

Fernanda Lopes Kinouchi

**“logurte” de soja como coadjuvante no
tratamento de câncer de mama.**

Trabalho apresentado para obtenção do título
de Doutor em Análises Clínicas na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
UNESP

Orientadora: Prof^a. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Co-orientador: Prof^o. Dr. Elizeu Antônio Rossi

Araraquara

2006

Comissão Examinadora

Profª Dra Iracilda Zeppone Carlos

Orientadora

Profª Dra. Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira

Membro titular

Profª Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis

Membro titular

Profª Dra. Beatriz Maria Machado Medeiros

Membro titular

Profª Dra. Christiane Pienna Soares

Membro titular

Araraquara, 1 de novembro de 2006

Dedicatória

Hélvio, Unice, Cristiana, Ciça, Américo, Rui, André, Fernanda, Léo, Tia
Lêda, Vô Meco, Dona Pércia e Sr. Kiyoshi

Vocês são as pessoas que alegram a minha vida.

Agradecimentos

À prof^ª Dra Iracilda Zeppone Carlos pela orientação incansável e amizade desenvolvida nestes anos de trabalho.

À amiga Mariza Campos Polesi Placeres pelos ensinamentos e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof^º Dr. Elizeu Antônio Rossi pela orientação e amizade.

À querida amiga Roseli Aparecida Pinto pelas inúmeras preparações dos produtos de soja.

À Danielle Cardoso Geraldo Maia pela amizade e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

À prof^ª Dra Cleni Mara Marzocchi Machado pela amizade e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas Micheli Fernanda Sassá, Michelle Corrêa da Rocha, Fernanda Paulin Benzatte, Sandra Regina Ananias, Alessandra Stevanato, Flávia Cristine Mascia Lopes, Márcia Faria Marques, Ana Carolina Urbaczek pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos José Antônio Sampaio Zuanon e Carina Antunes pela colaboração no desenvolvimento da técnica de angiogênese.

Ao prof^º Dr. Paulo Inácio da Costa responsável do setor de Imunologia, do Centro de Referência Diagnóstica da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia, por ceder o equipamento e material para a realização da determinação de estradiol.

À amiga Maria Eugênia Marques Coelho da Silva pela realização da determinação de estradiol.

Aos professores Dra Beatriz Maria Machado Medeiros, Dra Christiane Pienna Soares, Dra Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira e Dra Elaine Cristina Pereira de Martinis pelas correções e sugestões deste trabalho.

À Natalina Lambrini Escremin pela revisão das referências bibliográficas.

Às amigas Cláudia Lúcia Molina, Sônia Ornelas e Laura Rossin pela atenção durante os anos de mestrado e doutorado.

Ao Marcos Aparecido Dangona pela amizade e ajuda nos cuidados com os animais.

À minha querida amiga Rita.

Obrigada

Lista de abreviaturas

BSA	Soro albumina bovina
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
Con A	Concanavalina A
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
HE	Hematoxina e eosina
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeo
NaNO ₂	Nitrito de sódio
ng	Nanogramas
NK	Natural Killer
nmols	Nanomols
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina tamponada de fosfatos
pg	Picogramas
g	Gravidade
SD	Desvio padrão
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Th	Linfócito T helper
UV	Ultra-violeta
μ mols	Micromols

Sumário

Lista de Figuras	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
I. Introdução	1
1. Soja	2
2. Fermentados	5
3. Sistema Imune	7
4. Neoplasia	9
II. Objetivos	12
III. Materiais e Métodos	13
1. Dietas	13
1.1. Preparo e obtenção do produto de soja fermentado	13
1.2. Preparo e obtenção do produto de soja não fermentado	13
1.3. Suplementação com isoflavonas	14
2. Animais	14
3. Grupos de estudo	14
4. Implante de células tumorais	15
5. Determinação da porcentagem de aparecimento do tumor	16
6. Determinação do volume do tumor	16
7. Obtenção do soro	16
8. Obtenção das células do exudato peritonial	16
9. Cultura de macrófagos	17
10. Obtenção das células esplênicas	18
11. Obtenção do sobrenadante das células esplênicas	19
12. Determinação da liberação de óxido nítrico	19
13. Determinação de citocinas	20
14. Determinação de angiogênese	21
15. Análise histológica dos tumores	22
16. Determinação da concentração sérica de estradiol	23
17. Detecção de apoptose e necrose	23
18. Análise dos resultados	24
IV. Resultados	25
V. Discussão	54
VI. Conclusões	70
VII. Referências Bibliográficas	71
VIII. Apêndice	81

Índice de figuras

Figura 1. Isoflavonas	2
Figura 2. Estradiol e Isoflavona	3
Figura 3. Porcentagem de desenvolvimento do tumor	26
Figura 4. Média dos volumes dos tumores	27
Figura 5. Produção de NO por macrófagos	29
Figura 6. Concentração de IL-1 β	31
Figura 7. Concentração de TNF- α	33
Figura 8. Concentração de IL-6	35
Figura 9. .Concentração de IL-12	37
Figura 10. Concentração de IL-10	39
Figura 11. Concentração de IFN- γ	41
Figura 12. Padronização da técnica de imunohistoquímica	43
Figura 13. Mitose no tecido do tumor	46
Figura 14. Desenvolvimento de vasos sanguíneos em tecidos corados em HE	47
Figura 15. Média de vasos sanguíneos	48
Figura 16. Concentração de estradiol no soro dos animais	50
Figura 17. Apoptose e Necrose em macrófagos	52
Figura 18. Fotomicroscopia da necrose e apoptose	53

RESUMO

O crescimento da demanda por alimentos saudáveis está estimulando a inovação e o desenvolvimento de novos produtos na indústria alimentícia. Os alimentos saudáveis são chamados de alimentos funcionais, que são alimentos consumidos como parte de uma dieta usual que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos, com capacidade de reduzir o risco de doenças crônicas – degenerativas, além de suas funções nutricionais básicas. Entre os alimentos funcionais, o presente estudo destaca os produtos derivados da soja e os probióticos. As isoflavonas da soja parecem ser os componentes principais no combate ao câncer, por apresentarem, atividade antioxidante, aumento da apoptose, inibição da angiogênese e modulação da resposta imune. O produto fermentado por bactérias lácticas, induz resposta imune inata e adaptativa. Os mecanismos pelos quais o produto fermentado pode inibir o crescimento do tumor são diminuição da resposta inflamatória induzida pelo carcinógeno, aumento da IgA, aumento da apoptose celular e aumento da taxa de TNF- α . Considerando o efeito benéfico dos fitoestrogênios da soja em relação à inibição do câncer e considerando, também, o fato de que determinadas bactérias lácticas apresentam atividade anti-tumoral, parece-nos plenamente justificável a realização do estudo para verificar se os alimentos: produto de soja não fermentado (PSNF); “iogurte” de soja (IS) e “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas (ISS), e Ração (R) exercem efeito no desenvolvimento do câncer de mama e verificar os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α , bem como a concentração de óxido nítrico liberado por macrófagos, e IFN- γ em cultura de células esplênicas, indução da apoptose/necrose em macrófagos e angiogêneses no tumor. Todos os produtos pesquisados apresentaram atividade no sistema imunológico, mais foi o “iogurte” de soja o mais eficiente para a contenção do tumor, possivelmente devido à modulação positiva do sistema imune frente à fermentação somada às propriedades da soja. Os animais que consumiram o produto fermentado de soja (IS) apresentaram menor volume tumoral, como se observa IS<PSNF<ISS<R. Os animais do grupo “iogurte” de soja suplementado expressaram maior quantidade de NO, IL-1 β e maiores volumes tumorais em relação aos grupos IS e PSNF. A suplementação com isoflavonas parece ter exercido atividade estrogênica e contribuído no início do desenvolvimento tumoral. O produto IS induziu mais apoptose e menos necrose em macrófagos, quando comparados aos outros grupos, o que pode ter contribuído para o controle do processo inflamatório. O “iogurte” de soja foi o alimento mais eficiente para a contenção do tumor, controlou os níveis de NO, IL-1 β , e IL-6, diminuindo o processo inflamatório; elevou as concentrações de IL-12, IL-10, TNF- α e IFN- γ ; induziu mais apoptose e menos necrose em macrófagos e inibiu a angiogênese. Os animais do grupo que consumiu “iogurte” de soja suplementado expressaram maior quantidade de NO, IL-1 β e IL-6, aumentaram a angiogênese e o volume do tumor foi maior quando comparado ao grupo IS.

Palavras-chave: soja; isoflavonas; fermentados, citocinas, apoptose e câncer.

ABSTRACT

The growing demand for healthy foods is encouraging the development of new products by the food industry. Functional foods are normally part of a regular diet, but besides their nutritional properties, they also elicit metabolic and physiologic responses that may reduce the risk of chronic degenerative diseases. This study focuses on probiotics and soy-derived products. Soy isoflavones seem to play the most important role in the fight against cancer because, besides their anti-oxidant effects, they stimulate apoptosis, inhibit angiogenesis and modulate the immune response. Probiotics may inhibit tumor growth by diminishing the inflammatory response provoked by the carcinogen and by increasing apoptosis and TNF- α and IgA levels. Considering the beneficial effects of soy phytoestrogens on cancer and the fact that some lactic bacteria have antitumor activity, it seems reasonable to carry out a study that analyzes whether non-fermented soy product (PSNF), soy “yoghurt” (IS), soy “yoghurt” supplemented with isoflavones (ISS) and regular feed (R) have an effect on the development of breast cancer by assessing: 1. levels of IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α and nitric oxide (NO) produced by macrophages; 2. levels of IL-10 and IFN- γ in spleen cell cultures; 3. induction of apoptosis/necrosis in macrophages; and 4. tumor angiogenesis. All three soy-based products had an effect on the immune system; however, soy “yoghurt” was the most effective to prevent tumor growth possibly because of the positive modulation of the immune system in response to fermentation combined with soy properties. Animals fed with IS presented with smaller tumors, as shown by IS<PSNF<ISS<R. Animals fed with ISS presented higher levels of NO, IL-1 β e IL-6, and increased levels of angiogenesis. Isoflavones presented estrogenic effects, stimulating the early steps of tumor growth. Soy “yoghurt” was the most effective to suppress tumor growth; it increased levels of IL-12, IL-10, TNF- α and IFN- γ , inhibited angiogenesis and controlled the levels of NO, IL-1 β , e IL-6, reducing the inflammatory process.

Key words: soy; isoflavones; fermented, cytokines, apoptosis and cancer.

I. Introdução

Desde a década de 60 tem sido observada uma mudança no padrão alimentar da população brasileira: vem ocorrendo uma diminuição no consumo de cereais e tubérculos e um aumento no consumo de lipídios e proteína de origem animal. O predomínio desta dieta, associada ao sedentarismo da vida moderna, está relacionado com o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, tais como câncer e doenças do coração (MONTEIRO et al., 2000).

A dieta com alto consumo de vegetais, frutas, leguminosas, produto fermentado e baixo consumo de gordura saturada e carne vermelha está associada ao maior tempo de vida livre de doenças (ADLERCREUTZ e MAZUR, 1997; KELLOFF et al., 2000; ERIKSON e HUBBARD, 2000).

O crescimento da demanda por alimentos saudáveis está estimulando a inovação e o desenvolvimento de novos produtos na indústria alimentícia (SAARELA et al., 2000). Os alimentos saudáveis são chamados de alimentos funcionais e são definidos, segundo a portaria (Port. MS nº 398, de 30/04/1999) publicada pelo Ministério da Saúde, como sendo “os alimentos consumidos como parte de uma dieta usual, que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos e/ou com capacidade de reduzirem o risco de doenças crônico – degenerativas, além de suas funções nutricionais básicas”.

Os alimentos funcionais apresentam substâncias bioativas que são capazes de modular a fisiologia do organismo, garantindo a manutenção da saúde (ROSSI, 2001).

Entre os alimentos funcionais, o presente estudo destaca os alimentos derivados da soja e os produtos fermentados.

1. Soja

O consumo de alimentos derivados da soja está relacionado com a diminuição de 50% dos riscos de câncer de mama, câncer de próstata e doenças do coração (MESSINA, 1999).

A soja vem sendo muito estudada devido ao seu potencial na prevenção e no tratamento de doenças crônicas, pois contém muitos componentes ativos, mas são as isoflavonas que estão despertando maior interesse entre os cientistas, pois estudos indicam que elas apresentam maior atividade fisiológica em relação aos outros componentes ativos (THAN, 1998; MESSINA, 1999).

A soja é rica em isoflavonas, encontrada principalmente nas formas glicosídeos (genistina e daidzina), em torno de 98%, e raramente nas formas agliconas (genistéina e daidzeína) somente 2% (ANDERSON, 1995). As isoflavonas glicosídeos (IFG) são transformadas em isoflavonas agliconas (IFA) no intestino grosso, através da ação das bactérias da flora intestinal (IZUMI, 2000).

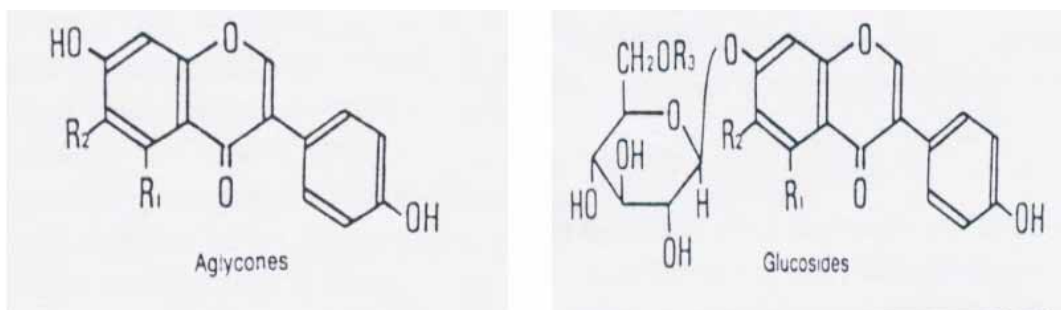


Figura 1 – Isoflavonas: agliconas e glicosídeos (Fonte: Barnes, 1998).

As isoflavonas são compostos polifenólicos, conhecidos por sua ação antioxidante, devido ao hidrogênio, do grupo OH, ser facilmente removível, combinando com os radicais livres (RUIZ-LARRE, 1997). Os radicais livres são responsáveis por danos às células e aos tecidos e estão envolvidos no processo de doenças como o câncer e doenças do coração (THAM,1998). Dietas ricas em isoflavonas da soja têm efeito quimiopreventivo; a natureza aromática do polifenol é marcada por um potencial de ligação à composto oxidante, pró-inflamatório, tal como peroxinitrito (ONO_2^-), produzido por neutrófilos e macrófagos; a genisteína pode se ligar aos compostos oxidantes, produzidos no ambiente inflamatório e ao redor do tumor (D´ALESSANDRO, 2003).

As isoflavonas têm estrutura química semelhante ao estrogênio endógeno, 17β estradiol (Figura 2), e têm maior afinidade com os receptores de estrogênio, α e β ; têm atividade estrogênica fraca, da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} em relação ao estrogênio endógeno. Têm ação estrogênica, quando a taxa de estrogênio endógeno estiver baixa, como na menopausa, e podem ter ação antiestrogênica quando a taxa de estrogênio estiver alta (BARNES, 1998). A genisteína tem maior afinidade com o receptor de estrogênio β ($\text{ER}\beta$), do que com o receptor de estrogênio α ($\text{RE}\alpha$), o $\text{RE}\beta$ está envolvido com a inibição da proliferação celular, enquanto que, o $\text{RE}\alpha$ induz a atividade estrogênica (KUIPER, 1998; BENASSAYAG, 2002).

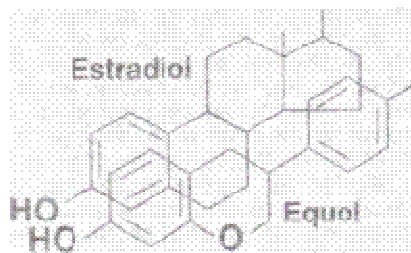


Figura 2: Estradiol e Isoflavona equol, metabólito da daidzeína (Fonte: Barnes, 1998).

Para obter esta modulação fisiológica é necessário manter o nível de isoflavonas no sangue e este nível tem de ser maior que a taxa do estrogênio endógeno (MESSINA, 1999).

As isoflavonas, genisteína, daidzeína e equol, parecem ser os componentes principais da soja no combate ao câncer, por apresentarem: 1) atividade antioxidante; 2) inibição das enzimas, tirosina quinase e DNA topoisomerase II, envolvidas no controle do crescimento celular; 3) aumento da síntese do hormônio sexual ligado à globulina (SHBG) e com isso diminuição da quantidade de estrogênio ativo (THAM, 1998); 4) afinidade com os receptores de estrogênio α e β , que estão distribuídos na mama, na próstata, no útero e no ovário (BARNES, 1998); 5) inibição da angiogênese (FOTSIS, 1993; YIHAI, 2002); 6) aumento da apoptose (ZHOU et al., 1998). Tais propriedades são relevantes na prevenção e no tratamento do câncer.

Reconhecendo os benefícios da soja, o órgão americano FDA (*Food and Drugs Administration*) aprovou como “*health claim*” (alegação de saúde), o consumo de 25g de proteína de soja por dia, juntamente com a diminuição da ingestão de gordura saturada e colesterol, para reduzir o risco de doenças do coração.. A população oriental apresenta menor incidência de câncer de mama quando comparada com a população ocidental. Estima-se que o consumo de soja, pelos orientais, seja de 20 a 50 g/dia, enquanto que entre os ocidentais é de 1g/dia (MESSINA, 1999).

Mulheres japonesas têm de 29-30% menor quantidade de estrogênio no plasma sanguíneo e com isso apresentam o ciclo menstrual mais longo, de 32 dias, enquanto que em mulheres ocidentais o ciclo menstrual é de 28 dias (SETCHELL, 1999) e o prolongamento do ciclo menstrual diminui o risco de câncer de mama (HENDERSON, 1991).

O estrogênio tende a promover a divisão celular (mitose), particularmente em tecidos sensíveis ao hormônio, como o da mama e do útero. O risco de câncer de mama pode ser reduzido com a menor exposição a este hormônio (KEY, 1988).

2. Produtos Fermentados

Há milhares de anos se reconhece os efeitos benéficos dos produtos fermentados; Abraão atribuiu sua fecundidade e longevidade à ingestão de fermentado; no início do ano de 1500, o rei da França Francis I atribuiu à cura da sua debilidade intestinal ao consumo de leite fermentado (WATER et al, 1999). O interesse científico pelos fermentados surgiu a partir da publicação do livro de Eli Metchnikoff, “*The prolongation of life*” (1921), no qual o autor associa um adequado estado de saúde com a implantação, no trato gastrintestinal, de determinadas bactérias lácticas, provenientes dos produtos fermentados; Metchnikoff propôs que o ácido láctico, produzido pelas bactérias, proporcionaria um meio desfavorável às bactérias patogênicas. Metchnikoff experimentou em si mesmo e associou a sua saúde a ingestão regular de leite fermentado com *Lactobacillus bulgaricus*.

Algumas bactérias lácticas constituem uma subdivisão do grupo conhecido por bactérias probióticas que, consumidas em números elevados, têm as propriedades de: repor a microbiota intestinal (FERREIRA, 2003), aumentar a absorção de minerais, aumentar a resposta imune e diminuir o colesterol sérico (GILLILAND, 1979; MEYDANI e KIU HA, 2000).

Para poderem ser definidos como probióticos, os microorganismos devem possuir as seguintes características: 1) serem habitantes do trato intestinal do

hospedeiro; 2) resistirem às condições adversas do trato intestinal; 3) exercerem efeito benéfico ao hospedeiro; 4) estarem viáveis nos alimentos (GILLILAND, 1979).

Ericson e Hubbard (2000), revisaram a função dos probióticos na imunomodulação e concluíram que, os probióticos possuem influências favoráveis nos processos fisiológicos e patológicos do hospedeiro por seu efeito na microbiota intestinal e podem agir na promoção da saúde humana. Os probióticos modulam a imunidade inata e adaptativa. Para os autores, a estimulação da imunidade adaptativa e inata deve resultar na produção de citocinas, e sua determinação é um importante indicador da resposta imune.

Perdigon et al., em 1990, mostraram que a ativação de macrófagos e linfócitos de camundongos foi muito maior nos animais que receberam produtos fermentados com *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus* ou ambos, em comparação com os animais que receberam o produto não fermentado.

O consumo de leite fermentado com *Lactobacillus helveticus*, por camundongos Balb/c, modulou a resposta imune celular, aumentando a fagocitose de macrófagos (LEBLANC, J.G., 2002) e aumentou quantidade das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 e diminuiu a IL-6, no soro dos animais (LEBLANC, A., 2005).

Segundo Perdigon et al. (2001), os mecanismos pelos quais os produtos fermentados podem inibir o crescimento do tumor são devidos a uma diminuição da resposta inflamatória induzida pelo carcinógeno, aumento da apoptose das células tumorais e aumento da taxa de TNF- α .

Estudos epidemiológicos têm verificado que o consumo de alimento fermentado está relacionado com a diminuição de câncer. Assim LeMonique (1998) pesquisou, na França, mulheres com câncer de mama e mulheres saudáveis, e encontraram associação

positiva entre o consumo de gordura e o risco de câncer de mama e associação negativa entre o uso freqüente de iogurte e risco da doença.

Até o momento não se têm evidências diretas de que as bactérias lácticas possam inibir a carcinogênese em humanos, mas os estudos realizados em modelos experimentais sugerem que elas podem influenciar os mecanismos ligados à carcinogênese, diminuindo o pH do lúmen intestinal e ativando o sistema imunológico (WOLLOWSHI, 1999; MEYDANI, 2000). Para que estes efeitos benéficos ocorram é necessária uma adaptação do metabolismo corporal em consequência do consumo diário de iogurte (WATER et al., 1999).

3. Sistema Imune

O sistema imunológico é um notável sistema de adaptação que evoluiu nos vertebrados para protegê-los de microorganismos patogênicos, sendo capaz de gerar células e moléculas que podem eliminar agentes invasores e células alteradas geneticamente. As células e moléculas do sistema imunológico agem em conjunto, proporcionando uma rede primorosamente adaptável (MEYDANI e KIU HA, 2000).

O sistema imune da mucosa intestinal é formado pelas placas de Peyer, lâmina própria e parede intestinal, enquanto que os linfonodos dispersos pelo organismo e o baço representam o compartimento imune sistêmico. A parede intestinal contém macrófagos e linfócitos (células T e B) em íntimo contato com os alimentos no processo de absorção (PESTKA, 1993). Os macrófagos migram do peritônio para os linfonodos, aumentando a capacidade de responder a microrganismos invasores, como uma consequência da administração de bactérias lácticas (BELLIGAN, 1996).

Os macrófagos constituem a segunda maior população celular do sistema imune, são ativados por uma série de estímulos e suas principais funções são: a fagocitose de partículas estranhas, a apresentação de antígenos e produção de citocinas e compostos intermediários de nitrogênio (NO) e de oxigênio (H_2O_2), portanto os macrófagos participam tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa (JANEWAY, 1997).

Tanto a imunidade inata quanto a adaptativa possuem mecanismos que podem participar da resistência tumoral. Na imunidade inata, os macrófagos ativados, produzem as citocinas IL-1 (mediador da resposta inflamatória), IL-12 (estimula a produção de IFN- γ pelas células T e NK), e TNF- α , que se liga aos receptores da célula tumoral, ativando uma via de sinalização que resulta em apoptose da célula tumoral (ABBAS et al., 2003). O TNF- α , que é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, atua no início da resposta imune regulando a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória, está envolvido em eventos locais e sistêmicos (MARKHATADZE, 1998). A maior fonte de TNF- α provém de fagócitos mononucleares ativados. O IFN- γ , produzido por células T e NK, aumenta a síntese de TNF- α por macrófagos estimulados com LPS, atuando nos fagócitos mononucleares, para estimular a secreção de IL-1, que por sua vez possui atividade complementar ao TNF- α (ABBAS et al., 2000).

A produção de IL-1 por fagócitos mononucleares é induzida por produtos bacterianos como o LPS e por outras citocinas como o TNF- α . Diferente do TNF- α , a IL-1 também é produzida por muitos outros tipos celulares, como os neutrófilos, células epiteliais (por exemplo, queratinócitos) e células endoteliais. Os efeitos biológicos da IL-1 são similares aos do TNF- α e dependem da quantidade de citocina produzida (ABBAS et al., 2000).

Pode-se perceber claramente que as citocinas participam de uma imensa rede dentro do sistema imunológico, onde vão interagindo com certas células, que ao liberarem outros mediadores ou citocinas, podem atuar sobre as primeiras células ou mesmo em células diferentes.

Em trabalhos anteriores por nós realizados, foram avaliadas as propriedades funcionais do produto fermentado de soja utilizando *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti*, como sendo hipocolesterolêmico (ROSSI et al., 1999) e não alergênico (CARLOS et al., 2000). Vendramini (2002) demonstrou que houve um aumento dos níveis de IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ liberados por macrófagos de camundongos, que consumiram produto de soja fermentado e produto de soja não fermentado.

4. Neoplasia

Neoplasia é definida como uma massa anormal de tecido cujo crescimento está desordenado, apresenta certo grau de autonomia e aumenta de tamanho, de forma mais ou menos constante, em uma determinada extensão sua autonomia não é completa e depende criticamente do hospedeiro para sua nutrição e suprimento sanguíneo (KUMAR et al., 1994).

A angiogênese ou neovascularização é um processo biológico em que novos vasos sanguíneos originam-se por brotamento ou germinação de vasos pré-existentes, está envolvida em processo fisiológico como no ciclo reprodutivo e em processo patológico como crescimento de tumor e metástase (KUMAR, 1994).

As células tumorais liberam moléculas angiogênicas, tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), descoberto em 1989, que é responsável pelo

aumento da permeabilidade vascular, iniciando a angiogênese. Esse fator, juntamente com a atividade do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), mantém a angiogênese (KERBEL, 2000).

É evidente que para haver angiogênese se faz necessário uma organizada interação entre as células endoteliais e a matriz extracelular, portanto é importante abordar a ação das integrinas e as caderinas. As integrinas são necessárias para a remodelação vascular, intervindo na adesão e migração das células endoteliais, se ligam a componentes da matriz extracelular e são expressas por estas células quando elas estão sujeitas às concentrações significativas de FGF e VEGF. As caderinas, são proteínas transmembranas, que promovem a interação das células com o meio extracelular, estabilizando a organização das células endoteliais no vaso, controlando a proliferação e com isso possibilitando sua sobrevivência (PAPETTI e HERMEN, 2002).

A supressão da angiogênese anormal é uma estratégia terapêutica importante no tratamento do câncer (YIHAI et al., 2002). Outra estratégia é a apoptose, um dos principais processos de supressão do câncer (LOWE, 2002). A apoptose ou morte celular programada tem um papel importante para a evolução embrionária adequada, bem como para a manutenção da homeostasia em tecidos adultos, eliminando células desnecessárias ou lesadas sem a indução de um processo inflamatório (GREEN, 2003).

A apoptose é caracterizada por uma série de eventos morfológicos, como redução do tamanho da célula, condensação nuclear, segregação da cromatina, brotamento da membrana, fragmentação em corpos apoptóticos, seguida de rápida fagocitose pelas células vizinhas (SARASTE, 2000). Apoptose e necrose são dois processos de morte que podem ser distinguidos através de análises bioquímicas e morfológicas das células. A necrose ocorre quando a célula não é capaz de manter a

homeostasia, produzindo estímulos e resposta inflamatória devido à liberação de componentes intracelulares. Esse processo é metabolicamente passivo e caracterizado pelo intumescimento celular, digestão aleatória do DNA, cariólise e perda da integridade da membrana, resultando em lise celular (SARASTE, 2000).

O aumento da apoptose e a diminuição da angiogênese são estratégias terapêuticas no combate às células cancerosas.

Considerando o efeito benéfico da soja em relação à inibição do câncer e considerando, também, o fato de que determinadas bactérias lácticas apresentam atividade anti-tumorais, pretendemos verificar como os produtos: produto de soja não fermentado; “iogurte” de soja e “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas, ambos exercem efeito no desenvolvimento do câncer de mama.

II. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar o efeito da ingestão diária do produto de soja não fermentado, do “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 com ou sem enriquecimento de isoflavonas, sobre o desenvolvimento do tumor de mama murino.

Objetivos específicos

- 1) Acompanhar o desenvolvimento do tumor, verificando a influência da administração de diferentes dietas;
- 2) Avaliar a estimulação das células macrofágicas, através da liberação óxido nítrico como mediador participante do processo imunológico/cancerígeno;
- 3) Determinar a influência das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ no desenvolvimento neoplásico;
- 4) Avaliar parâmetros histológicos, como morfologia celular e arquitetura tecidual para caracterizar a proliferação celular em tecidos tumorais e desenvolvimento de vasos sanguíneos no local do tumor;
- 5) Determinar as concentrações de estradiol, no soro dos animais e verificar a influência das dietas na concentração de estradiol;
- 6) Verificar a presença de apoptose e necrose em macrófagos.

III. Materiais e Métodos

1. Dietas

O material foi constituído por amostras de “iogurte” de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 e suplementado com isoflavonas, e amostra de produto de soja não fermentado. As dietas foram preparadas semanalmente e mantidas sob refrigeração.

1. 2. Preparo e obtenção do produto de soja fermentado (“iogurte”)

Produzido a partir do “leite” de soja, de acordo com metodologia de Rossi (2000), sendo utilizado os cultivos de *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416.

O produto fermentado foi resfriado gradualmente e transferido à temperatura de refrigeração.

1. 3. Preparo e obtenção do produto de soja não fermentado

O produto de soja não fermentado foi obtido utilizando-se a mesma metodologia empregada na produção do produto fermentado, excluindo-se apenas as etapas de inoculação e fermentação. A acidificação do produto foi alcançada com a adição direta de ácido láctico em quantidade suficiente para que o pH atingisse o valor entre 4,3 - 4,5. Finalmente, o produto foi mantido em refrigeração durante todo o período de utilização.

1. 4. Suplementação com isoflavonas

O produto suplementado foi obtido partindo-se do “iogurte” de soja acrescido de 1,125g de isoflavin® (Galena) por litro de iogurte.

Os produtos fermentados, suplementados e não suplementados foram submetidos a uma contagem de células viáveis, empregando-se os meios específicos para cocos (M-17 agar, Difco) e para bacilos (MRS agar, Difco). Foi realizada a contagem do número de células viáveis de *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 no preparo de diferentes lotes do produto fermentado (Tabelas 1 e 2). Os valores estão dentro dos limites para que o produto seja considerado um probiótico (GONZALES et al. 1990).

2. Animais

Fêmeas de camundongo Balb/c, pesando entre 18-25g, procedentes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP, São Paulo. Estes animais foram mantidos em gaiolas em grupos de 5, com condições estáveis de ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar) e ciclos de 12 horas com e sem luz. Os animais receberam água e ração (Purina) esterilizadas, *ad libitum*. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Todos os procedimentos realizados nesse trabalho apresentaram parecer favorável pelo Comitê de Ética local (parecer nº 27/2003).

3. Grupos de estudo

Os animais foram distribuídos em grupos:

Grupo Produto de Soja Não Fermentado (PSNF) – recebeu, por gavagem, 1mL/dia do produto de soja não fermentado e foram implantadas as células tumorais;

Grupo “Iogurte” de Soja (IS) – recebeu, por gavagem, 1mL/dia o produto fermentado e foram implantadas as células tumorais;

Grupo “Iogurte” de Soja Suplementado com isoflavonas (ISS) – recebeu, por gavagem, 1mL/dia o produto fermentado enriquecido com isoflavonas e foram implantadas as células tumorais;

Grupo Ração (R) – recebeu o mesmo tratamento estressivo, simulando a gavagem, e foram implantadas as células tumorais;

Grupo Controle (C) - recebeu somente água e ração e não foram implantadas as células tumorais.

As fêmeas de camundongos Balb/c dos grupos PSNF, IS, ISS receberam as diferentes dietas por gavagem, 1 mL/dia, durante 10 dias, antes do implante de células tumorais. As dietas continuaram até o sacrifício dos animais.

4. Implante de células tumorais

A linhagem tumoral de adenocarcinoma murino LM3, foi gentilmente cedida pela Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, do Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina. Esta linhagem celular foi obtida de subculturas primárias de adenocarcinoma murino de células mamárias de fêmeas de camundongo Balb/c. A linhagem tumoral de adenocarcinoma murino LM3 foi mantida em cultura através de repiques, três vezes por semana, em meio MEM (Minimum Essential Médium, Gibco), acrescentando-se 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma). A suspensão celular foi ajustada a 5×10^5 células/mL e foram inoculados 250 μ L subcutaneamente no lado direito do abdome.

5. Determinação da porcentagem de aparecimento dos tumores

O desenvolvimento do tumor foi verificado em 10 ± 2 dias, após a inoculação das células tumorais, sendo, a partir desse momento, observado diariamente e anotado o aparecimento do tumor, em cada animal pertencente aos diferentes grupos de estudo. As dietas foram mantidas por mais duas semanas até o sacrifício dos animais.

6. Determinação do volume tumoral (ZHOU et al.,1998)

Após o sacrifício, os tumores foram retirados e medidos em seu comprimento, altura e largura utilizando paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper . O volume do tumor foi calculado pela fórmula:

$$\text{cm}^3 = 0,523 \times \text{comprimento (cm)} \times \text{largura (cm)} \times \text{altura (cm)}.$$

7. Obtenção do soro

Após o sacrifício dos animais, o sangue do coração foi retirado rapidamente através de punção cardíaca utilizando seringa de 1mL. O conteúdo foi dispensado em tubo tipo “*eppendorf*” de 1,5 mL; foi incubado por 20-30 minutos em estufa a 37°C, e após retração do coágulo o soro foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 500g em centrífuga refrigerada (Hettich Universal 32R Alemanha). O sobrenadante foi retirado com micropipeta e dispensado em tubo tipo “*eppendorf*” para a determinação de estradiol.

8. Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio (Difco Lab. Ltda) a 3,0%, três dias antes de serem eutanasiados através da câmara de CO₂. Estes animais tiveram a pele da região

abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco) e o peritônio exposto. Posteriormente, foram inoculados 5,0 mL de solução salina tamponada com sais de fosfato (PBS), pH 7,2 gelado na cavidade abdominal. O líquido peritonial resultante foi coletado com seringa e agulha, transferido para um tubo cônico estéril com capacidade de 15,0 mL (Corning, Inc.) e centrifugado a 400g durante 5 min (Centrífuga Fanem) e o sedimento celular lavado três vezes com 3,0 mL de PBS. Após a última lavagem as células foram ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol (Sigma) a 2×10^{-5} M, penicilina 100 U/mL (Sigma), estreptomicina 100 U/mL (Sigma), L-glutamina 2mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cutilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 Completo (RPMI-1640-C) para a contagem de células. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Germany) e a suspensão celular ajustada à concentração de 5×10^6 células para realização dos testes propostos.

9. Culturas de macrófagos

As células obtidas do exsudato peritoneal foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado 1,0 mL dessa suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 min em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100). Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640-C.

Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640-C e LPS (lipopolissacarídeos) a 10 µg/mL, como controle

positivo ou somente RPMI-1640-C como controle de células. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100) por mais 24 h.

Após esta incubação, os sobrenadantes obtidos das placas de culturas foram centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich Universal 32R Alemanha) a 4°C, durante 10 min a 7.800 g. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados e estocados em freezer a -80°C até o momento da determinação das citocinas e NO.

10. Obtenção das células esplênicas

Os animais foram sacrificados na câmara de CO₂ e, em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco), tiveram a pele da região abdominal retirada e o peritônio aberto para a extração do baço, que foi realizado com auxílio de pinça de metal. O baço foi pinçado em placa de Petri estéril contendo 3,0mL de meio RPMI-1640-C (Sigma). O conteúdo da placa foi aspirado por seringa e agulha para obtenção de suspensão celular homogênea.

Após este procedimento as células foram transferidas para tubo cônico estéril (Corning, Inc.) de 15,0 mL e centrifugadas em RPMI-1640-C três vezes a 400 g por 5 min (Centrífuga Fanem). As células sedimentadas foram novamente ressuspensas em 1,0 mL de meio RPMI-1640-C e a contagem do número de células viáveis foi feita em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) através da técnica de exclusão com Azul de Trypan a 0,04%. Após a contagem, as suspensões celulares foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL.

11. Obtenção do sobrenadante das células esplênicas

A suspensão celular contendo as células esplênicas foi ajustada a 5×10^6 células/mL, obtidas como descrito no item anterior, distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc), 1,0 mL por cavidade e acrescentadas de 34 μ L do estímulo (concanavalina A – ConA – na concentração de 0,5 μ g/mL) ou somente meio de cultura nos controles de células. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100) por 24 h. Após esta incubação, o sobrenadante foi recolhido e colocado em tubo tipo *ependorf* e centrifugados em centrífuga refrigerada Hettich Universal 32R (Alemanha) a 4°C durante 10 min a 7.800 g. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados e estocados a –80°C para posterior dosagem de IFN- γ e IL-10.

12. Determinação da liberação de óxido nítrico (NO)

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células através da reação de diazotização com o reagente de Griess [composto de 1g de sulfanilamida, (Merck), 0,1g de dicloro N(1-naftil) etilenodiamina (Merck), 2,5 mL de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p 100 mL] conforme descrito por Green et al. (1982).

Alíquotas de 50 μ L dos sobrenadantes das culturas de macrófagos, foram transferidas para outra placa de cultura de células não estéril contendo 96 cavidades de fundo planas (Corning, Inc.) e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 min de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada com filtro de 540nm em espectrofotômetro (Microplate Reader, Multiskan Ascent, Labsystems). As concentrações de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, com

concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio e os valores foram expressos em μmols de nitrito/ 5×10^5 células.

13. Determinação de citocinas

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais, enquanto que o IFN- γ e a IL-10 foram quantificados nos sobrenadantes das culturas de células esplênicas, através do teste imunoenzimático ELISA de captura. Para isso foi utilizado o Kit DuoSet[®], BD Pharmingen de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em PBS, pH 7,2 (100 μl por cavidade) e incubadas “overnight” à temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e bloqueadas com 300 μL /cavidade de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T.

Após a última lavagem foram adicionados a cada cavidade 100 μL do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 min, e lavadas 3 vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 μL /cavidade de anticorpo monoclonal (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina, diluído à concentração adequada para cada citocina em diluente de reagente (1%BSA, 0,05% de Tween 20 em PBS, pH 7,2-7,4). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 min e lavadas 3 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 μL /cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina diluído 1/200 em diluente de reagente e incubadas novamente à

temperatura ambiente por 20 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e em seguida adicionadas de 100 µL do substrato [10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2 mM de H₂O₂ (Mallinckrodt Chemical)] a cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de H₂SO₄ 2N a cada cavidade. A absorbância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/Visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems), e as concentrações de cada citocina foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/mL.

14. Determinação da angiogênese, através da reação de imunohistoquímica, utilizando como marcador o fator Von Willebrand (ZHOU, 1998)

As lâminas, com os cortes do tumor, foram desparafinizadas, re-hidratadas e lavadas, em seguida foi realizada a recuperação antigênica com a solução citrato pH 6,0 (DakoCytomation, BIOGEN), em banho-maria a 96°C por 30 minutos. Logo após, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos. Em seguida foi realizado bloqueio com peroxidase (H₂O₂) 3%, três banhos por 5 minutos. Logo após foi aplicado anticorpo primário Von Willebrand (DakoCytomation – código: A 0082), diluído 1:50 em solução de PBS e BSA 1%, e incubado, em uma câmara úmida, por 1 hora, em estufa a 37°C. As lâminas foram lavadas com PBS por 3 minutos. Os cortes foram cobertos com anticorpo secundário (Kit LSAB+/HRP pronto para uso DakoCytomation – Código – K 0690) e incubados por 20 minutos em estufa a 37°C. As lâminas foram lavadas com PBS por 3 minutos. Os cortes foram cobertos com estreptavidina (Kit LSAB+/HRP pronto para uso DakoCytomation – Código – K 0690) e incubados por 20 minutos em estufa a 37°C. A revelação foi realizada com DAB diluído em PBS contendo 1 mL de dimetilsulfóxido

e 1mL de peróxido de hidrogênio, as lâminas receberam banho desta solução por 5 minutos, em estufa a 37°C. As lâminas foram lavadas em água corrente por 3 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Carazzi por 1 minuto e lavadas em água corrente por 3 minutos e montadas.

Os vasos foram observados no microscópio óptico, aumento de 100X, e contados, em três campos de cada lâmina. Foi calculada a média de vasos por corte do tumor. Foram utilizadas 5 lâminas de cada grupo pesquisado.

Simultaneamente realizou-se um controle positivo, para avaliação da eficácia do anticorpo primário, utilizando-se, para tanto, espécimes teciduais de amígdalas humanas.

15. Análise histológica dos tumores

Os tumores foram retirados, após o sacrifício dos animais e fixados em formol tamponado 10%, pH 7,2 por 48 horas. As peças foram lavadas em água corrente e tramitadas, em seguida foram incluídas em parafina e cortadas (5µm), coradas em H/E e montadas com Permount, para análise microscópica.

Foram utilizadas 5 lâminas, de cada grupo pesquisado; em cada lâmina foram observados 10 campos, com aumento de 400x.

16. Determinação da concentração sérica de estradiol

A determinação de estradiol foi realizada nos soros dos animais, dos diferentes grupos de estudo, através de um imunoensaio competitivo utilizando aparelho Immulite 2000 (Diagnostic Products Corporation, DPC, Germany). A fase sólida (esfera) foi revestida com anticorpo policlonal de coelho anti-estradiol. Utilizou-se estradiol

conjugado à fosfatase alcalina que competiu com o estradiol na amostra (soro) com relação aos sítios de ligação do anticorpo presentes na esfera. A incubação foi de 30 minutos à 37° C. O excesso da amostra e do reagente enzima-estradiol foram removidos através de centrifugação no próprio aparelho. A seguir, foi adicionado o substrato quimioluminescente LUMIGEN PPD [4-metoxi-4(3-fosfatefenil-espiro-(1,2-dioxetano-3,2'-andamantíneo)] à esfera e o sinal proporcional à enzima ligada foi convertido pelo próprio aparelho em pg/mL.

17. Detecção de apoptose e necrose - TACS™ Annexin V-Biotin

A apoptose foi quantificada através da detecção de anexina, em culturas de macrófagos peritoneais, utilizando o Kit TACS™ Annexin V-Biotin, R&D Systems.

Após a aderência dos macrófagos obtidos, a partir dos animais, em lamínula de vidro por 1 hora, o meio de cultura (RPMI-C) foi removido e posteriormente foi realizada lavagem com tampão PBS, pH 7,2. A seguir foram acrescentados 100 µL de reagente de incubação de anexina (tampão de ligação constituído de PBS e cálcio; iodeto de propídio; anexina V), por lamínula testada. As células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente protegida da luz. O reagente de incubação foi removido com PBS e as lamínulas, contendo os macrófagos aderidos, foram submetidas à lavagem com de tampão de ligação. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de tampão contendo conjugado de estreptavidina, marcada com isotiocianato de fluoresceína. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 min. protegidas da luz. Após esse procedimento, as células foram lavadas por mais 2 vezes, durante 2 min com tampão de ligação. Foi adicionado um adjuvante de fluorescência (p-fenilenodiamino) em cada lamínula e a leitura foi feita imediatamente utilizando microscópio de fluorescência Olympus BX 60. As membranas das células em apoptose

apresentam coloração verde e as células em necrose são vermelhas, devido a marcação com iodeto de propídio. Foram contados 100 macrófagos por campo, em 5 lâminas de cada grupo pesquisado.

18. Análise dos Resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat aplicando-se análise de variância (ANOVA) com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, e através de comparações múltiplas pelo teste de Tukey.

Todos os experimentos foram realizados usando cinco animais e cada determinação foi executada em triplicata. Os gráficos foram confeccionados por intermédio do programa estatístico ORIGIN 5.0.

IV. Resultados

1. Desenvolvimento e volume dos tumores

Os animais foram acompanhados diariamente e foi observado o desenvolvimento do tumor. As células de adenocarcinoma LM3, desenvolvem o tumor em 10 dias, aproximadamente, portanto, após o 5º dia da inoculação, o local, onde estas células foram inoculadas, começou a ser apalpado levemente, e quando se observou uma pequena saliência foi marcado o dia (1º dia Figura 3) do aparecimento do tumor.

Os animais do grupo R (Ração) foram os primeiros a desenvolver o tumor, os grupos PSNF (produto de soja não fermentado) e ISS (“Iogurte” de Soja Suplementado) foram os seguintes. Nos animais do grupo IS (“Iogurte” de soja) o tumor demorou mais a aparecer, como se pode observar na ilustração da Figura 3.

O volume dos tumores apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos PSNF, IS, ISS e R.

O volume tumoral, do grupo IS, foi consideravelmente menor, enquanto que o grupo do ISS apresentou o dobro de volume em relação ao grupo do PSNF (Figura 4). Fazendo uma comparação com os quatro grupos verifica-se: $IS < PSNF < ISS < R$.

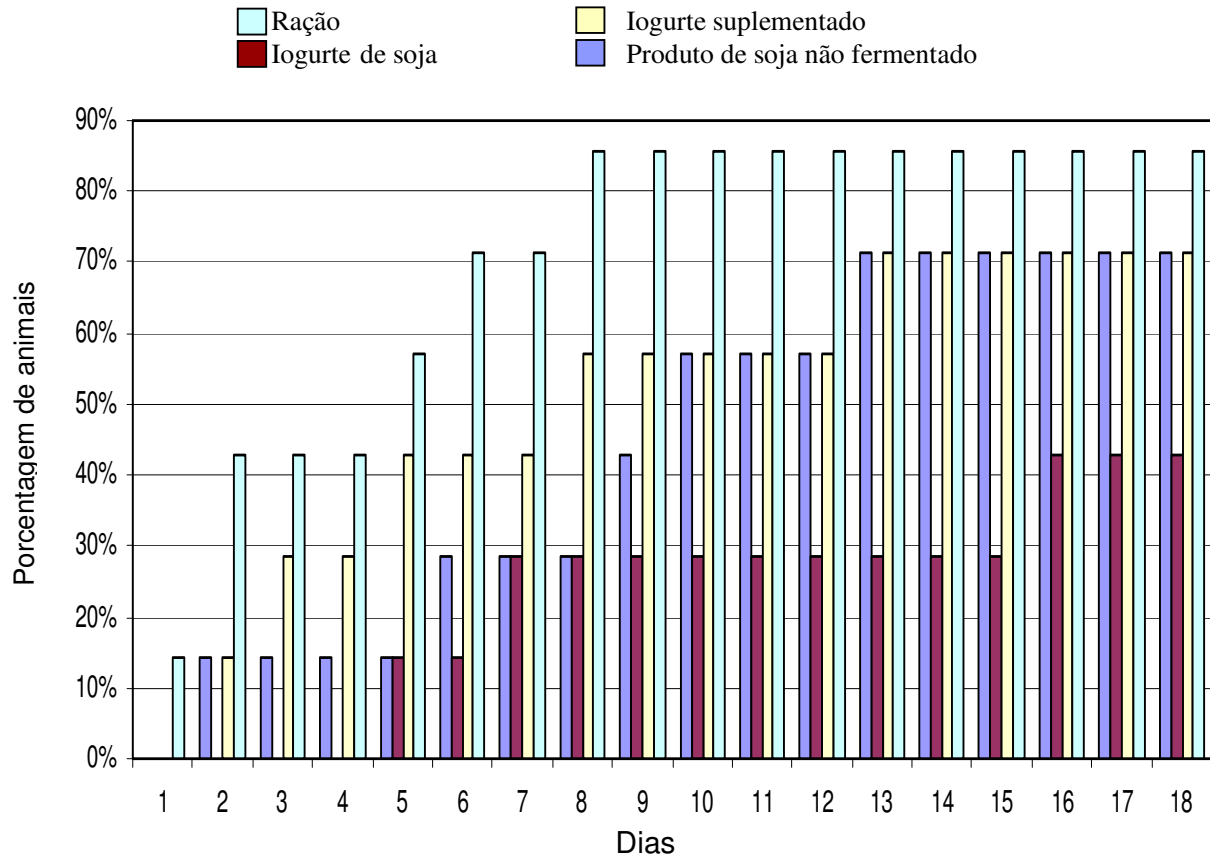


Figura 3: Porcentagem de desenvolvimento do tumor, observado em dias. Os tumores começam aparecer após dez dias da inoculação das células LM3, a partir deste dia (1°) foi anotado cada aparecimento do tumor em animais dos grupos estudados. Esta observação diária continuou até o sacrifício dos animais

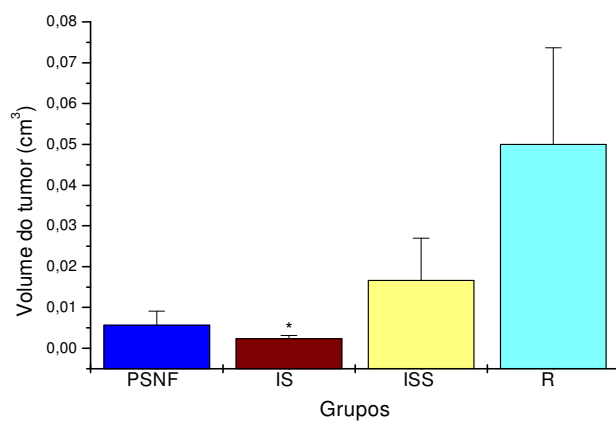


Figura 4: Média dos volumes dos tumores. Os tumores foram retirados, após o sacrifício dos animais, e medidos com um parquímetro. O volume dos tumores foram calculados através da fórmula, $\text{cm}^3 = 0,523 \times \text{comprimento (cm)} \times \text{largura (cm)} \times \text{altura (cm)}$. A média foi calculada através do volume de 5 animais de cada grupo. Houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos PSNF, IS, ISS e R.

2. Determinação da liberação de NO

A determinação de NO foi realizada em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de fêmeas de camundongo Balb/c, os macrófagos foram cultivados em presença de LPS, controle positivo, e em meio RPMI-C, controle negativo.

Todos os animais produziram NO, quando comparados ao grupo controle (C). Nos animais, que desenvolveram tumor (Figura 5A), o grupo ISSc+ foi o que produziu maior quantidade e o grupo ISc+ produziu menor (Figura 5).

Os animais que não desenvolveram tumor (Figura 5B) apresentaram taxa de NO próxima à dos animais que desenvolveram menor volume tumoral , grupos ISc+ e PSNFC+ (Figura 4).

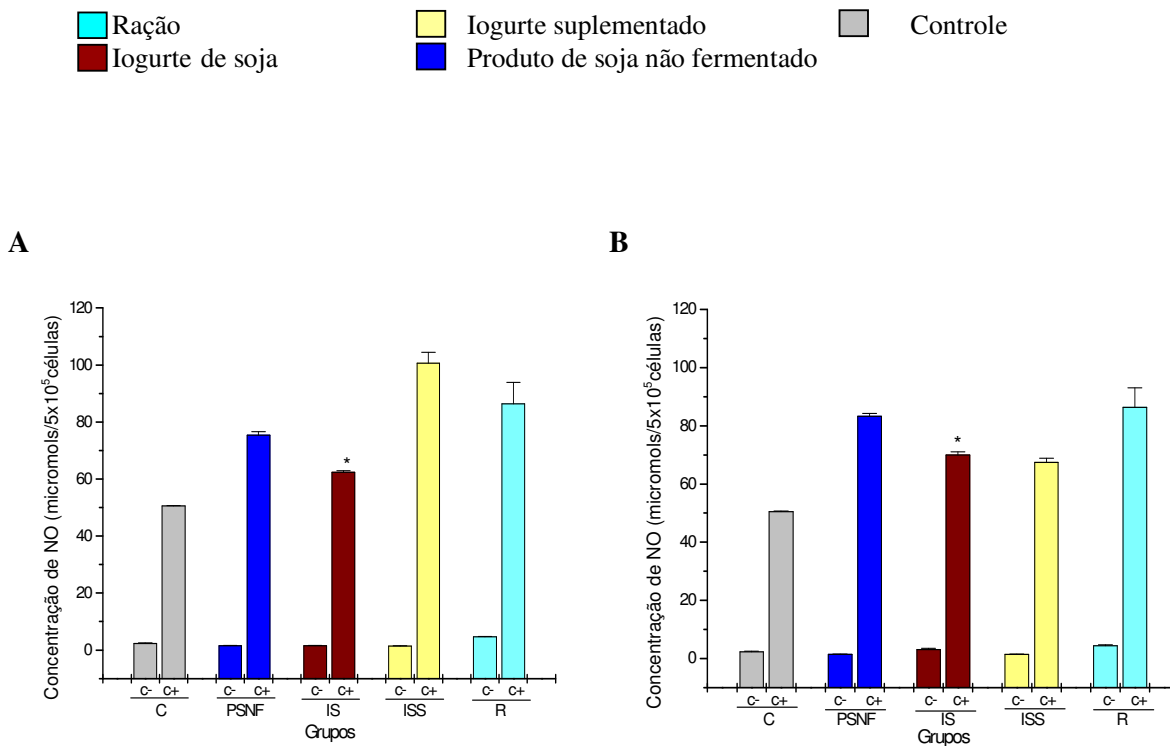


Figura 5: Produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Os macrófagos dos animais que desenvolveram tumor (A) e que não desenvolveram (B) foram cultivados em presença de LPS (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2) e os resultados expressos em μmol de nitrito/ 5×10^5 células, como média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo de estudo. Gráfico (A) diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos PSNFc+, ISc+, ISSc+ e Rc+ . Gráfico (B) diferença significativa ($p < 0,001$) entre Cc+, PSNFc+, ISc+, ISSc+ e diferença não significativa ($p > 0,05$) entre PSNFc+ e Rc+.

3. Determinação da citocina IL-1 β

A determinação da IL-1 β foi realizada em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de fêmeas de camundongo Balb/c; os macrófagos foram cultivados em presença de LPS, controle positivo, e em meio RPMI-C, controle negativo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 6, onde foram separados os resultados dos animais que desenvolveram tumor (Figura 6A) daqueles que não desenvolveram (Figura 6B).

Houve produção desta citocina entre os grupos PSNFc+, ISc+, ISSc+ e Rc+ (Figura 6A) e a diferença foi significativa ($p < 0,001$) entre eles, os grupos PSNFc+, ISc+, ISSc+ produziram concentração maior em relação ao grupo Cc+, enquanto que o grupo R+ produziu menor quantidade quando comparado ao Cc+, diferença significativa ($p < 0,001$) entre C+ e R .

Os animais do grupo do ISSc+ apresentaram a maior taxa de IL-1 β quando comparado aos grupos PSNFc+, ISc+, ISSc+ , Rc+ e Cc+.

Nos grupos PSNFc+, ISc+ e ISSc+, que não desenvolveram tumor (Figura 6B), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na produção de IL-1 β , e a concentração desta citocina, nestes grupos, foi um pouco mais elevada que a do grupo ISc+ (Figura 6A) que desenvolveu menor quantidade de tumor.

Os animais do grupo da Rc+, que desenvolveram tumor, apresentaram as menores taxas de IL-1 β quando comparados com os animais dos grupos PSNFc+, ISc+, ISSc+, enquanto que os animais que não desenvolveram tumor apresentaram concentração mais elevada quando comparada ao grupo R+ da Figura 6A .

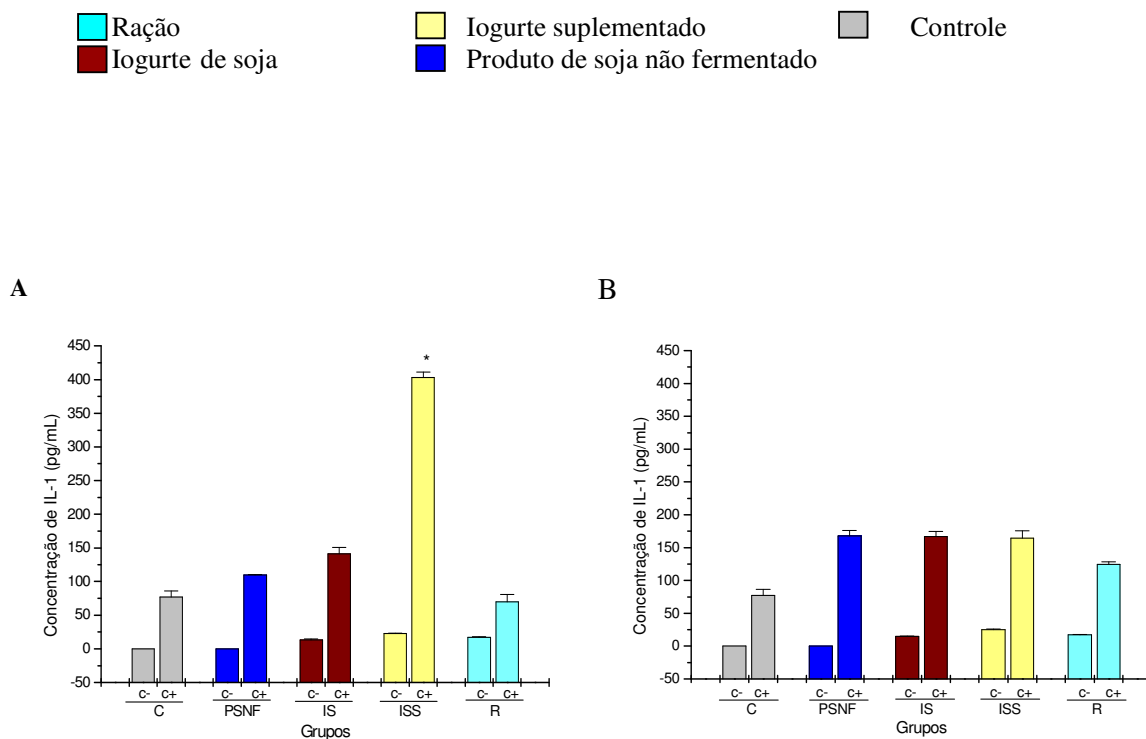


Figura 6: Concentração de IL-1 β liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c que desenvolveram tumor (A) e que não desenvolveram (B). As células foram cultivadas em presença de LPS (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). As concentrações de IL-1 β foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-1 β . Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo de estudo. Gráfico (A) diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos PSNFC+, ISc+, ISSc+, Rc+ e Cc+. Gráfico (B) diferença não significativa ($p > 0,05$) entre PSNFC+, ISc+ e ISSc+. Diferença significativa ($p < 0,001$) entre PSNFC+ e Rc+; ISc+ e Rc+; ISSc+ e Rc+.

4. Liberação de TNF- α

O TNF- α foi determinado no sobrenadante das culturas de macrófagos; as células foram cultivadas em presença de LPS (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 7, onde foram separados os resultados dos animais que desenvolveram tumor daqueles que não desenvolveram.

As taxas de TNF- α para os grupos PSNFc+ e ISc+, com tumor, não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) (Figura 7A). Os grupos do PSNFc+ e ISSc+, sem tumor (Figura 7B), apresentaram concentração de TNF- α próxima aos grupos PSNFc+ e ISc+ , com tumor) que desenvolveram menor volume do tumor (Figura 4).

Os animais do grupo ISc+, sem tumor, apresentaram a taxa mais elevada desta citocina.

Os animais do grupo Rc+, com tumor, apresentaram menor concentração de TNF- α , no entanto, os animais sem tumor, deste grupo, produziram mais desta citocina, quando comparada com os sem tumor.

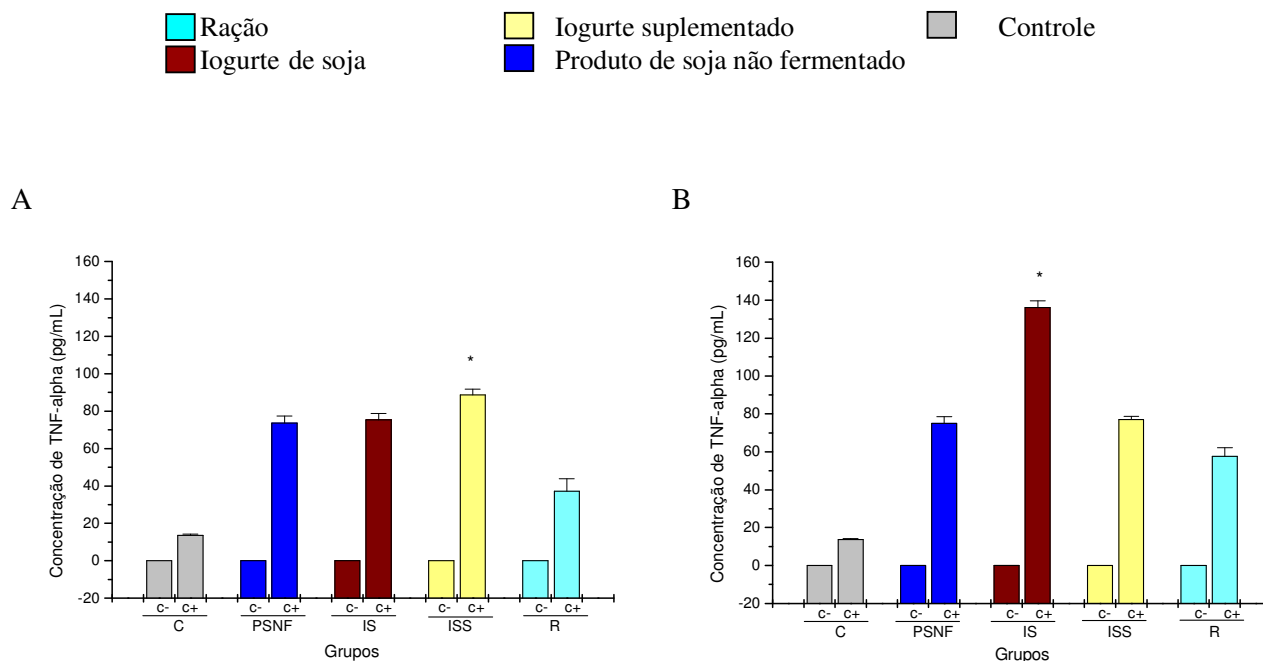


Figura 7: Concentração de TNF- α liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c que desenvolveram tumor (A) e que não desenvolveram (B).

As células foram cultivadas em presença de LPS (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). As concentrações de TNF- α foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo de estudo. Gráfico (A) PSNFc+ e ISc+ diferença não significativa ($p > 0,05$) diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos ISSc+, Rc+ e Cc+. Gráfico (B) PSNFc+ e ISSc+ diferença não significativa ($p > 0,05$) ISc+, Rc+ e Cc+ diferença significativa ($p < 0,001$).

5. Determinação da liberação de IL-6

A IL-6 foi determinada no sobrenadante das culturas de macrófagos; as células foram cultivadas em presença de LPS (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). Os resultados obtidos estão representados na Figura 8.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na liberação desta citocina para os grupos PSNFc+ e ISc+ e foi significativa ($p < 0,001$) os valores de IL-6 destes grupos quando comparados aos grupos ISSc+ e Rc+. Os grupos PSNFc+ e ISc+ apresentaram menor quantidade desta citocina quando comparada aos grupos ISSc+ e Rc+.

Os grupos ISSc+ e Rc+ apresentaram maior concentração de IL-6, e não foi significativa ($p > 0,05$) a diferença desta interleucina para estes grupos.

Os grupos PSNFc+, ISc+, ISSc+ e Rc+ apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) com o grupo Cc+.

Os grupos PSNFc- e ISc- apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$), enquanto que os grupos PSNFc-, ISSc- e Rc- a diferença não foi significativa ($p > 0,05$).

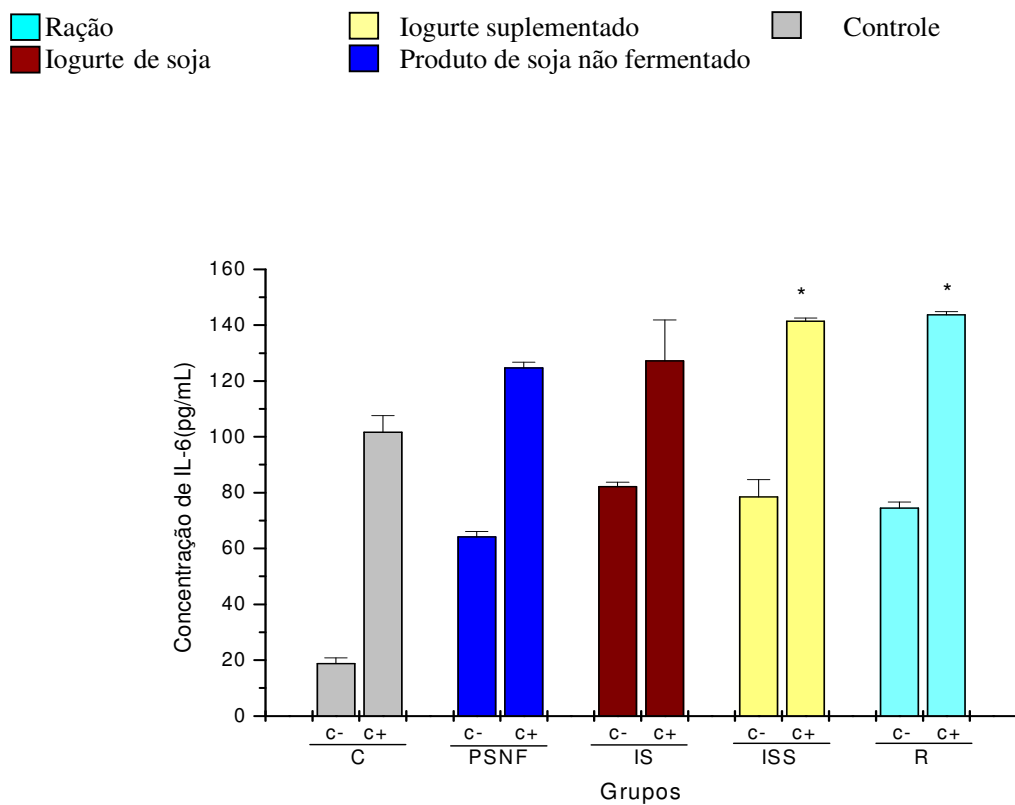


Figura 8: Concentração de IL-6 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c que desenvolveram tumor. As células foram cultivadas em presença de LPS (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). As concentrações de IL-6 foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-6. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo de estudo. PSNFc+ e ISc+ diferença não significativa ($p > 0,05$); PSNFc+ e ISSc+ diferença significativa ($p < 0,01$); PSNFc+ e Rc+ diferença significativa ($p < 0,001$); ISc+ e ISSc+ diferença significativa ($p < 0,01$); ISc+ e Rc+ diferença significativa ($p < 0,01$); ISSc+ e Rc+ diferença não significativa ($p > 0,05$).

6. Determinação da liberação de IL-12

A IL-12 foi determinada no sobrenadante das culturas de macrófagos de camundongo Balb/c, que desenvolveram tumor; as células foram cultivadas em presença de LPS (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). Os resultados obtidos estão representados na Figura 9.

Os grupos que apresentaram maior quantidade de IL-12 foram ISc+ e ISSc+, diferença não significativa ($p>0,05$) entre eles.

Os animais do grupo PSNFC+ produziram menor quantidade desta interleucina, e a diferença foi significativa ($p<0,001$), quando comparados com os grupos ISc+ e ISSc+.

Os animais do grupo R não apresentaram concentração de IL-12.

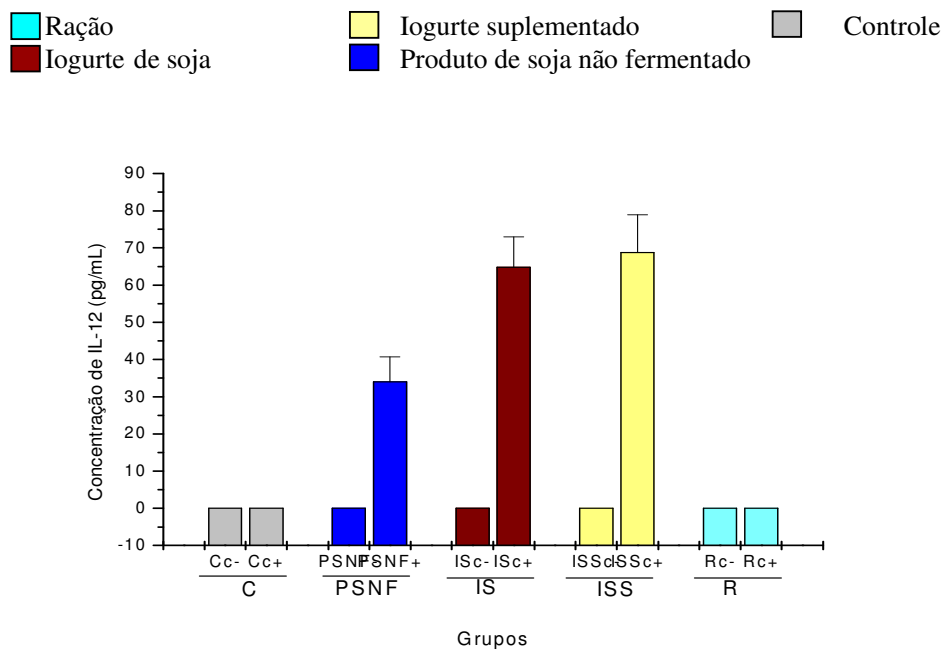


Figura 9: Concentração de IL-12 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c que desenvolveram tumor. As células foram cultivadas em presença de LPS (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). As concentrações de IL-12 foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-12. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo de estudo. PSNFc+ e ISc+ diferença significativa ($p < 0,001$); PSNFc+ e ISSc+ diferença significativa ($p < 0,001$); ISc+ e ISSc+ diferença não significativa ($p > 0,05$). Diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos PSNFc+, ISc+, ISSc+, quando comparados ao grupo Rc+ e Cc+. Diferença não significativa ($p > 0,05$) entre Rc+ e Cc+.

7. Determinação da liberação da IL-10

A IL-10 foi determinada nos sobrenadantes de cultura de linfócitos de baço de camundongos Balb/c que desenvolveram tumor. As células foram cultivadas em presença de conA (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). Os resultados obtidos estão representados na Figura 10.

Os grupos que apresentaram maior quantidade de IL-10 foram PSNFc+ e ISc+ e não houve diferença significativa ($p>0,05$).

Os animais do grupo ISSc+ produziram menor quantidade desta interleucina e a diferença foi significativa ($p< 0,001$) quando comparados aos grupos PSNFc+ e ISc+.

Os animais do grupo Rc+ apresentaram menor quantidade de IL-10 e a diferença foi significativa ($p< 0,001$) em relação aos grupos PSNFc+, ISc+ e ISSc+.

Ns grupos PSNFc-, ISc-, ISSc- a diferença não foi significativa ($p>0,05$) para esta citocina.

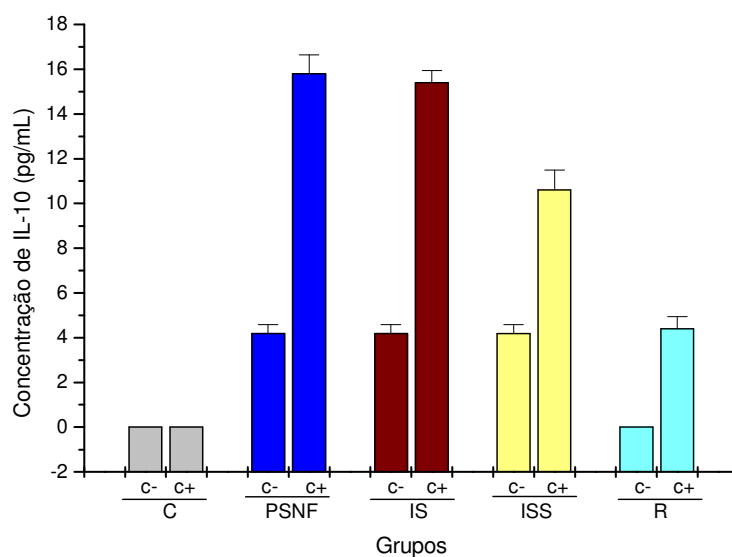
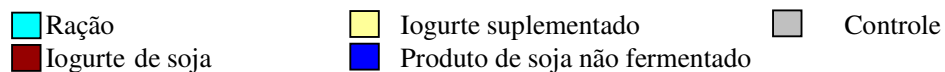


Figura 10: Concentração de IL-10 liberada nos sobrenadantes de cultura de linfócitos de baço de camundongos que desenvolveram tumor. As células foram cultivadas em presença de conA (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). As concentrações de IL-10 foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-10. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo de estudo. PSNFc+ e ISc+ diferença não significativa ($p > 0,05$); diferença significativa ($p < 0,001$) entre PSNFc+ e ISSc+; diferença significativa ($p < 0,001$) entre ISc+ e ISSc+; diferença significativa ($p < 0,001$) entre PSNFc+, ISc+ e ISSc+ quando comparados ao grupo Rc+

8. Determinação da liberação de IFN- γ

A IFN- γ foi determinada nos sobrenadantes de cultura de linfócitos de baço de camundongos Balb/c que desenvolveram tumor e que não desenvolveram. As células foram cultivadas em presença de conA (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). Os resultados obtidos estão representados na Figura 11.

Os animais dos grupos ISc+ e ISSc+, que desenvolveram tumor, expressaram maior quantidade de IFN- γ , diferença não significativa ($p>0,05$).

Os animais do grupo PSNFC+, que desenvolveram tumor, apresentaram maior quantidade de IFN- γ quando comparado ao grupo Rc+, foi significativa a diferença ($p<0,001$).

Entre os animais que não apresentaram tumor o grupo IS expressou maior quantidade desta interleucina e a diferença foi significativa ($p<0,001$) entre PSNFC+, ISc+, ISSc+ e Rc+.

Os animais do grupo PSNFC+, que não desenvolveu tumor, produziram maior quantidade de IFN- γ quando comparados aos animais, deste mesmo grupo, mas que desenvolveram tumor. O inverso aconteceu com os animais do grupo ISSc+, os que não desenvolveram tumor produziram menor quantidade desta citocina em relação aos animais com tumor.

É possível que a concentração, de IFN- γ , acima de 20 pg/mL seja mais eficiente na contenção do tumor.

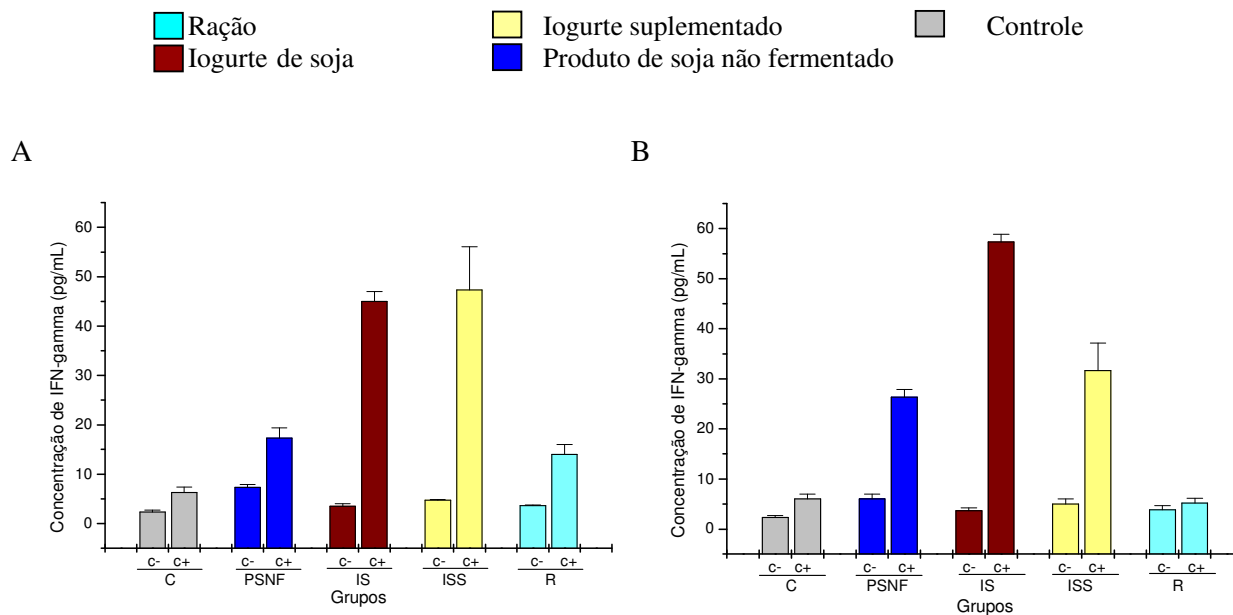
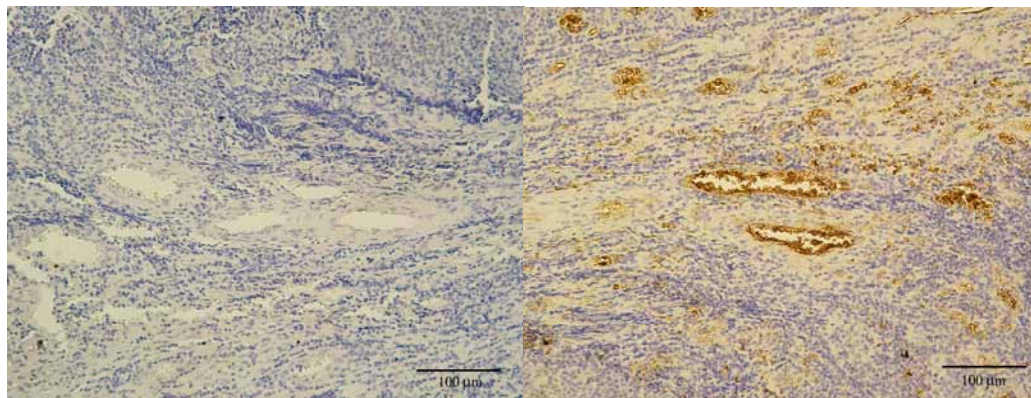


Figura 11: Concentração de IFN- γ liberada nos sobrenadantes de cultura de linfócitos de baço de camundongos Balb/c que desenvolveram tumor (A) e que não desenvolveram (B). As células foram cultivadas em presença de conA (c+) e somente meio RPMI-1640C (c-). As concentrações de IFN- γ foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IFN- γ . Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo de estudo. Gráfico (A) ISc+ e ISSc+ diferença não significativa ($p > 0,05$); entre os grupos PSNFc+, Rc+ e Cc+ diferença significativa ($p < 0,001$); diferença significativa ($p < 0,001$) entre PSNFc+ e ISc+; diferença significativa ($p < 0,001$) entre PSNFc+ e ISSc+ . Gráfico (B) diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos PSNFc+, ISc+, ISSc+, Rc+ e Cc+.

9. Desenvolvimento de vasos sanguíneos no local do tumor.

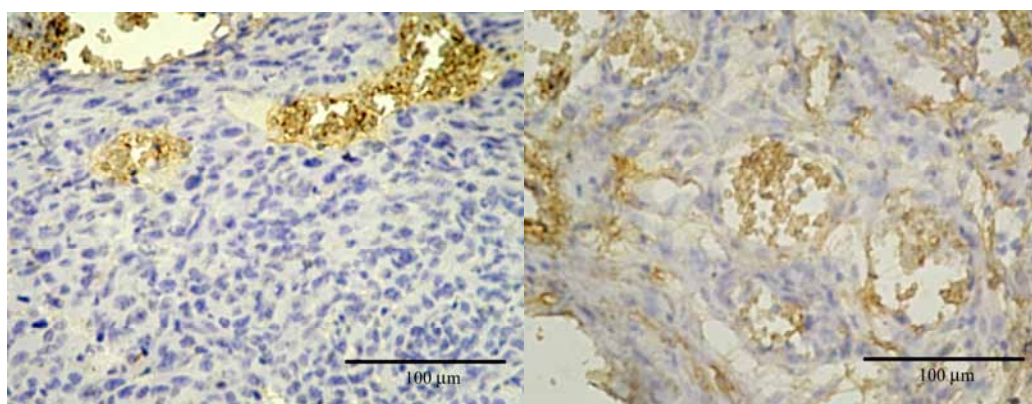
Para a padronização da técnica de imunohistoquímica foram utilizados tecidos tumorais de adenocarcinoma LM3, desenvolvidos em fêmeas Balb/c, e como controle positivo foram utilizados amígdalas humanas (Figura 12).

As peças dos tumores de adenocarcinoma LM3 dos animais dos grupos PSNF, IS, ISS e R não foram lavados, em água corrente, por tempo suficiente, para retirada do formol tamponado e este fato comprometeu a técnica, pois o formol fixa pela formação de pontes aldeídicas entre as diferentes moléculas e tempo de fixação aumenta a formação de tais pontes que podem esconder o epítipo e conseqüentemente dificultar o reconhecimento pelo anticorpo específico. Devido a este fato não conseguimos marcar os vasos sanguíneos nos tumores dos grupos analisados.



Controle – (amígdala humana)

Controle + (amígdala humana)



Adenocarcinoma LM3

Adenocarcinoma LM3

Figura 12: Padronização da técnica de imunohistoquímica. Foram utilizados como controle positivo (C+) e controle negativo (C –) tecido de amígdala humana, e tecido de adenocarcinoma murino LM3. Fotos retiradas no microscópio óptico, aumento de 200x (amígdala) e 400x (tecido de adenocarcinoma).

10. Análise histológica no local do tumor.

As lâminas foram coradas com HE e observadas no microscópio óptico em aumento de 400x, em conjunto com um patologista.

Análise histopatológica do tumor, para os grupos:

Produto de soja não fermentado: As células neoplásicas são bem diferenciadas exibindo pleomorfismo, hipercromatismo e aumento de número de nucléolos. Há presença de mitoses típicas e de células inflamatórias, com predominância de linfócitos.

“Iogurte” de Soja: As células neoplásicas são bem diferenciadas, há presença de mitoses típicas e células inflamatórias, principalmente linfócitos.

“Iogurte” de Soja Suplementado: As células neoplásicas são anaplásicas e pleomórficas, apresentam nucléolos proeminentes e exibem um padrão de crescimento de ilhas ou cordões. Há presença de mitoses típicas e muitos vasos sanguíneos (angiogênese)

Ração: As células são anaplásicas e pleomórficas, apresentam aumento no número e tamanho dos nucléolos, e padrão de crescimento em ilhas ou cordões. Há presença de mitoses atípicas e grande quantidade de vasos sanguíneos.

Os animais do grupo IS apresentaram menor taxa de mitose, no local do tumor. Comparando os quatro grupos, em ordem crescente, do número de mitose por lâmina, observou-se: IS < PSNF < R < ISS (Figura 13). Houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos PSNF, IS, ISS e R.

Os grupos PSNF e IS apresentaram menor quantidade de vasos, no local do tumor, com diferença não significativa ($p > 0,05$). Houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos PSNF e ISS, e também entre IS e ISS. O grupo do ISS apresentou maior quantidade de vasos, quando comparado aos grupos PSNF e IS

(Figuras 14 e 15). Houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos ISS e R, sendo o grupo R aquele que apresentou maior quantidade de vasos.

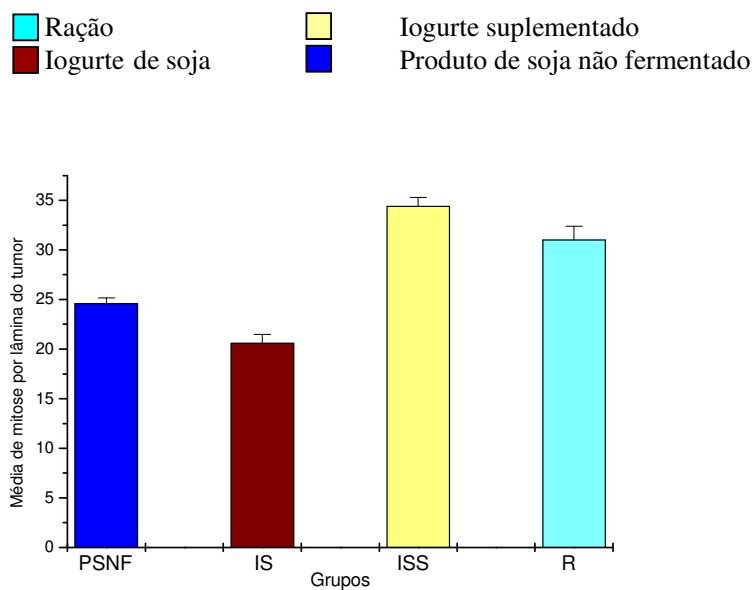


Figura 13: Mitoses no tecido tumoral. As lâminas, com as peças do tumor, foram coradas em HE e observadas no microscópio óptico em aumento de 400x. As células em mitose foram contadas, em 10 campos visuais de cada lâmina. Foram utilizadas 5 lâminas de cada grupo pesquisado e calculada a média de mitose, das lâminas de cada grupo. Houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos PSNF, IS, ISS e R.

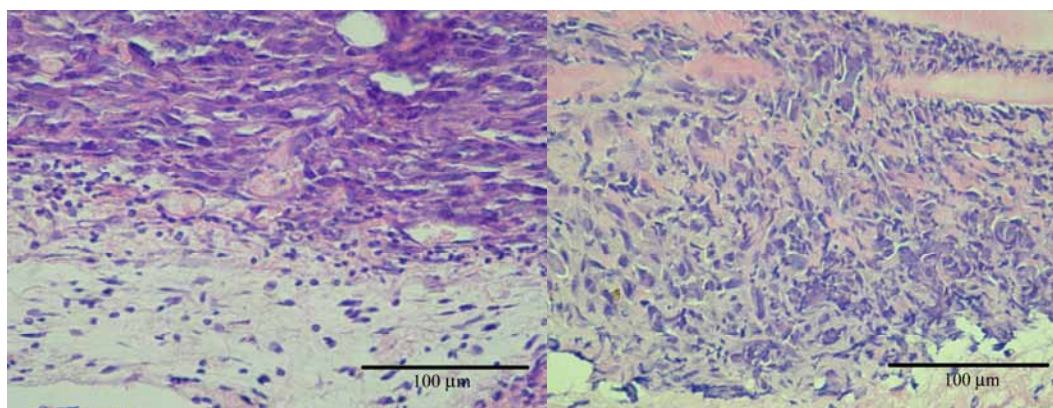
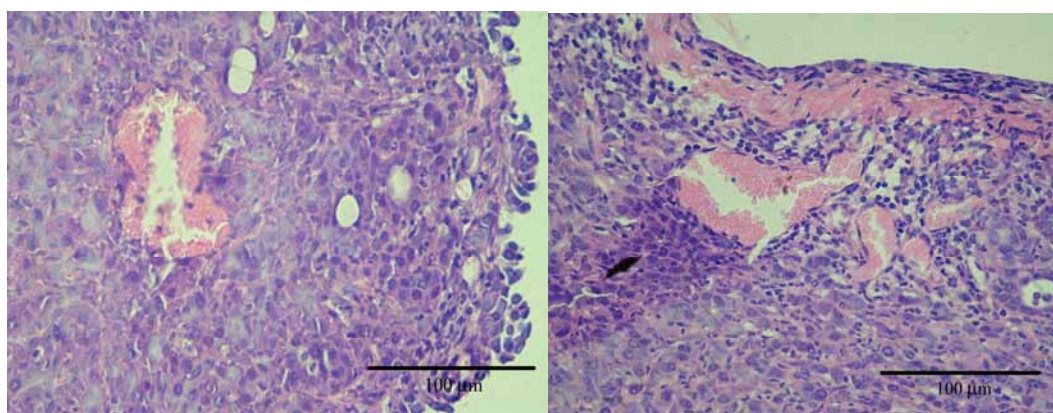
**PSNF****IS****ISS****R**

Figura 14: Desenvolvimento de vasos sanguíneos em tecidos corados em HE. Os vasos sanguíneos foram observados no microscópio óptico, aumento de 400x e contados, em cada campo visual, de 5 lâminas em cada grupo analisado. Foi calculada a média de vasos por grupos. Os grupos PSNF e IS apresentaram diferença não significativa ($p > 0,05$); IS, ISS e R diferença significativa ($p < 0,001$); PSNF, ISS e R diferença significativa ($p < 0,001$), ISS e R diferença significativa ($p < 0,01$).

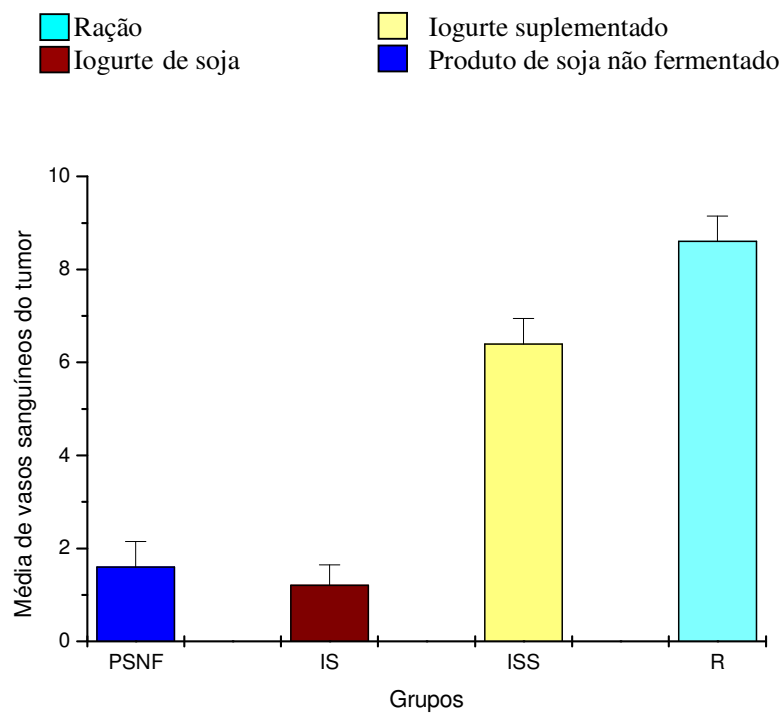


Figura 15: Média vasos sanguíneos no tumor. Os vasos sanguíneos foram observados no microscópio óptico, aumento de 400x e contados, em cada campo visual, de 5 lâminas em cada grupo analisado. Foi calculada a média de vasos por grupos. Os grupos PSNF e IS apresentaram diferença não significativa ($p > 0,05$); IS, ISS e R diferença significativa ($p < 0,001$); PSNF, ISS e R diferença significativa ($p < 0,001$) e ISS e R diferença significativa ($p < 0,01$).

11. Determinação de estradiol no soro

O estradiol foi determinado no soro dos animais, através do equipamento Immulite (DPC Medlab), por metodologia quimioluminescente. Foram realizadas três determinações, em tempos diferentes: animais antes de consumir as dietas especiais; animais consumindo as dietas e sem a implantação das células LM3; e animais com tumor e consumindo as dietas. Os resultados estão apresentados na Figuras 16.

Quando os animais ainda não estavam consumindo as dietas especiais (Figura 16 A), os resultados não foram significativos ($p>0,05$) entre os grupos C, PSNF, IS, ISS e R.

Depois de 10 dias consumindo as dietas especiais, a concentração de estradiol não aumentou tanto nos grupos PSNF, IS e ISS, quanto nos grupos R e C. Houve diferença não significativa ($p>0,05$) entre os grupos PSNF, IS e ISS. Comparando os grupos PSNF, IS e ISS com os grupos C e R, a diferença foi significativa ($p<0,001$), não houve diferença significativa entre os grupos C e R (Figura 14 B).

Na Figura 16 C, onde estão apresentados os resultados da quantidade de estradiol, no soro dos animais que desenvolveram tumor e continuaram com as dietas especiais; os grupos das dietas especiais continuaram a manter as taxas mais baixas de estradiol, diferença não significativa ($p>0,05$) entre PSNF, IS e ISS. Os grupos R e C mantiveram a taxa de estradiol, mais elevada, quando comparado aos grupos PSNF, IS e ISS.

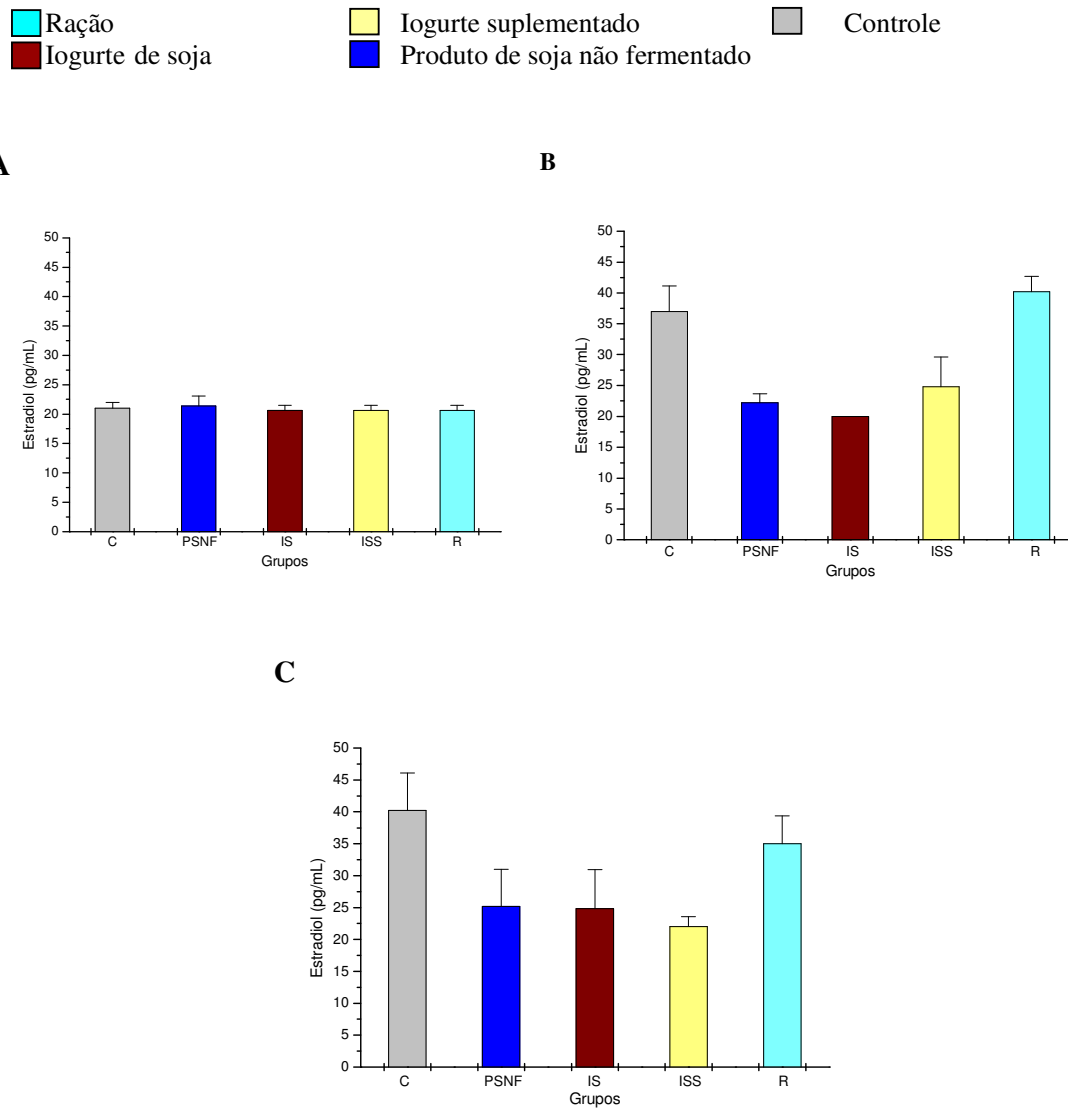


Figura 16: Concentração de estradiol no soro dos animais. A. Estradiol - determinado no soro de camundongos Balb/c sem dieta especial e sem tumor. Diferença não significativa ($p > 0,05$) entre os grupos C, PSNF, IS e ISS analisados. B. Estradiol e dieta - foi determinado no soro de camundongos Balb/c alimentados com dieta especial (PSNF, IS e ISS) e sem implantação das células LM3. PSNF, IS e ISS diferença não significativa ($p > 0,05$); PSNF, IS e ISS diferença significativa ($p < 0,001$) com o grupo R; PSNF, IS e ISS diferença significativa ($p < 0,001$) com o grupo C; C e R diferença não significativa ($p > 0,05$). C. Estradiol, dieta e tumor - determinado no soro de camundongos Balb/c, alimentados com dieta especial (PSNF, IS e ISS) e com tumor (PSNF, IS, ISS e R). PSNF, IS e ISS diferença não significativa ($p > 0,05$); C e R diferença não significativa ($p > 0,05$). Entre os demais diferença significativa ($p < 0,001$).

12. Determinação de apoptose e necrose em macrófagos

A necrose e apoptose foram quantificadas através da detecção da anexina em culturas de macrófagos peritoneais, utilizando o Kit TACS™ Annexin V-Biotin, R&D Systems. Foi utilizado microscópio de fluorescência Olympus BX 60. Aumento 1000X. Os resultados apresentados estão na Figura 17 e 18.

Os macrófagos em necrose ou apoptose foram contados em cada campo visual da lâmina analisada.

Foram utilizadas 5 lâminas de cada animal dos grupos : PSNF, IS, ISS e R.

O grupo IS apresentou maior quantidade de macrófagos em apoptose quando comparada aos grupos PSNF, ISS e R. Houve diferença foi significativa ($<0,001$) entre IS e PSNF; IS e ISS; IS e R .

Os grupos PSNF e ISS a diferença foi não significativa ($p>0,05$) entre as médias de macrófagos em apoptose.

O grupo da ração apresentou menor número de macrófagos em apoptose.

O grupo IS apresentou menor necrose de macrófagos, com diferença significativa ($<0,001$), quando comparada com os grupos PSNF, ISS e R.

A diferença não foi significativa ($p>0,05$) entre os grupos PSNF, ISS e R, na quantidade de macrófagos em necrose.

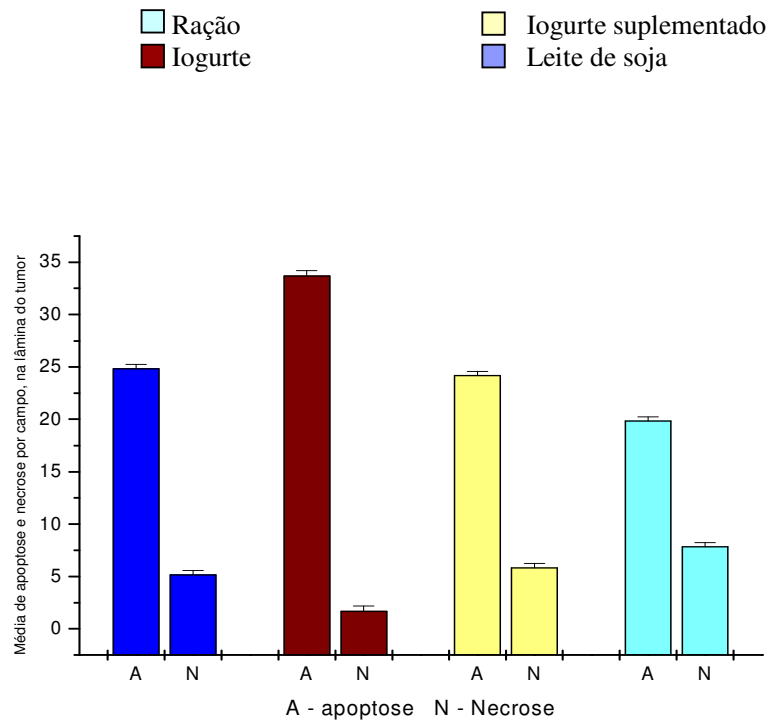


Figura 17: Apoptose e Necrose em macrófagos obtidos do exsudato peritoneal. A necrose e apoptose foram quantificadas através da detecção da anexina em culturas de macrófagos peritoneais, utilizando o Kit TACS™ Annexin V-Biotin, R&D Systems. Apoptose – PSNF e ISS não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Os grupos IS e R, IS e ISS, IS e PSNF apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$). Necrose - PSNF, ISS e R diferença não significativa ($> 0,05$). A diferença foi significativa ($p < 0,001$) quando comparada com IS.

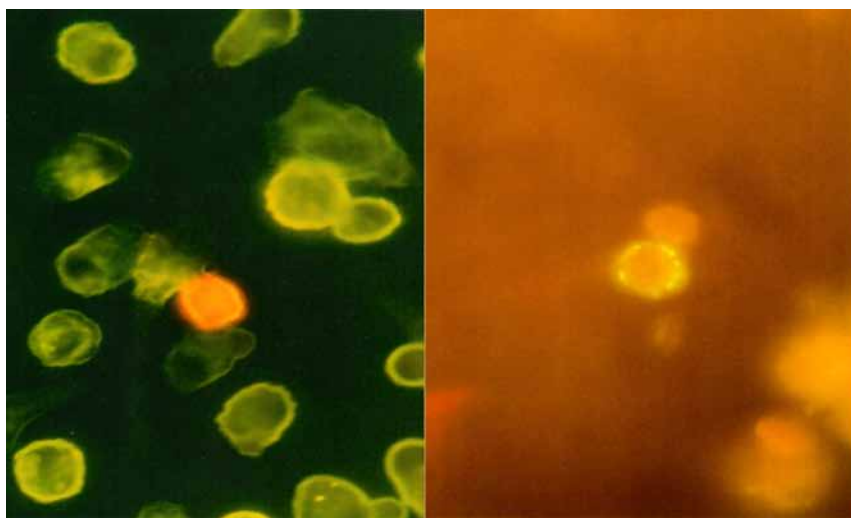


Figura 18: Fotomicroscopia ótica da necrose e apoptose em macrófagos. A necrose e apoptose foram quantificadas através da detecção da anexina em culturas de macrófagos peritoneais utilizando o Kit TACS™ Annexin V-Biotin, R&D Systems. Aumento 1000X. As células foram contadas, 100 células em cada campo, de 4 campos por lâmina ; 5 lâminas, de cada grupo, foram analisadas.

V. Discussão

A dieta tem sido considerada boa estratégia em saúde pública, visando à manutenção e melhora da saúde, prevenindo o aparecimento de doenças crônicas, tais como desordens gastrintestinais, doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose, promovendo também um envelhecimento mais saudável (SAARELA et al., 2000).

É de conhecimento da literatura que as isoflavonas da soja inibem o crescimento celular devido à modulação do ciclo celular progressivo e da expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, metástase e angiogênese (HANDAYANI, 2006); a genisteína aumenta a atividade do linfócito T citotóxico e das células NK (GUO, 2001). As isoflavonas são compostos difenólicos e ligam-se a compostos nitrogenados, produzidos por macrófagos, controlando a resposta inflamatória ao redor do tumor (D'ALESSANDRO et al., 2003).

As bactérias lácticas, presentes no intestino humano e de outros animais, contribuem para numerosas funções no trato digestivo, uma delas é a propriedade imunoestimulatória, incluindo ativação de macrófagos e linfócitos, e produção de anticorpos; tem sido proposto que a ingestão dessas bactérias pode aumentar a resistência às infecções, também apresentam potencial de prevenir o câncer (PERDIGON, 2001). O consumo de produtos fermentados reduz o risco de câncer de mama. LeBlanc (2005) verificou que o leite fermentado com *Lactobacillus helveticus* ativou as células do sistema imune, aumentou a apoptose das células do tumor (adenocarcinoma), aumentou a produção de TNF- α , e diminuiu a expressão de Bcl-2 nas células mamárias. Matar et al, (2001), observaram que esta cultura de lactobacilos modula a resposta imune e ativa principalmente a resposta imune celular. Isolauri (2000) e LeBlanc (2005) verificaram que os alimentos probióticos elevam a

concentração de IL-10, no soro, indicando a possível propriedade antiinflamatória destes lactobacilos.

Paiva (2005), em pesquisa realizada em nosso laboratório, avaliou a influência dos alimentos leite de soja, “iogurte” de soja e “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas, no desenvolvimento do tumor de mama, e verificou que os animais que consumiram o “iogurte” suplementado apresentaram volume tumoral inferior aos animais do grupo “iogurte” de soja. Nesta pesquisa, os alimentos foram administrados a noite, quando os animais estavam acordados, portanto pode ter sido influenciada pelo ritmo biológico (claro/escuro) dos animais (NEVES et al., 2000) .

Em nosso estudo, os animais receberam os diferentes tratamentos durante 10 dias. Após esse período, foram inoculadas as células LM3 e os animais foram acompanhados diariamente, os animais continuaram com a dieta até o momento do sacrifício. O 1º tumor apareceu no grupo R e, a partir desse momento, foi anotado, nos dias subsequentes, todos os outros aparecimentos de tumores (Figura 3).

Nossos resultados mostram que o aparecimento do tumor foi tardio, no grupo IS, pois somente foi perceptível no 5º dia, mantendo-se constante do 7º ao 15º dia. No grupo R, o número de animais com tumor aumentou significativamente, 42,8% no 2º dia, alcançando 85,7% no final do experimento. Verificou-se também um número maior de animais com tumor fazendo uso do ISS, sendo uma observação importante a de que os tumores neste grupo sempre surgiram antes dos tumores apresentados nos grupos PSNF e IS. A partir do 10º dia os animais com tumor dos grupos PSNF e ISS apresentaram o mesmo valor, chegando a 71,4%.

Comparando-se nossos resultados, os animais que consumiram o PSNF conseguiram conter o desenvolvimento do tumor por mais tempo (até o 9º dia) em relação ao grupo ISS e somente, a partir do 10º dia é que nestes dois grupos os tumores

apareceram simultaneamente. Analisando nossos resultados, o “iogurte” de soja (IS) parece ser o produto mais eficiente no combate ao adenocarcinoma murino, menos da metade dos animais desse grupo, 42,8%, não desenvolveram tumor e o volume tumoral,, nestes animais foi consideravelmente menor (Figura 4).

Jin e MacDonald (2002) observaram que camundongos, tratados com isoflavonas, demoraram para desenvolver o tumor de mama, o período de latência foi maior.

Alimento fermentado com *Lactobacillus helveticus* regrediu o tumor implantado subcutaneamente em camundongo Balb/c, o efeito anti-tumoral foi devido à modulação da resposta imune (Matar et al., 2001)

Tem sido documentada a reação tumoricida *in vitro* de macrófagos como um mecanismo de defesa do hospedeiro para o controle e erradicação de doença neoplásica. Atualmente reconhece-se que macrófagos podem ser ativados e tornarem-se citotóxicos para células tumorais, incluindo células resistentes à morte por outros componentes do sistema de defesa do hospedeiro e drogas anti-câncer. Essa atividade dos macrófagos sobre certas células tumorais pode ocorrer por meio de mecanismos dependentes da via óxido nítrico. O óxido nítrico possui uma variedade de atividades, podendo regular numerosas funções fisiológicas e apresentando um papel tumoricida. Atua diretamente nas células tumorais, inibindo sua respiração celular e, indiretamente, provocando danos ao DNA celular (Queiroz, 1999).

Por outro lado, Coussens e Werb, 2001, relacionam o maior desenvolvimento do tumor à atividade de macrófagos, em consequência da exacerbação do processo inflamatório no micro-ambiente do tumor. O NO tem sido envolvido em mecanismos como a vasodilatação e inflamação, a expressão de NO em tumores sólidos e em suas

metástases, sugerem que este mediador biológico possa participar da sobrevivência do tumor e de processos metastáticos (GAUTHIER, 2004).

Outro aspecto importante vem do fato de que o NO produzido pelos macrófagos pode ser o mediador da produção de mucina pelas células tumorais e, a mucina é uma glicoproteína associada à membrana celular e está expressa em maiores quantidades nas células tumorais; este fato interfere na adesão celular e protege a célula tumoral do reconhecimento pelo sistema imune (WINK et al., 1998).

Analisando a produção de NO na Figura 5, o grupo IS apresentou a menor produção, tanto nos animais que tiveram tumor quanto naqueles que não apresentaram ($p < 0,001$, quando comparado com os grupos PSNF, ISS e R. Este fato pode ter contribuído para o controle do processo inflamatório desencadeado pelas células tumorais. O outro grupo que também apresentou menor produção de NO foi o PSNF com tumor, a diferença foi significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo ISS. Resultados de NO semelhantes a esse perfil foram observados anteriormente em nosso laboratório (PAIVA, 2005).

Coussens e Werb, 2001, relacionam o maior desenvolvimento do tumor à atividade de macrófagos, em consequência da exacerbação do processo inflamatório no micro-ambiente do tumor. O NO tem sido envolvido em mecanismos como a vasodilatação e inflamação, a expressão de NO em tumores sólidos e em suas metástases, sugerem que este mediador biológico possa participar da sobrevivência do tumor e de processos metastáticos (GAUTHIER, 2004).

Tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa possuem mecanismos anti-tumorais. Na imunidade inata os macrófagos ativados, produzem as citocinas IL-1 (mediador da resposta inflamatória), IL-12 (estimula a produção de IFN- γ pelas células

T e NK), TNF- α que se liga aos receptores da célula tumoral ativando uma via de sinalização que resulta na apoptose da mesma (ABBAS, 2003) .

Analisando a produção de IL-1 β no grupo IS, observa-se que esse mediador não foi tão elevado (Figura 6). Uma concentração mediana (ao redor de 154 pg/mL) de IL-1 β poderia estar associada ao menor desenvolvimento do tumor, uma vez que esta citocina pró-inflamatória quando em grande quantidade inibe a atividade do gene *p53*, responsável pela transcrição da proteína p53, que desencadeia o processo de apoptose sendo este último evento relacionado com o controle da proliferação de células tumorais (HUDSON,1999; COUSSENS, 2001). A quantidade dessa citocina foi baixa tanto no grupo R como no grupo C, enquanto que no grupo ISS, com tumor, foi a mais elevada concentração, e esses extremos poderiam estar contribuindo para o desenvolvimento do tumor nesses grupos.

Altas taxas de IL-1 β presente no microambiente do tumor de mama estão associadas com a invasão do tumor (JIN et al., 1997); Pantschenko et al. (2003) observaram que a presença de IL-1 β , no local do tumor de mama, induz a sinalização da expressão de IL-8, envolvida na proliferação do tumor, angiogênese e metástase.

O grupo do PSNF também apresentou taxa menor de IL-1 β , próxima à do grupo IS, mostrando uma resposta intermediária entre os animais que receberam o tratamento com IS e aqueles sem tratamento com as dietas R e C. Esses resultados correlacionam-se com o volume de tumor observado: IS<PSNF<ISS<R (Fig.4).

A baixa produção da IL-1 β , observada no grupo R, pode ter contribuído para o desenvolvimento do tumor, em consequência da menor resposta imunológica.

Os animais que não desenvolveram tumor apresentaram concentração de IL-1 β entre 100 e 150 pg/mL.

O TNF- α é uma das principais citocinas pró-inflamatórias e desempenha papel central na iniciação e regulação da cascata de citocinas durante a resposta inflamatória e está envolvido em eventos inflamatórios locais e sistêmicos. O TNF- α também tem papel homeostático, limitando a extensão e duração da inflamação. (MAKHATADZE, 1998).

O TNF- α é responsável pela destruição de células tumorais, através de ação citotóxica e inicia, pela via extrínica, uma cascata de eventos que resulta em apoptose destas células e substâncias que estimulam a indução de quantidades moderadas deste mediador podem ter sua aplicação na resposta biológica não específica (SELLER e FISHER, 1999).

Na Figura 7, os animais do grupo IS, que não apresentaram tumor, produziram as maiores taxas de TNF- α quando comparados aos grupos PSNF, ISS e R, uma indicação da importância desta citocina, para a contenção do tumor.

As associações entre as citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , ativam fatores de transcrição tal como o fator nuclear kB (NF- κ B), este fator pertence à família Rel, de fatores de transcrição, e está presente no citoplasma na forma inativa e é ativado por estas citocinas, depois de ativado promove a expressão de genes pró-inflamatórios (WHEELER, 2004).

Os animais do grupo ISS, que desenvolveram tumor, foram os que produziram as maiores concentrações de IL-1 β e TNF- α , o que pode ter contribuído para o comprometimento dos animais deste grupo.

Um fato interessante é o grupo R ter liberado a menor quantidade de TNF- α em relação aos grupos PSNF, IS e ISS, e analisando-se os outros resultados aqui já apresentados, foi o grupo que também produziu menor quantidade de IL-1 β , maior

volume tumoral, confirmando a importância concentrações moderadas destas citocinas, para a contenção do tumor.

Desde os anos 80, é de conhecimento que a regulação das citocinas deve ser firmemente controlada. Sabe-se, por exemplo, que o funcionamento do sistema imunológico é equilibrado pela atividade de mediadores pró e antiinflamatórios. A atividade não regulada desses mediadores pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias sérias. Nessa rede de citocinas, TNF- α e IL-1 β estimulam a produção de IL-6 (MANOLAGAS et al.,1994); o NO também estimula a expressão da IL-6 (RAYKOVA et al., 2003). A IL-6 é um exemplo típico de citocina multifuncional, uma vez que atua regulando a resposta imune, a hematopoiese, proteínas de fase aguda, entre outras funções, indicando que a IL-6 desempenha papel central nos mecanismos inflamatórios (KISHIMOTO, 1989).

Os níveis fisiológicos de IL-6 são geralmente muito baixos, entretanto se elevam rapidamente em resposta a vários estímulos como infecções bacterianas ou virais, danos tissulares induzidos pela inflamação e outros tipos de traumas. Embora a resposta ótima à infecção e lesão pareça ser mediada somente em presença da IL-6, sua importância relativa varia em cada caso, possivelmente como resultado da interação com outros mediadores também liberados (KISHIMOTO, 1989).

Na Figura 8 foi significativa a diferença da produção de IL-6 para os grupos IS e ISS, e não houve diferença significativa entre IS e PSNF, e entre ISS e R. Os grupos ISS e R foram os que liberaram maior quantidade desta citocina, que também é responsável por regular a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), conhecido como fator de permeabilidade vascular. Esse fator intervém na angiogênese, permitindo que os fluidos e as proteínas do plasma, principalmente a fibrina, se

extravasem, favorecendo a migração das células endoteliais e orientando a formação dos novos vasos sanguíneos. (KERBEL, 2000).

A presença de altas taxas de IL-6 no soro de pacientes com câncer de mama geralmente indica um prognóstico ruim, pois está associada à metástase, por facilitar a angiogênese (BACHELOT et al., 2003; BENOY et al., 2002). A angiogênese ou neovascularização é um processo biológico, onde novos vasos sanguíneos originam-se por brotamento ou germinação de vasos pré-existentes. O suprimento sanguíneo é um fator importante para o crescimento do tumor. Existem evidências experimentais e clínicas indicando que o tumor somente aumenta se for vascularizado (KUMAR et al., 1994). A supressão da angiogênese anormal é uma estratégia terapêutica importante para o tratamento das desordens angiogênese dependentes (YIHAI et al., 2002).

Os grupos ISS e R foram os que apresentaram maior quantidade de vasos (Figuras 14 e 15) no local do tumor. Os resultados estão coerentes com a elevada expressão de IL-6 para estes grupos; correlação positiva também quando avaliamos a influência do NO na ativação da angiogênese, uma vez que esse mediador apresentou uma liberação mais acentuada para estes dois grupos. Bachelot et al (2003) mediram a concentração de IL-6 e o VEGF no plasma de 87 pacientes com câncer de mama com metástase e em todos os pacientes foram detectados o fator de crescimento vascular endoteliais, sendo que 39% desses apresentaram elevados níveis de IL-6 no soro.

A inibição da angiogênese pode ser promovida por vários fatores, dentre eles a IL-12 tem sido utilizada na imunoterapia do câncer e regressão do tumor (DICKERSON et al. 2004 e ZITVOGEL, 1995). A regressão do tumor em consequência da administração de IL-12, é devido à sua capacidade de inibir a angiogênese, diminuindo a expressão dos fatores angiogênicos, tais como: VEGF e integrinas, proteínas necessárias para a remodelação vascular (ZITVOGEL,1995; GEE,1999).

A IL-12 é uma citocina heterodimérica composta pelas cadeias p35 (constitutiva) e p40 (induzível) que se encontram ligadas covalentemente e exercem um grande número de efeitos pleiotrópico. Ela é produzida por macrófagos e, em menores proporções, por linfócitos B. A IL-12 atua sobre células NK (*natural killer*) e T induzindo a produção de IFN- γ (SGADARI,1996). Além disso, a IL-12 induz a diferenciação de células CD4+ Th1 e subseqüentemente o desenvolvimento da resposta imune celular. Dessa forma, ela pode constituir uma importante ligação entre os mecanismos da resistência inata e da imunidade adquirida (DICKERSON et al. 2004).

Na Figura 9, podemos observar que os grupos IS e ISS produziram maior quantidade de IL-12 sem diferença significativa entre eles, enquanto que o grupo PSNF apresentou concentração menor deste mediador, sendo a diferença significativa com relação ao grupo IS e ISS. As dietas empregadas contribuíram para estimular a produção desta citocina, pois o grupo R, que não consumiu dieta especial, não expressou IL-12. Possivelmente, o maior comprometimento do grupo ISS já verificado pelos outros mediadores aqui estudados foi devido ao sinergismo entre as citocinas pró-inflamatórias e a expressão acentuada de NO, com conseqüente aumento da angiogênese.

Comparando-se os grupos ISS e R, a IL-12 pode ter ajudado na contenção do tumor no grupo suplementado, pois houve diferença significativa entre estes grupos, no que se refere à quantidade de vasos sanguíneos observada no tecido tumoral (Figuras 14 e 15) e o volume tumoral (Figura 4).

A IL-12 tem sido vista como um indutor da secreção de IFN- γ , promovendo o crescimento e ativação das células T e NK (SGADARI,1996). O IFN- γ é uma citocina pleiotrópica com um potente efeito anti-tumoral, pois controla o crescimento celular, aumenta a apoptose e diminui a angiogênese (DRANOFF, 2004).

Na Figura 11 de liberação de IFN- γ , os animais sem tumor do grupo IS foram os que apresentaram maior concentração de IFN- γ , enquanto nos animais com tumor os grupos IS e ISS não apresentaram diferença significativa, demonstrando a importância dessa citocina na contenção do tumor, resultados esses que estão de acordo com aqueles de TNF- α (Figura 7) nos animais sem tumor. O grupo PSNF dos animais com e sem tumor apresentou menores valores dessa citocina, e lembrando os resultados de IL-1 β , podemos atribuir parte dos efeitos benéficos observados com PSNF (< volume tumoral, < angiogênese) à concentrações moderadas de IL-1 β , mas não à presença de IFN- γ , embora o grupo PSNF tenha apresentado maior liberação deste do que o grupo R.

O sinergismo entre IFN- γ e TNF- α é importante, pois aumenta a apoptose celular via Fas ligante, ativando caspase 3 (LEE, 2002) e promovendo a desativação de integrina α e β , proteínas expressas por células endoteliais angiogênicas e essenciais para a proliferação de novos vasos, sendo necessárias para a remodelação vascular, intervindo na adesão e migração das células endoteliais (LEJEUNE, 2002; DAVEL, 2004), resultados que também estão de acordo com a produção destas citocinas no grupo IS sem tumor, e pode ter contido a formação de novos vasos (Figuras 14 e 15) e a proliferação celular (Figura 13) nos tumores dos animais deste mesmo grupo.

A IL-10 é uma importante citocina imunoregulatória e tem um papel central na manutenção do balanço da resposta imunológica, limitando a resposta pró-inflamatória; é produzida por diferentes tipos de células, incluindo células T e B, macrófagos e monócitos (MALEFYT et al, 1991).

Todos os grupos que consumiram dieta especial expressaram maior concentração de IL-10 quando comparados ao grupo R (Figura 10), os grupos PSNF e IS apresentaram maior concentração deste mediador em relação ao grupo ISS. Analisando-se a liberação de IL-10 nos grupos PSNF e IS e as liberações de IL-1 β (Figura 6), TNF-

α (Figura 7) e IL-6 (Figura 8), a IL-10 parece ter controlado a produção dessas citocinas, confirmando dados prévios da literatura que demonstram a IL-10 inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (MALEFYT et al., 1991).

Analisando-se os resultados obtidos até o momento no presente trabalho, podemos verificar que os animais do grupo ISS produziram menor quantidade de IL-10 e por outro lado apresentaram quantidades expressivas de IL-1 β , IL-12, TNF- α , IFN- γ e NO quando comparados com o grupo IS, justificando o porquê do volume tumoral do grupo ISS ser simplesmente o dobro quando comparado ao IS. A diferença entre as dietas dos grupos IS e ISS está na suplementação com isoflavonas. As isoflavonas estimulam o sistema imunológico, aumentam a atividade de linfócitos T, que liberam IFN- γ e ativam macrófagos (GUO, 2001), pode ser que esta ativação somada ao estímulo do produto fermentado, que também ativam linfócitos T e macrófagos (PERDIGON, 2001), tenha contribuído para a exacerbação da resposta imunológica..

As isoflavonas são compostos difenólicos e por isso são potentes antiinflamatórios, diminuem a angiogênese através da inibição do fator de crescimento vascular endotelial (LAMBERT et al, 2005); inibem o sinal de transdução da IL-1 β (FLOREZ et al, 2005), tudo indica que tais propriedades não foram suficientes para combater o processo inflamatório desenvolvido pelos animais do grupo ISS.

O que também pode ter contribuído para o aumento do tumor no grupo ISS foi o fato das isoflavonas serem fitoestrógenos e apresentarem estrutura química semelhante ao estrogênio endógeno 17 β estradiol, e terem afinidade com os receptores de estrogênio α , atuando, dessa forma, como um estrogênio fraco (BARNES, 1998; BARNES, 2004); por este grupo ter apresentado alta concentração de IL-1 β , pode ter havido um aumento da quantidade de receptores de estrogênio α , e esta interleucina

aumenta a transcrição desses receptores (ITO, 2002) e este fato pode ter favorecido a ação estrogênica das isoflavonas.

A dieta com suplementação de isoflavonas pode ter potencializado seu efeito estrogênico favorecendo o desenvolvimento do tumor. Phillips et al. (1998), verificaram que o consumo de 45mg/dia de genisteína (durante 14 dias), provocou um aumento do número de células epiteliais da mama, aumento da fase S (Síntese) da mitose e um pequeno aumento da expressão de receptores de progesterona.

Pesquisadores como Kurzer, 2003 e Ziegler, 2004 não recomendam a suplementação com isoflavonas, pela sua atividade estrogênica, principalmente a curto prazo, podendo estimular a proliferação celular. O efeito protetor das isoflavonas é observado em longo prazo, promovendo uma adaptação da glândula pituitária, diminuindo a expressão dos receptores de estrogênio (ER- α), receptor de progesterona e do fator de crescimento epidérmico (PHILLIPS, 1998; LAMARTINIERE, 2002). O risco de câncer de mama geralmente está associado com a exposição ao estrogênio e a presença de receptores de estrogênio e progesterona nas células cancerosas (GREENWALD, 2004). Setchell et al. (2001) também não recomendam a suplementação com isoflavonas por ser uma substância purificada e há necessidade de mais estudos sobre a dosagem deste composto. Setchell et al. (2003), analisaram a farmacocinética das isoflavonas, em 10 mulheres saudáveis, e verificaram que a excreção das isoflavonas diminui com o aumento da ingestão; e recomendam uma modesta ingestão de alimentos a base de soja, regularmente, para atingir uma concentração de isoflavonas no plasma; a modesta ingestão é melhor que produto enriquecido com isoflavonas.

Young et al. (2004), observaram que os camundongos Balb/c são muito influenciados por fitoesteróis e quando consomem dieta suplementada com fitosterol

aumenta o crescimento de células de adenocarcinoma MCF-7, com diminuição da taxa de estradiol no plasma. Os autores recomendam um consumo de fitosterol, na dieta, próximo ao recomendado para diminuir a taxa de colesterol, sendo que altas taxas de fitosterol e dietas suplementadas podem aumentar o crescimento de câncer de mama, dependente de estrogênio.

Quando analisamos a quantidade de estradiol nos soros dos animais na Figura 16B, os animais consumindo somente as dietas (sem implantação do tumor), observamos que os grupos IS, PSNF e ISS apresentaram uma redução deste hormônio quando comparados aos grupos R e C. Esses resultados podem ser devido à adaptação do organismo destes animais ao consumo de isoflavonas, tal como observado pelos fitoestrógenos da soja que influenciam potencialmente na regulação hormonal dos camundongos Balb/c (YOUNG, 2004). Setchell et al., (2001) e Lamartinire et al. (2002) confirmam esses resultados quanto à necessidade da adaptação do organismo, e Lamartinire (2000) atribui a proteção, que as mulheres asiáticas têm, contra o câncer de mama, ao consumo de produtos de soja desde a infância. Na Figura 16C, onde os animais receberam as diferentes dietas e apresentaram tumor, os grupos PSNF, IS e ISS permaneceram com valores menores de estradiol quando comparados com os grupos R e C, demonstrando que, mesmo na presença do tumor, a soja, provavelmente tenha conseguido controlar o nível de estradiol no soro.

A suplementação com isoflavonas, ao que parece, foi decisiva no início do desenvolvimento do tumor, podendo ter contribuído para a proliferação das células de adenocarcinoma (LM3) no grupo ISS (Figura 13). No final do experimento tudo leva a pensar que houve adaptação, tanto que a partir do 10º dia do desenvolvimento do tumor (Figura 3), totalizando aproximadamente 30 dias consumindo as dietas, podemos

observar que o grupo ISS acompanhou o aparecimento do tumor do grupo PSNF, muito embora o volume tumoral desse último tenha sido menor (Figura 4).

Ao analisarmos a proliferação celular no tecido do tumor, o grupo que apresentou maior número de mitoses foi o ISS (Figura 13). Allred et al. (2001), observou que as dietas com genistina (derivado da isoflavona glicosídeo) e genesteína (derivado da isoflavona aglicona) resultaram em um aumento da proliferação celular e aumento do tumor de mama induzido por células MCF-7 em camundongos e, que a remoção das isoflavonas da dieta, regrediu o tumor. Young et al. (2001), também observou que o aumento da concentração de genisteína no plasma foi suficiente para estimular o crescimento do tumor e proliferação celular de células MCF-7, de câncer de mama.

Rossi et al. (2004) determinaram a quantidade de isoflavonas totais nos produtos PSNF e IS, e observaram que não houve diferença significativa entre eles, uma vez que as culturas de *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 utilizadas no preparo do IS, não disponibilizam maior quantidade de isoflavonas agliconas, pois estas bactérias não são produtoras da enzima β -glicosidase responsável pela transformação de isoflavonas glicosídicas em isoflavonas agliconas.

A concentração de isoflavonas no PSNF é de $5,22 \pm 0,21$ (mg/100g) e IS é de $5,24 \pm 0,11$ (mg/100g). Os animais consumiram diariamente 1mL destes alimentos, que continham aproximadamente 0,05 mg de isoflavonas totais. No produto suplementado foi acrescido 1,125g de isoflavin e os animais do grupo ISS consumiram aproximadamente um valor de 0,09 mg/dia de isoflavonas totais. A concentração de isoflavonas no grupo ISS, quase o dobro, do que foi consumido pelos animais dos grupos IS e PSNF, pode ter influenciado na proliferação celular observada na Figura 13.

A flora intestinal de camundongos disponibiliza grande quantidade de equol (GU, 2006).

A análise histopatológica, no local do tumor, demonstrou que os tumores do grupo ISS apresentaram mitoses típicas, um diferencial favorável a este grupo, quando comparado ao grupo da R que apresentou mitoses atípicas. Os tumores dos grupos PSNF e IS apresentaram mitoses típicas, com padrão de células mais regular. Além de tudo, no grupo IS houve predomínio de linfócitos no local do tumor. Os grupos ISS e R apresentaram células anaplásicas (células indiferenciadas), a presença destas células é uma indicação da malignidade do tumor. A intensa proliferação favorece a formação de células anaplásicas. Os tumores, dos grupos ISS e R, mostraram intensa proliferação fato que contribuiu para o desenvolvimento das células anaplásicas

A apoptose ou morte celular programada, necessária para a manutenção da homeostasia em tecidos adultos e eliminação de células desnecessárias ou lesadas, não leva à indução de um processo inflamatório (GREEN,2003). A necrose ocorre quando a célula não é capaz de manter a homeostasia, produzindo estímulos e resposta inflamatória devido à liberação de componentes intracelulares (SARASTE, 2000).

A análise da apoptose e necrose dos macrófagos (Figura 17) foi importante para comparar os dois tipos de morte celular e associar ao processo inflamatório. O grupo IS apresentou maior número de apoptose e menor número de necrose e a diferença foi significativa quando comparada aos grupos PSNF, ISS e R, este fato pode ter contribuído para controle do processo inflamatório, caracterizado no grupo IS.

As dietas estudadas contribuíram para a contenção do tumor quando comparadas com o grupo R que não consumiu dieta especial, mas o grupo que consumiu IS foi mais eficiente no controle das citocinas pró e antiinflamatórias; e isso se deve às culturas de

L. helveticus e *E. faecium* juntamente com as propriedades da soja. O grupo PSNF apresentou menor volume tumoral devido ao controle do processo inflamatório e este fato se deve às propriedades da soja. A dieta com “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas exacerbou a resposta inflamatória, portanto a suplementação contribuiu para o comprometimento deste grupo.

Em vista de todos esses resultados, conclui-se que a dieta com “iogurte” de soja (IS) foi a mais eficiente no controle do desenvolvimento do adenocarcinoma de mama. A dieta com “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas contribuiu para o desenvolvimento do tumor.

VI. Conclusões

1. As dietas influenciaram no desenvolvimento do tumor, a dieta de “iogurte” de soja foi a mais eficiente para conter o tumor; a dieta do produto de soja não fermentado proporcionou um menor volume tumoral, em relação a dieta suplementada com isoflavonas; a dieta do “iogurte” de soja suplementado contribuiu para o desenvolvimento do tumor;
2. Houve estímulo das células macrófágicas e a liberação de óxido nítrico foi importante no processo imunológico, mas sua produção elevada contribuiu no desenvolvimento do tumor;
3. As citocinas tiveram um papel importante no desenvolvimento do tumor, a associação entre as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 contribuíram para o desenvolvimento do tumor; e IL-10, IFN- γ , IL-12 e TNF- α foram importantes para inibir o desenvolvimento do tumor;
4. Os tumores dos grupos IS e PSNF apresentaram menor proliferação celular e os grupos ISS e R maior proliferação celular; as células dos tumores dos grupos IS e PSNF são diferenciadas, enquanto que as células dos tumores dos grupos ISS e R são anaplásicas; Os grupos IS e PSNF apresentaram menor número de vasos no local do tumor, enquanto que, os grupos ISS e R apresentaram maior número de vasos;
5. As dietas PSNF, IS e ISS diminuíram a concentração de estradiol no soro dos animais pesquisados;
6. Os macrófagos do grupo IS apresentaram mais apoptose e menos necrose em relação aos grupos PSNF, ISS e R.

VII. Referências Bibliográficas

ABBAS, A . K.; LICHTMAN, A . H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 544p.

ADLERCREUTZ, H. Western diet and western disease: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. **Scand. J. Lab. Invest.**, v.50, S.201, p. 3-23, 1990.

ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-estrogens and Western disease. **Lancet**, v.29, n.2, p.95-120, 1997.

ALLRED, C.D. ; YOUNG, H. ; ALLREAD, K. ; CHANG, J. ; HELFERICH, W. Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. **Carcinogenesis**, v.22, p.1667-1673, 2001.

ANDERSON, J.W.; JOHNSTONE, B.M.; COOK-NEWELL, M.L. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **N.Engl. J.Med.**, 333: p.276, 1995.

BACHELOT, T; COQUARD, R.; MENETRIER, C. RASTKHA, M. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. **Br. J. Cancer** , v.88, p.1721-1726, 2003.

BELLINGAN, G.J.; COLDWELL, H.; HOWIE, S.E.M.; DRAUSFIELD, I.; HASLETT, C. In vitro fate of inflammatory macrophage during the resolution of inflammation. **J. Immunol.**, v.157, p.2577-2585, 1996.

BENASSAYAG, C.; PERROT-APPLANAT, M.; FERRE, F. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. **Journal of Chromatography** , v. 777, p.233-248, 2002.

BARNES, S. Phytoestrogens and breast cancer. **Clinical Endocrinol. Metab.**, v.12, n.4, p.559-579, 1998.

BARNES, S. Soy isoflavones- phytoestrogens and what else? **J. Nutr.**, v. 134, p.1225S-1228S, 2004.

BENOY, I.; SALGADO, R. COLPAERT, C. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer. **Clin. Breast Cancer**, v.2, p.311-315, 2002.

BLUM, S.; DELNESTE, Y.; DONNET, A; SCHIFFRFRIN, E.J. The influence of probiotic organisms on the immune response. In: **Nutrition and immunology: principles and practice**. Totowa, New Jersey: Humana, 2000. p 451-455.

- CARLOS, I.Z. **Interdisciplinariedade da imunologia**. 149f. Tese (Livre-Docência) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2001
- CARLOS, I.Z.; ROSSI, E. A; VENDRAMINI, R. C.; MACHADO, C.O.; CYRILLO, R.N.S.; PERAZZO, F.F.; VALDEZ, G.F. Evaluation of allergenic potential of novel fermented soymilk product. **Rev. Ciênc. Farm.** São Paulo, v.21, n.1, p.103-113, 2000.
- CONWAY, P.L.; GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R. Survival of lactic bacteria in human stomach and adhesion to intestinal cells. **J. Dairy Sci.**, v.70, p.1-12, 1987.
- COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammatory cells and cancer: think different! **J.Exp. Med.**, v.193, p.23-26, 2001.
- D'ALESSANDRO, T.; PRASAIN, J.; BENTON, M.R.; BOTTING, N. Polyphenols, inflammatory response, and cancer prevention: chlorination of isoflavones by human neutrophil. **J.Nutr.**, v.133, p.3773S-3777S, 2003.
- DAVEL, L; RIMMAUDO, L.; ESPANÖL, A. Different mechanisms lead to angiogenic process induced by tree adenocarcinoma cell lines. **Angiogenesis**, v.7, p.45-51, 2004.
- DE SIMONE, C; BIANCHI, S.B.; NEGRI, M; FERRAZZI, M. BALDINELLI, L. VESELY, R. The adjuvant effect on production of gamma-interferon by ConA stimulated human peripheral blood lymphocytes. **Nutr. Rep. Int.**, v.33, p.419-433, 1986.
- DICKERSON, E.; AKHTAR, N.; STEINBERG, H.; WANG, Z.; PADILHA, M.; AUERBACH, R.; HELFAND, S. Enhancement of antiangiogenic activity of interleukin-12 by peptide targeted delivery of the cytokine to integrin. **Mol. Cancer Res.**, v.2, p.663-673, 2004.
- DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews**, v.4, p.11-22, 2004.
- ERICKSON, K.L.; HUBBARD, N.E. Probiotic immunomodulation in health and disease. **J.Nutr.**, v.130, p. 403S-409S, 2000.
- FERREIRA, C.L. **Prébióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Célia L.L.F.Ferreira, 2003. 205p.
- FLÓREZ, S.M. et al. Quercetin attenuates nuclear factor- κ B activation and nitric oxide production in interleukin 1 β activated rat hepatocytes. **J. Nutr.**, v.135, p. 1359-1365, 2005.
- FULLER, R. History and development of probiotics. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Champ & Hall, 1992.
- GAUTHIER, N. et al. Tumor-derived and host-derived nitric oxide differentially regulate breast carcinoma metastasis to the lung. **Carcinogenesis**, v.25, p.1559-1565, 2004.

GEE, M.S.; KOCH, C.; EVANS, S.; JENKINS, T. Hypoxia-mediated apoptosis from angiogenesis inhibition underlies tumor control by recombinant interleukin 12. **Cancer Res.**, v.59, p.4882-4889, 1999.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of human colonic microbiota: introduction the concept of prebiotic. **J.Nutr.**, v.125, p. 1401-1412, 1995.

GILLILAND, S.E. Beneficial interrelationships between certain micro-organisms and humans: candidate microorganism for use as dietary adjuncts. **J.Food Prot.**, v.42, p.164-167, 1979.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A.W.H. **Kuby immunology**. 4 ed. New York: W.H. Freeman, 2000, 670p.

GUO, T.L.; MCCAY, J.; ZHANG, L.. Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in female B6CF1 mice. **J.Nutr.**, v.131, p.3251-3258, 2001.

GREEN, D.R. Overview: apoptotic signaling pathways in immune system. **Immunological Reviews**, v.193, p.5-9, 2003.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.; GLOGOWSKI, J.; SKKIPER, P.; WISHNOCK, J.; TANNEBAUM, S. . Analysis of nitrate, nitrite, and N nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, n.1, p.131-138, 1982.

GREENWALD, P. Clinical trial in cancer prevention: current results and perspectives for the future. **Am.J. Clin. Nutr.**, p.3507S-3511S.

HANDAYANI, R.; RICE, L.; CUI, Y. Soy isoflavones alter expression of genes associated with cancer progression, including interleukin-8, in androgen-independent PC-3 human prostate cancer cells. **American Society for Nutrition**, 136, 75-82, 2006.

HALPERN, G.M. et al. Influence of long-term yogurt consumption in young adults. **Int. J. Immunother**, v.7, p.205-210, 1991.

HENDERSON, B; BERSTAIN, L. The international variation in breast cancer rates: an epidemiological assessment. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.18, p.11S-17S, 1991.

HUDSON, J.; SHOAI, M. MAESTRO, R.; CARNEIRO, A.; HANNON, G.; BEACH, D. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. **J.Exp. Med.**, v.190, p.1375-1382, 1999.

ITO, L.S.; IWATA, H; HAMAJIMA, N. Significant reduction in breast cancer risk for Japanese women with interleukin 1B-31 CT/TT relative to CC genotype. **Jpn.J.Clin.Oncol.**, v.7, p.398-402, 2002.

ISOLAURI, E; SÜTAS; Y.; ARVILOMMI, H.. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clin. Exp Allergy**, v.30, p.1604-1610, 2000.

IZUMI,T., PISKULA M. ; OSAWA, S. Soy isoflavones aglicones are absorbed faster and higher amounts than their glucosides in humans. **J. Nutr.** , 130, 1695-1699, 2000.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. **Immunobiology the immune system in health and disease**. 3 ed. New York: Garland Publ., 1997.

JIN, L.; YUAN,R; FUCHS, A. Expression of interleukin-1 β in human breast cancer carcinoma. **Cancer**, 80, 421-433, 1997.

JIN, Z.; MacDONALD, R.S. Soy isoflavones increase latency of spontaneous mammary tumors in mice. **J. Nutr.**, v.132, p.3186-3190, 2002.

KELLOFF, G.J.; CROWELL, J.; STEELE, V.; LUBET, R.; MALONE, W.; BOONE, C.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E.; LIEBERMAN,R.; LAWRENCE, J.; ALI, I.; VINER, J.; SIGMAN,C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **J. Nutr.**, v.130, p. 467S-471S, 2000.

KERBEL, R., S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.505-515, 2000.

KEY, T.J.; PIKE, M.C. The role of estrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. **Eur.J. cancer. Cli. Oncol.** , v.1, p.29-43, 1988.

KISHIMOTO, T. The biology of interleukin-6. **Blood**, v.74, p.1-10, 1989.

KLAENHAMMER, T.R. Probiotic bacteria: today and tomorrow. **J. Nutr.**,v.130, p. 415S – 416S, 2000.

KUIPER, G.J.M.; LEMMEN, J.; CARLSSON,B.; CORTON, C.; SAFE, S.; SAAG, P.; GUSTAFSSON, P. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . **Endocrinology**, v.139, p.4252-4263, 1998.

KUMAR, V.; CONTRAN, R.S.; ROBBINS, S. L. **Patologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994. 608p.

KURZER, M.S. Phytoestrogen supplement use women. **J. Nutr.** ,v. 133, p. 1983S-1986S, 2003.

LAMARTINERE, C.A.; COTRONEO, M.; FRITZ, W. Genestein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. **J.Nutr**, v.132, p.552S-558S, 2002.

LAMBERT, J.D.; HONG, J.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **Am.J.Clin.Nutr.**, v.81, p.284S-289S, 2005.

LEBLANC, A.M.; PERDIGON,G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. **Med. Sci. Monit.** , p.BR96-BR104., 2004.

- LEBLANC, A.M.; MATAR, C.; THERIAULT, C. PERDIGON, G . Effect of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. **Breast Cancer Research**, v.7, p.R477-R486, 2005.
- LEBLANC, J.G. ; MATAR,C. VALDEZ, J.C. LEBLANC, J.; PERDIGON, G. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.2733-2742, 2002
- LEE. M.S. Cytokine synergism in apoptosis: its role in diabetes and cancer. **J. Biochem. Mol. Biol.** , v.31, p. 54-60, 2002.
- LEJEUNE, F. Clinical use of TNF revisited: improving penetration anti-cancer agents by increasing vascular permeability. **J.Clin. Invest.**, v.110, p.433-435.
- LEMONIQUE.G. Consumption of dairy produce and alcohol in case-control study of breast cancer. **J.Natl. Cancer Inst.**, v.77, n.3, p.633-636, 1986.
- LOWE, S.W.; LIN, A.W. Apoptosis in cancer.**Carcinogenesis**,v.21,p.485-495, 2000.
- MAKAHATADZE, N.J. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. **Hum. Immunol.**, v.59,n.9, p.571-579,1998.
- MALEFYT, R.W. ; ABRANS, J. BENNETT, B. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J.Exp. Med.** , v.174, p.1209-1220, 1991)
- MANOLAGAS, S.C. et al. Estrogen, cytokines and the pathophysiology of osteoporosis. In: KOHLER PO, ed. **Current opinion in endocrinology and diabetes**. Philadelphia;Current Science, 1994. p.275-281.
- MATAR,C. ; PERDIGON, G. Immunomodulating effect of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. **J. of Dairy Res.**, v.68, p.601-609, 2001.
- MEYDANI, S.N.; KIU HA, W. Immunologic effect of yogurt. **AJCN**, v.71, n.4, p. 861-872, 2000.
- MESSINA, M.J. Legumes and soybeans: overview of their nutrition profiles and health effects. **AJCN**, v.70, n.3, p.439S-450S, 1999.
- MESSINA, M.J.; LOPRINZI, C.L. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. **J. Nutr.**, v.131, n.11, p. 3095S-3108S, 2001.
- MESSINA, M.J Soy, soy phytoestrogens (isoflavones), and breast cancer. **AJCN**, v.70,n.4, p.574-575, 1999.
- METCHNIKOFF O. **Life of Elie Metchnikoff** . Boston: Houghton Mifflin , 1921.

MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; COSTA, B.L. Mudança na composição nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). **Rev. Saúde Pública**, v.34, n.3, 2000.

NEVES, W. S. et al. Cronobiologia e suas aplicações na prática médica. **Revista HB Científica**, v.7, p. , 2000.

PAIVA, A.M.R. **Efeito da ingestão de produtos derivados da soja na atividade anti-tumoral de macrófagos em câncer de mama experimental**. 98f. 2005. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara.

PANTCHENKO, A.G.; PUSHKAR, I.; ANDERSON, K.H.; WANG, Y. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. **Int. J. Oncol.** ,v.23, p.269-284, 2003.

PAPETTI, M.; HERMEN, I. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am.J.Physiol.** , v.282, p.C947-C970, 2002.

PERDIGÓN, G.; FULLER, R.; RAYA, R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. **Curr. Issues Intestinal Microbiol.** . v.2, p.27-42, 2001.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; NADER DE MACIAS, M.E.; ALVAREZ, S.; PESCE DE RUIZ HODALGO, A . Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* . **J.Dairy Sci.** v.70, p. 919-926, 1987.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; NADER DE MACIAS, M.E.; ROUX, M.E.; PESCE DE RUIZ HODALGO, A. The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. **J. Food Prot.** , v.53, p. 404-410, 1990.

PESTKA, J.J. Food, diet and gastrointestinal immune function . In: KINSELLA, J.E.. **Advances in food nutrition research**. San Diego: Academic Press, 1993. v.37, cap 1, p. 1-66.

PHILLIPS, M. ; et.al. Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in histologically normal human breast. **Am.J.Clin.Nutr.**, v.68, p.1431S-1436S, 1998.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, v.36, n.1-2, p.61-70, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v.46, n.2, p.211-226, 1981.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quim. Nova**, v.22, n.4., 1999.

RAYKOVA, V.; GLIBETIC, M.; OFENSTEIN, J.; ARANDA, J. Nitric oxide-dependent regulation of pro-inflammatory cytokines in group B streptococcal inflammation of rat lung. **Annals of Clinical Science**, v.33,p.62-67, 2003.

ROSSI, E.A . **Alimentos funcionais**. In: DÂMASO, A . Nutrição e exercício na prevenção de doenças. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. cap. 14, p.335-357.

ROSSI, E.A. **Desenvolvimento e avaliação biológica do potencial hipocolesterolêmico de um novo produto probiótico de soja**. 2000. 154f. Tese (Livre Docente em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2000.

ROSSI, E. A . ; VENDRAMINI,R.C.; CARLOS, I.Z.; OLIVEIRA, G.O .; VALDEZ, F.V..

Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normolipidêmicos. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.53, n. 1, p. 47-51, 2003.

ROSSI, E.A; ROSIER, I.; DÂMASO, A.; CARLOS, I.C.; VENDRAMINI, R.; ABDALLA, D.; TALARICO, V; MINTO, D. Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja. **Alim. Nutr.** , v.15, p.93-99, 2004.

RUIZ HODALGO, A . The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. **J.Food Prot.** v.53, p. 404-410, 1990.

RUIZ-LARREA, M.B. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. **Free Radic. Res.**,v.26, n.1, p.63-70, 1997.

SAARELA M; MOGENSEN,G.; FODÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol.**, v.84, p.197-215, 2000.

SABEL, M.S. Intratumoral IL-12 and TNF- α , loaded microspheres lead to regression of breast cancer and systemic antitumor immunity. **Ann Surg. Oncol.**,v.11, p. 147-156, 2004.

SABOYA, L.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A. Propriedades prolifáticas e terapêuticas de leites fermentados – uma revisão. **Bol.SBCTA**,v.31, n.2, p.176-185, 1997.

SGADARI, C.; ANGIOLILLO, A.L.; TOSATO, G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. **Blood.**, v.87, p.3877-3882, 1996.

SANDERS, M.E. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. **J. Nutr.**, v.130, p. 384S-390S, 2000.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.**,v.45, p.1455-1461, 2000.

SCHNEIDER, P.; TSCHOPP, J. Apoptosis induced by death receptors. **Pharm. Acta. Helv.**, v.74, p.281-286, 2000.

SHAHANI, K.M.; AYEBO, A D. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. **Am. J.Clin. Nutr.**, v.33, p.2448-2457, 1980.

SEDAS, V.; KUBIAK, K.; LÓPEZ, G. Los probióticos y su futuro. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.46, n.1, 1996.

SELLER, W., R.; FISHER, D.,E. Apoptosis an cancer drug targeting. **J. Clin. Invest.**, v.104, p.1655-1661, 1999.

SETCHELL, K.D.R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effrcets and relevance to human health. **Am. Soc. Nutr. Sci.**,v.22, p. 3166-3199, 1999.

SETCHELL, K.D.R. . Biodisponibility of pure isoflavones in healthy humans and analisis of comercial soy isoflavone suplementes. **J. Nutr.**, v.131, p.1362S-1375S, 2001.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.; DESAI, P. Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. **J. Nutr.** , v.133, p.1027-1035, 2003.

ST-ONGE, M.; FARNWOORTH, E.; JONES, P. Comsumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. **Am.J.Clin.Nutr.**, v.71, p. 674-681, 2000.

TEJADA-SIMON, M.V.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Ex vivo effects of Lactobacilli, Streptococci and Bilidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production om murine model. **J.Food Prot.**, v.62, p. 162-169, 1999.

THAM, D.M. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. **JCEM**, v.83, n.7, p.2223-2235.1998.

THOMPSON, L.U.; et al . The effect of fermented and unfermented milks on serun cholesterol. **Am.J.Clin.Nutr.**, v.36, n.6, p.1106-1111, 1982.

TOMERA, J.F. Yogurt: probiotic pharmacology. **Drugs Today**, v.32, n.7, p.539-551, 1996.

URTREGER, A .J.; LADADA, V.E.; PURICELLI, L.I.; RIVELL, A . VIDAL, M.D.C.; LUSTIG, E.S.; JOFFÉ, E.B.K. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new mirine mammary tumor cell lines. **Int. J.of Oncol.**, v.11, 1997.

VENDRAMINI, A. P. **Efeito da ingestão de um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* na produção de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio.** 96f. 2002. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2002.

WATER, J.; KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. **J.Nutr.**, v.129, p. 1492S-1495S, 1999.

WHEELER, D.S.;CATRAVAS, J.D.; ODOMS, K.; DENENBERG, V. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. **American Society for Nutritional Sciences**, p.1039-1044, 2004.

WINK, D.A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL,J.; LAVAL,F.;DEWHIST,M.; MICHELL, J. The multifactorial roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v.19, p.711-721, 1998.

YIHAI, C.; RENHAI, C.; EBBA, B. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, p.380-390, 2002.

YOUNG, H.J.; ALLRED, K.. β -Sitosterol, β -sitosterol glucoside, and a mixture of β -sitosterol and β -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and ovariectomized athymic mice. **J. Nutr.**, v.134, p.1145-1151, 2004.

YOUNG, H.J.; DOERGE,D. . Physiological concentration of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. **J. Nutr.**,v.131, p.2957-2962, 2001.

ZIEGLER, R. G. Phytoestrogens and breast cancer. **Am. J. Clin. Nutr.** ,vv.79, p.183-184., 2004.

ZITVOGEL,L., KROEMER, G. Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12. Effective delivery by genetically engineered fibroblasts. **J. Immunol.**,v.155, p.1393-1403, 1995.

ZHOU, J.; MUKHERJEE, P.; GUGGER, E.; TANAKA, T.; BLACKBURN; CLINTON,S.K. Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. **Cancer Res.**, v.58, p.5231-5238,1998.

Apêndice A

Tabela. 1- Número de células viáveis de cocos e bacilos (ufc/ml), nos diferentes lotes de produtos fermentados (“iogurte”).

Lote de Processamento	Cocos	Bacilos	Coloração de Gram
1	$11,9 \times 10^8$	$12,6 \times 10^8$	+
2	$17,7 \times 10^8$	$19,0 \times 10^8$	+
3	$15,8 \times 10^8$	$16,1 \times 10^8$	+
4	$70,6 \times 10^7$	$99,6 \times 10^7$	+
5	$16,0 \times 10^8$	$18,5 \times 10^8$	+
6	$18,0 \times 10^8$	$19,3 \times 10^8$	+
7	$60,3 \times 10^7$	$55,4 \times 10^7$	+
8	$15,4 \times 10^8$	$17,7 \times 10^8$	+

Os valores apresentados referem-se as médias de 3 determinações.

Tabela 2 - Número de células viáveis de cocos e bacilos (ufc/ml), nos diferentes lotes de produtos fermentados suplementados.

Lote de Processamento	Cocos	Bacilos	Coloração de Gram
1	$16,8 \times 10^8$	$17,3 \times 10^8$	+
2	$72,0 \times 10^7$	$10,9 \times 10^8$	+
3	$71,0 \times 10^7$	$86,0 \times 10^7$	+
4	$78,6 \times 10^7$	$90,6 \times 10^7$	+
5	$18,3 \times 10^8$	$19,5 \times 10^8$	+
6	$85,4 \times 10^7$	$74,0 \times 10^7$	+
7	$16,8 \times 10^8$	$15,1 \times 10^8$	+
8	$17,0 \times 10^8$	$16,4 \times 10^8$	+

Os valores apresentados referem-se as médias de 3 determinações.

Tabela 3 – Desenvolvimento do tumor

GRUPOS ESTUDADOS				
DIAS	Leite de soja	"Iogurte" de soja	"Iogurte" de soja suplementado	Ração
1	0	0	0	1
2	1	0	1	3
3	1	0	2	3
4	1	0	2	3
5	1	1	3	4
6	1	1	3	5
7	2	2	3	5
8	2	2	4	6
9	3	2	4	6
10	4	2	4	6
11	4	2	4	6
12	4	2	4	6
13	5	2	5	6
14	5	2	5	6
15	5	2	5	6
16	5	3	5	6
17	5	3	5	6
18	5	3	5	6

Tabela 4 – Volume do tumor (Zhou, 1998)

Grupos	PSNF	IS	ISS	R
	0,002	0,002	0,03	0,08
	0,002	0,001	0,03	0,04
	0,004	0,002	0,04	0,04
	0,003	0,001	0,03	0,03
	0,003	0,002	0,030	0,050
Média	0,003	0,002	0,032	0,048

Tabela 5 – Média e desvio padrão dos valores de NO (5×10^5 células)

Controle		PSNF		IS		ISS		R		com tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
2,3 ± 0,2	50,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1	75,3 ± 1,1	1,5 ± 0,1	62,3 ± 0,5	1,2 ± 0,2	101,1 ± 2,8	4,7 ± 0,1	86,5 ± 6,0	
Controle		PSNF		IS		ISS		R		sem tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
2,3 ± 0,2	50,6 ± 0,2	1,51 ± 0,1	83,4 ± 0,8	2,8 ± 0,2	70,6 ± 0,8	1,4 ± 0,1	67,5 ± 1,3	4,4 ± 0,3	83,1 ± 0,6	

Tabela 6 – Média e desvio padrão de valores de IL-1 β (pg/mL)

Controle		PSNF		IS		ISS		R		com tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
0	77 ± 7,7	0	109 ± 0,4	13,7 ± 1,3	141,5 ± 7,7	23 ± 0,5	403 ± 6,5	17,8 ± 0,5	70,3 ± 9	
Controle		PSNF		IS		ISS		R		sem tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
0	77 ± 7,7	0	168 ± 6,8	15,3 ± 0,4	167 ± 6,4	25,2 ± 0,7	164,3 ± 9,1	17,8 ± 0,1	125 ± 3,1	

Tabela 7 – Média e desvio padrão de valores de TNF- α (pg/mL)

Controle		PSNF		IS		ISS		R		com tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
0	14 ± 0,3	0	74,2 ± 2,8	0	76 ± 3	0	88,9 ± 2,2	0	37,3 ± 4,5	
Controle		PSNF		IS		ISS		R		sem tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
0	14 ± 0,3	0	75,6 ± 2,7	0	136,7 ± 2,7	0	77,3 ± 1	0	57,8 ± 3,6	

Tabela 8 – Média e desvio padrão de valores de IL-6 (pg/mL)

Controle		PSNF		IS		ISS		R		com tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
18,5±2,1	104,1±6,2	64,7±1,7	125,1±2,1	82,3±0,5	123±15	81,7±4,2	141±0,8	75±2,2	143±1,3	

Tabela 9 – Média e desvio padrão de valores de IL-12 (pg/mL)

Controle		PSNF		IS		ISS		R		com tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
0	0	0	35±6,4	0	66±7,8	0	71,6±8,3	0	0	

Tabela 10 – Média e desvio padrão de valores de IL-10 (pg/mL)

Controle		PSNF		IS		ISS		R		com tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
0	0	4,3±0,4	16±0,8	4,4±0,4	15,3±0,5	4,6±0,4	10±0,1	0	5±0,1	

Tabela 11 – Média e desvio padrão de valores de IFN- γ (pg/mL)

Controle		PSNF		IS		ISS		R		com tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
2,4±0,2	6,3±0,9	6,9±0,7	17,7±1,4	3,5±0,4	45,4±1,9	4,7±0,1	47,8±7,1	3,6±0,1	14,3±1,4	
Controle		PSNF		IS		ISS		R		sem tumor
C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	C -	C +	
2,4±0,2	6,3±0,9	6±0,8	26,6±1	4,1±0,4	57,7±1,4	4,8±0,8	32±4,7	3,8±0,7	5,2±0,8	

Tabela 12 – Média e desvio padrão de vasos sanguíneos no tumor

PSNF	IS	ISS	R
1,6±0,5	1,2±0,4	6,2±0,7	8±0,6

Tabela 13 – Média e desvio padrão de valores de estradiol (pg/mL)

sem dieta	Controle	PSNF	IS	ISS	R
	21±0,8	22±1,6	20±0,5	20±0,5	20±0,5
com dieta	Controle	PSNF	IS	ISS	R
	36,7±4,7	22,2±1,4	20±0	26,8±4,3	38,2±5,2
dieta e tumor	Controle	PSNF	IS	ISS	R
	40,2±5,8	25,2±5,8	24,8±6,1	22±1,5	35±4,4

Tabela 14 – Média e desvio padrão de mitoses no local do tumor

PSNF	IS	ISS	R
23,6±0,5	20,4±0,5	33±1,2	28,2±1,1

Tabela 15 – Média e desvio padrão de apoptose e necrose em macrófagos

PSNF		IS		ISS		R	
Apoptose	Necrose	Apoptose	Necrose	Apoptose	Necrose	Apoptose	Necrose
25 ± 0,5	7 ± 0,4	34 ± 0,5	3 ± 0,5	24 ± 0,5	6 ± 0,5	20 ± 0,4	4,6 ± 0,5