. *Int J. Food Sci. Nutri.*, 51 (suppl): S13-20, 2000.

BACH, J. F. et al. **Imunologia**. 2 .ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

BELO, A.S. Angiogênese e produção de citocinas na musculatura abdominal em camundongos com tumor ascítico de Ehrlich. Belo Horizonte, 2005.102p./Tese de doutorado – Instituto de Ciências Biológica da UFMG.

BERGAMI-SANTOS, P.C. et al. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life. Science*, 75: 245-255, 2004.

BIRT, DF. Update on the effects of vitamin A, C and E and selenium on carcinogenesis. *Proc. Sco. Exp. Biol. Med.* 183 (3): 311-20, 1986.

BJORKHEM-BERGMAN, L et al. Selenium prevents tumor development in rat model chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26: 125-131, 2005.

BOREK, C. Dietary antioxidants and human cancer. *Integrative Cancer Therapies*, 3: 333-341, 2004.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. et al. The European perspective on vitamin E: Current Knowledge and future research. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76: 703-16, 2007.

BROOME, C.S et al. An increase in selenium intake improve immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 154-162, 2004.

CARVALHO, L.S.C. et al. Vitamin e deficiency enhances pathology in acute Trypanosoma cruzi infected rats. *The royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100:1025-1031, 2005.

CLEMENT, IP & GANTHER, H. Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention. *Cancer res.*, 50: 1206-1211, 1990.

CONTRAN, R.S et al. **Robbins: Patología Estrutural e Funcional**. 6. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COZZOLINO, S. M. F. Vitamina E (tocoferol) In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 1 ed. São Paulo: Manole,. 10, 272-288, 2005.

CULO, F et al. Ascitic versus solid growth of Ehrlich ascites tumor influenced by immunological factors. *Oncology*, 37: 15-21, 1978.

CUPPARI, L. **Guia de Nutrição: Nutrição clínica no adulto**. Barueri, São Paulo: Manole, 2002.

DAGLI, M.L.Z. Disseminação linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo experimental. São Paulo, 1989.148p./dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

DAGLI, MLZ et al. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, 29 (1): 97-103, 1992.

DOUBROVINA et al. Evasión from NK cell immunity by MHC class I Chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J. Immunol.*, 171:6891-6899,2003.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews*. 4: 11-22, 2004.

DUNN, G.P et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. immunol.* 3: 991-998, 2002.

DUNN, G.P. et al. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 21: 137-149, 2004.

DURVALL, W.L. Endothelial dysfunction and antioxidants. *The Mount Sinai Journal of Medicine*. 72: 71-80, 2005.

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

ELEXPURU, A. et al. Ehrlich ascites tumor cells produce a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-like activity but lack receptors with TGF $\beta$ -binding capacity. *Molecular and cellular biochemistry*, 170: 153-162, 1997.

ERL, W. et al. Alpha-tocopheryl succinate inhibits monocytic cell adhesion to endothelial cells by suppressing NF-Kappa B mobilization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 273: H634-H640, 1997.

FELIX, K et al. Selenium deficiency abrogates inflammation-dependent plasma cell tumors in mice. *Cancer Res.*, 64: 2910-2917,2004.

FERGUSON, L.R. et al. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 197: 147-159, 2004.

FEHERVARI , Z. & SAKAGUCHI, S. CD4+ Tregs and immune control. *J. Clin. Investig*, 114: 1209-1217, 2004.

FILHO et al. **Bogliolo: Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

FRANKS, L.M & TEICH, N.M. **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. São Paulo: Roca, 1990.

GORDON, J.N et al. Cancer cachexia. *Q.J.Med.*, 98:779-788, 2005.

GREEDER, G.A & MILNER, J.A. Factors influencing in inhibitory effect of selenium on mice inoculated with Ehrlich ascites tumor cells. *Science*, 209 (4458): 825-827, 1980.

HAN & MEYDANI. Antioxidants, cytokines and influenza infection in aged mice and elderly humans. *J. infectious diseases*, 182(1):S74-80, 2000.

HAN, S.N. et al. Vitamin E supplementation increases T helper 1 cytokine production in old mice infected with influenza virus. *Immunology*, 100: 487-493,2000.

HSIEH, CHIA-CHIEN & LIN, BI-FONG. Opposite effects of low and high dose supplementation of vitamin e on survival of MRL/lpr mice. *Basic Nutritional investigation*. 21: 940-948, 2005.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2006: Incidência do câncer no Brasil. São Paulo, 2006.

JANEWAY et al. **Imunobiologia: O sistema Imunológico na saúde e na doença**. 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

JAKÓBISIAK, M et al. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol. Letters.*, 90: 103-122, 2003.

KAGAN et al., Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169: 851-57, 1990.

KHONG, H. T. & RESTIFO, N. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.*, 3: 999-1004, 2002.

KIM Y. S. & MILNER, J. Molecular targets for selenium in cancer prevention. *Nutr. Cancer*, 40: 40-4, 2001.

KIM, R., et al. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer biology and therapy*, 4(9): 924-933, 2005.

KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L et al. Selenium and immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and productions of interleukin1 and interleukin 2. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 193: 136-42, 1990.

KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L et al. Regulation of cellular immune responses by selenium. *Biol. Trace Elem. Res.* 33: 23-35, 1992.

KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L et al. Supplementation with selenium augments the functions of natural killer and lymphokine-activated killer cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 52 (3): 227-39, 1996.

KLEIN, G & KLEIN, E. Conversion of solid neoplasm into ascites tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 63:640-661, 1956.

51. KOOLER et al. Immune response in rats supplemented with selenium. *Clin. Exp. Immunol.*, 63: 570 – 576, 1985.

LOPEZ-VARELA, S. et al. Functional foods and the immune system: a review. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56(3): S29-33, 2002.

LU et al.. Cellular and metabolic effects of triphenylselenonium chloride in mammary cell culture model. *Carcinogenesis*, 16: 513-517, 1995.

LUO, JC et al., Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. *Cancer Res.*, 28: 2652, 1998.

MAJNO, G & JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. *An overview of cell death*. 146: 3-15, 1995.

MALAFA, P.M. et al. Vitamin E inhibits melanoma growth in mice. *Surgery*. 131: 85-91, 2002.

MILNER, J.A. Selenium and transplantable tumor. *J. Agr. Food chem.*, 32: 436-442, 1984.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 1996.

MIYAZONO, K., SUZUKI, H. & IMAMURA, T. Regulation of TGF- $\beta$  signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer sci.*, 94 (3): 230-234, 2003.

MOLDAWER, LL & COPELAND, EM. Proinflammatory cytokines, nutritional support, and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. *Cancer*, 79: 1828-1839, 1997.

MONTENEGRO, MR. & FRANCO M. Patologia: Processos gerais. 4 ed. São Paulo: ed. Atheneu, 1999.

MORALES, J.R et al.. Ehrlich tumor stimulates extramedullary hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. *Exp. Hematol.*, 27: 1757-1767, 1999.

MORIGUCHI, S. et al. The role of vitamin E in T-cell differentiation and the decrease of cellular immunity with aging. *The Journal of Medical Investigation*, 45: 1-8, 1998.

MORIGUCHI, S. & MURAGA, M. Vitamin E and immunity. *Vitamin and Hormones*, 59: 305 – 336, 2000.

NAGATA, S. Fas ligand and immune evasion. *Nat. Med.*, 2: 1306 – 1307, 1996.

NAKAMURA, T. et al. Inhibition of NF-kappa B transcriptional activity by alpha-tocopheryl succinate. *Biofactors*. 7: 21-30, 1998.

NISHIKAWA, et al. Inducible NO synthase inhibits the growth of free tumor cells, but enhances the growth of solid tumors. *Carcinogenesis*, 25 (11): 2101-2105, 2004.

OCHSENBEIN, A.F. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Therapy*, 9: 1043-1055, 2002.

OCHSENBEIN, A.F. Immunological ignorance of solid tumor. *Springer Semin. Immunol.*, 27: 19-35, 2005.

OLAPAKRISHNA, R & GUNDIMEDA, U. Protein kinase C as a molecular target for câncer prevention by selenocompounds. *Nutri. Cancer*, 40:55-63, 2001.

OPPENHEIM, J & FUJIWARA, H. The role of cytokines in câncer. *Cytokine & growth factor reviews*. 3: 279-288,1996.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Câncer. 297, 2006

PAK, R.W., et al. Review of vitamin E and selenium in the prevention of prostate cancer: implications of the selenium and vitamin E chemoprevention trial. *Integrative cancer therapies*, 1 (4): 338- 344, 2002.

PARDOLL, D. M. & TOPALIAN, S.L. The role CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Current opinion in Immunology*, 10:588-594, 1998.



PARHAR, R.S. & LALA, P.K. Prostaflandin e2-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. *J. Leukocyte Biology*, 44:474-484, 1988.

PETRIE et al. Selenium and the immune response: 2. Enhancement of murine cytotoxic T-lymphocyte and natural killer cell cytotoxic in vivo. *J. Leukocyte Biology*, 45: 215-220, 1989.

POGGI, A. & ZOCCHI, M. R. Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 54: 323-333, 2006.

POIRIER, K.A. & MILNER, J. Factors influencing the anticarcinogenic properties of selenium in mice. *J. Nutrition*. 113: 2147-2154, 1983.

QUIN, J. et al. Vitamine E succinate decreases lung cancer tumor growth in mice. *J. Surgical Res.*, 127: 139-143, 2004.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356: 233-241, 2000.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr*, 127 (11): 838-841, 1997.

REID, M. E et al. Selenium supplementation and cancer incidence: An update of the nutritional prevention of cancer trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11: 1285-1291, 2002.

RIMBACH, G. et al. Regulation of cell signaling by vitamin E. *Proc. Nut. Society*, 61: 415-425, 2002.

RUDGE, et al. Control of immune response by immunoregulatory T cells. *Arc. Immunol. Ther. Exp.*, 54: 381-391, 2006.

SAKAGUCHI, S. et al., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chain (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22: 531-562, 2004.

SANDERS, BG & KLINE, K. Nutrition, immunology and cancer: an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 369:185-94, 1995.

SANTOS, H.S. & CRUZ, W.M.S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 47: 2001.

SEGURA, J.A. et al.. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Letters*, 414: 1-6, 1997.

SEGURA, J.A. et al. Ehrlich ascites tumor unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunol. letters*, 74: 111-115, 2000.

SHIMIZU, J. et al. induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.*, 163: 5211-52118, 1999.

SHREIBER, R.D. Câncer vaccines 2004 opening address: the molecular and cellular basis of câncer immunosurveillance and immunoediting. *Cancer Immunity*, 5, supl.1 :1-8, 2005.

SINHA et al., Organic and inorganic selenium compounds inhibits mouse mammary cell growth in vitro by different cellular pathways. *Cancer letters*, 107: 277-284, 1996.

SONN, G.A. et al. Impact of diet on prostate cancer: a review. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 1-7, 2005.

SMYTH, M.J. et al.. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.*, 2: 293-299, 2001.

SPIOTTO, M.T. et al. Tumor immunity meets autoimmunity: antigen levels and dendritic cell maturation. *Current opinion in immunology*, 15:725-730, 2003.

TAKEDA, K. & OKUMURA, O. CAM and NK cells. *Oxford University Press*. 1: 1-27, 2004.

TAYLOR, et al. In vivo culture of T cell lines and clones lymphocytes. *A practical approach*, Washington, IRL press: 133- 147, 1987.

TAPIERO, H et al.. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57: 134-144, 2003.

TERABE, M. & BERZOFISKY, J.A. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Current opinion in immunology*, 16:157-162, 2004.

THOMPSON, H. J. Selenium as an anticarcinogen. *J. agric. Food chem.*, 32: 422-425, 1984.

TRICHOPOULOS, D. et al. Get you need to know about cancer. *Scientific American*, 275(3): 50-57, 1996.

WAKIKAWA, A. et al. Vitamine enhances the immune functions of young but not old mice under restraint stress. *Experimental Gerontology*, 34: 853-862, 1999.

WHANGER, P.D. Selenium interactions with carcinogens. *Fundam. Appl. Toxicol*, 3: 424-30, 1983.

VIAL T. & DESCOTES J. Clinical toxicity of cytokines used as haemopoietic growth factors. *Drug safety*, 13: 371-406, 1995.

WHANGER, P.D. Selenium and its relationship to cancer: an update. *British journal of nutrition*, 91: 11-28, 2004.

XU et al. The role nitric oxide in cancer. *Cell Research*, 12:311-320, 2002.

ZELCO, I. N . et al. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radical Biol. Med.*, 33:337-49, 2002.

ZIEGLER,S.F et al. The mouse CD69 gene: structure, expression and mapping to the NK gene complex. *Journal of immunology*, 152: 1228-1236, 1994.

ZIEGLER, S.F. et al. The activation antigen CD69. *Stem cells*, 12(5): 456-65, 1994.

## **9. ANEXOS**

### **9.1 Aprovação do projeto pelo comitê de ética da UFMG**

O projeto dessa dissertação foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental da UFMG (CETEA), com o número de protocolo 026/06.