

Livia Carolina de Alencar Ribeiro

Modulação da resposta imune através do
consumo de produto probiótico de soja
durante o desenvolvimento de
câncer de mama murino experimental

Araraquara

2010

**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara**

LÍVIA CAROLINA DE ABREU RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Programa em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (subárea de Imunologia Clínica), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara, SP
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R484m Ribeiro, Livia Carolina de Abreu
Modulação da resposta imune através do consumo de produto probiótico de soja durante o desenvolvimento de câncer de mama murino experimental.
/ Livia Carolina de Abreu Ribeiro. – Araraquara, 2010.
124 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia

Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

1.Sistema imune. 2.Câncer de mama. 3.Soja. 4. Probiótico. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

Apresentação

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara com auxílio de bolsa CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida, a minha família: meus pais **Denise** e **Rinaldo** e meu irmão **Rafael**, que souberam compreender minhas ausências e não mediram esforços para a realização deste trabalho.

Agradecimientos

Ao Tempo, que me moldou e me deu calma, coragem e persistência.

A Deus, em nome do que eu ainda não sei, em nome da crença que tive em que tudo daria certo, em nome do acaso, da sorte, e de algo mais...

À minha Família, que sempre esteve ao meu lado, com paciência, compreensão, atenção e amor.

Esta conquista é de vocês também!

Obrigada por tudo!

À minha Querida orientadora Tracilda Zeppone Carlos, por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança depositada, por toda a paciência, e por toda a exigência também. Eu não seria a pesquisadora que sou hoje sem você me guiando até aqui! Obrigada!

Aos Amigos presentes no dia-a-dia do laboratório e aos que estão distantes, que me confortaram, me alegraram, me apoiaram e me ajudaram constantemente ao longo deste trabalho.

À Marisa Campos Polesi Placeras, por todo o apoio, indispensável para a conclusão deste trabalho, e por toda a amizade e dedicação.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição e à Rosely, pela ajuda e compreensão em cada passo deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Resumo

RESUMO

No Brasil, o câncer é a segunda principal causa de morte, sendo o câncer de mama o segundo mais frequente entre as mulheres. Um tumor sólido é composto pelo tecido neoplásico, células estromais e o sistema imune. Todas as células envolvidas produzem mediadores de forma local e sistêmica que influenciam no desenvolvimento do tumor. Os macrófagos ativados se polarizam e são capazes de ativar uma resposta imune celular, induzindo as células T para um padrão Th1, eficaz na eliminação de tumores; ou ativar uma resposta imune humoral, induzindo Th2, ineficiente contra o câncer. Na teoria, uma imunoterapia eficiente poderia alterar a ativação das células envolvidas e gerar uma inflamação voltada para um padrão de resposta celular, que gerasse a destruição das células cancerígenas. Dentre as possíveis imunoterapias, encontra-se o consumo de alimentos funcionais. A soja vem sendo estudada como um dos alimentos capazes de prevenir o câncer de mama a longo prazo. Além disso, as bactérias probióticas, parecem ser capazes de prevenir o câncer. Neste trabalho, procuramos observar o potencial do produto de soja fermentado por *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 enquanto alimento funcional capaz de modular o sistema imune e exercer influência no desenvolvimento de câncer de mama experimental murino. Os animais consumiram diariamente produto não fermentado de soja (PNFS), produto fermentado de soja acrescido (PFSI) ou não (PFS) de isoflavonas por 40 dias, sendo o inóculo tumoral realizado no décimo dia. PNFS, PFS e PFSI elevam a produção de TNF- α , e PFS e PFSI eleva a atividade da enzima arginase de macrófagos peritoneais. PFS gera uma redução na produção de IFN- γ e PNFS, PFS e PFSI reduzem os níveis de IL-5 produzidos por linfócitos esplênicos. O volume tumoral é menor em PFS e PFSI, e o número de células apoptóticas é maior. O produto influencia no

desenvolvimento tumoral de forma benéfica, mas não fica claro se esta ação ocorre devido sua influência no sistema imune.

Palavras-chave: sistema imune, câncer de mama, produto fermentado de soja, probiótico, citocina, macrófago, linfócito

Abstract

ABSTRACT

In Brazil, cancer is the second main cause of death, and breast cancer is the second more frequent neoplasia in women. A solid tumor contains neoplastic tissue, stromal cells and immune cells. All cells present in this microenvironment may produce mediators locally and systemically which can influence tumor development. Activated macrophages polarize and are capable of activating a cellular response, inducing T cells into a Th1 cytokine pattern, which is effective against tumor; or activate a humoral response, leading T cells into Th2, unable to fight cancer properly. In theory, an effective immunotherapy could activate involved cells and trigger an acute inflammation, with a cellular pattern, capable of destroying cancer cells. One of the possible therapies is the use of functional food. Soy has been studied as one of the foods capable of preventing breast cancer in a long-term diet. Besides, probiotic bacteria seems to be able to prevent cancer as well. In the present work, we intended to observe the potential of a soy product fermented using *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416 as a functional food capable of modulating the immune system and influencing on experimental murine mammary tumor growth. Animals were fed daily non-fermented soy product (PNFS), fermented soy product (PFS) or fermented soy product plus isoflavones (PFSI) during 40 days, and tumor implant was performed on 10th day. PNFS, PFS and PFSI showed a higher production of TNF- α , while PFS and PFSI also showed a higher arginase activity by peritoneal macrophages. PFS reduced IFN- γ production, while PNFS, PFS and PFSI reduced IL-5 levels on splenic lymphocytes culture. Final tumor volume is reduced in PFS and PFSI, while number of apoptotic cells is elevated in these two groups. It appears that the product may influence on tumor development in a good way, but it is not clear whether the immune system is important in this effect.

Keywords: immune system, breast cancer, fermented soy product, probiotics, cytokines, macrophages, lymphocytes

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isoflavonas da soja e metabolismo da daidzeína.....	42
Figura 2. Ensaios realizados a partir de macrófagos peritoneais dos animais de todos os grupos de estudo.....	51
Figura 3. Ensaios realizados a partir da obtenção de linfócitos esplênicos de animais de todos os grupos de estudo.....	51
Figura 4. Grau de angiogênese no tumor.....	69
Figura 5. Vasos sanguíneos tumorais.....	70
Figura 6. Quantidade de células em mitose no tumor.....	71
Figura 7. Mitose em células tumorais.....	72
Figura 8. Quantidade de células em apoptose no tumor.....	73
Figura 9. Células tumorais apoptóticas.....	74
Figura 10. Produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais.....	76
Figura 11. Atividade da arginase em culturas de macrófagos peritoneais.....	78
Figura 12. Produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	80
Figura 13. Produção de IL-12 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	82
Figura 14. Produção de IL-6 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	84
Figura 15. Produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	86
Figura 16. Produção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	88
Figura 17. Produção de IL-4 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	90
Figura 18. Produção de IL-5 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	92
Figura 19. Produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média do número de células viáveis em lotes do produto fermentado de soja, contadas através da utilização de meio MRS para lactobacilos e M17 para enterococos.....	67
Tabela 2. Peso e volume tumoral de adenocarcinoma mamário murino extraído dos animais dos diferentes grupos.....	68
Tabela 3. Grau de angiogênese no tumor.....	69
Tabela 4. Quantidade de células em mitose no tumor.....	71
Tabela 5. Quantidade de células em apoptose no tumor.....	73
Tabela 6. Produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais.....	76
Tabela 7. Atividade da arginase em culturas de macrófagos peritoneais.....	78
Tabela 8. Produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	80
Tabela 9. Produção de IL-12 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	82
Tabela 10. Produção de IL-6 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	84
Tabela 11. Produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	86
Tabela 12. Produção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	88
Tabela 13. Produção de IL-4 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	90
Tabela 14. Produção de IL-5 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	92
Tabela 15. Produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	94

Lista de

Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
µM	micromolar
ANOVA	Análise de variância
CO ₂	Dióxido de carbono
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
IFN-γ	Interferon-gama
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico
NF-κB	Nuclear Factor κB
ng/mL	Nanogramas por mililitro
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
pg/mL	Picogramas por mililitro
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura – série 1640)
Th1	Tipo de linfócito T <i>helper</i>
Th2	Tipo de linfócito T <i>helper</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
xg	Força Centrífuga Relativa

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO LITERÁRIA.....	26
2.1. O câncer.....	27
2.2. O câncer e a imunovigilância.....	28
2.3. A dieta, a resposta imune sistêmica e o câncer.....	33
2.4. Soja, isoflavonas e o câncer de mama.....	40
2.5. Probióticos, o sistema imune e o câncer.....	43
2.6. Estudos anteriores sobre o produto fermentado de soja.....	45
3. OBJETIVOS.....	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1. Delineamento experimental.....	50
4.2. Animais.....	52
4.3. Produtos de soja.....	52
4.3.1. Preparo do produto fermentado de soja (PFS).....	52
4.3.2. Preparo do produto não fermentado de soja (PNFS).....	53
4.3.3. Preparo do produto fermentado de soja acrescido de isoflavonas (PFSI).....	53
4.3.4. Viabilidade celular das bactérias fermentadoras dos produtos de soja.....	53
4.4. Implante de células tumorais.....	53
4.5. Grupos de estudo.....	54
4.6. Obtenção dos tumores.....	55
4.7. Determinação da ocorrência de apoptose em células tumorais por TUNEL.....	55
4.8. Análise da angiogênese pelo Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS).....	56
4.9. Determinação da presença de mitoses.....	57
4.10. Obtenção de células do exsudato peritoneal.....	57
4.11. Obtenção das células esplênicas.....	58

4.12. Obtenção do sobrenadante de cultura de macrófagos.....	59
4.13. Obtenção do sobrenadante de cultura das células esplênicas.....	59
4.14. Determinação de citocinas.....	60
4.15. Avaliação da viabilidade celular de células peritoneais aderentes.....	61
4.16. Avaliação da viabilidade celular de células esplênicas não aderentes.....	62
4.17. Determinação da produção de óxido nítrico.....	63
4.18. Determinação da atividade da arginase em macrófagos peritoneais.....	64
4.19. Análise estatística.....	65
5. RESULTADOS.....	66
5.1. Quantidade de bactérias probióticas no produto fermentado de soja.....	67
5.2. Análise macroscópica e microscópica do tumor.....	67
5.3. Determinação do volume tumoral.....	68
5.4. Determinação do grau de angiogênese nos tumores.....	69
5.5. Quantidade de mitoses nos tumores.....	70
5.6. Quantidade de células em apoptose nos tumores.....	72
5.7. Avaliação da citotoxicidade de macrófagos peritoneais e linfócitos esplênicos através da técnica de MTT.....	74
5.8. Determinação da produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais.....	75
5.9. Determinação da atividade da arginase em macrófagos peritoneais.....	77
5.10. Determinação da citocina TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	79
5.11. Determinação da citocina IL-12 em culturas de macrófagos peritoneais.....	81
5.12. Determinação da citocina IL-6 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	83
5.13. Determinação da citocina IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	85
5.14. Determinação da citocina IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	87
5.15. Determinação da citocina IL-4 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	89
5.16. Determinação da citocina IL-5 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	91

5.17. Determinação da citocina IL-10 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.....	93
6. DISCUSSÃO.....	95
7. CONCLUSÕES.....	109
8. REFERÊNCIAS.....	111

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo que engloba mais de 100 tipos de doenças, caracterizadas por alteração genética celular e proliferação exacerbada. No Brasil, o câncer é a segunda principal causa de morte, sendo o câncer de mama o segundo mais frequente entre as mulheres.

Os tumores surgem ao longo da vida, mas podem ser eliminados pelo sistema imune antes de se desenvolver e se tornar um câncer clinicamente detectável. Entretanto, os tumores podem se evadir do sistema imune e estas células acabam sendo selecionadas para sobreviver e se expandir neste ambiente hostil. Um tumor sólido, como o câncer de mama, é composto de diferentes compartimentos celulares, incluindo o tecido neoplásico em si, as células da matriz estromal e o sistema imune. Todas as células envolvidas produzem mediadores de forma local e sistêmica que influenciam no desenvolvimento e/ou erradicação do tumor. Os macrófagos ativado se polarizam e são capazes de ativar uma resposta imune celular, induzindo as células T para um padrão Th1, eficiente na eliminação de tumores; ou ativar uma resposta imune humoral, induzindo Th2, ineficiente contra o câncer.

Na teoria, uma imunoterapia eficiente poderia alterar a ativação das células envolvidas e transformar o processo inflamatório favorável ao tumor em uma inflamação aguda, voltada para um padrão de resposta celular, que gerasse a destruição das células cancerígenas. Dentre as possíveis imunoterapias, encontra-se o consumo de alimentos funcionais. A soja vem sendo estudada como um dos alimentos capazes de prevenir o câncer de mama a longo prazo. Esta ação da soja parece ser desenvolvida principalmente pela presença de isoflavonas, especialmente genisteína, daidzeína e o seu metabólito equol. Outro aspecto da dieta que contribui para o bem-estar do organismo é a possível presença de bactérias probióticas. Tem sido proposto que a ingestão de produtos probióticos pode aumentar a resistência às infecções e também apresentam potencial de prevenir o câncer.

Neste trabalho, procuramos observar o potencial do produto de soja fermentado por *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 enquanto alimento funcional capaz de modular o sistema imune e exercer influência no desenvolvimento de câncer de mama experimental murino. Para isto, observamos se os camundongos portadores de câncer de mama que receberam o alimento diariamente apresentavam uma melhor resposta celular, através da dosagem de IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais, e de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ em cultura de linfócitos esplênicos, e se tais animais apresentavam um crescimento tumoral diferenciado, verificado através do volume tumoral final, da presença de mitoses, de células apoptóticas e do grau de angiogênese local.

Revisão

Literária

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1. O câncer

Câncer é um termo que engloba mais de 100 tipos de doenças, caracterizadas por alteração genética celular, fazendo com que estas células se dividam sem controle, podendo invadir tecidos próximos ou por meio da circulação sanguínea e do sistema linfático (MERIC et al., 2006).

Os cânceres surgem através de um processo que compreende diversas etapas, envolvendo a desregulação de oncogenes, genes supressores de tumor e sinais apoptóticos. Os oncogenes geralmente são genes ligados à progressão do ciclo celular, à produção de fatores de crescimento e à sobrevivência da célula. Por outro lado, os genes supressores de tumor são aqueles que retardam o avanço no ciclo e que estimulam a apoptose. Em uma célula normal, há um balanço de diversos genes que influenciam no ciclo celular, no programa de diferenciação da célula e nos mecanismos de morte. Em um tumor, as alterações genéticas iniciais resultam em hiperproliferação de células anteriormente normais, e subsequentes mutações em oncogenes levam ao desenvolvimento de um tecido pré-canceroso displásico. Estas alterações iniciais ativam genes supressores de tumor que suprimem o ciclo celular e podem induzir a apoptose. São as mutações dos genes supressores de tumor ou de moléculas intracelulares ligadas a eles e aos mecanismos que eles controlam que fazem com que este tumor inicial se torne um câncer. O acúmulo de novas mutações nas células-filhas devido à proliferação acentuada, à instabilidade genômica e às prévias alterações genéticas pode influenciar na angiogênese, migração e metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2000; RAULET e GUERRA, 2009).

No Brasil, o câncer é a segunda principal causa de morte desde 2003. Para as mulheres, o câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo e no Brasil, respondendo

por aproximadamente 22% do total de casos novos a cada ano, um risco estimado para 2010 de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Este tipo de neoplasia é relativamente raro antes dos 35 anos, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. Os fatores de risco mais comumente descritos para pessoas que não possuam tendência genética clara são: idade, menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal. Além disso, os hábitos de vida, como a dieta e a prática de exercícios físicos, influenciam no desenvolvimento de diversos tipos de tumores (INCA, 2009).

Diversos modelos experimentais se utilizam de linhagens de células tumorais humanas e murinas para pesquisas envolvendo o tratamento ou a prevenção desta doença. A linhagem LM3 é obtida a partir de cultura primária derivada de adenocarcinoma de mama murino em Balb/c. As células LM3 expressam constitutivamente altas concentrações de receptores colinérgicos muscarínicos em comparação com células do epitélio mamário murino normal. Estes receptores têm um poder de controle sobre o ciclo da L-arginina, podendo levar à geração de citrulina ou uréia. Estas células não aparentam serem sensíveis à hormonioterapia, além de possuírem a enzima óxido nítrico sintase, que produz NO de forma constitutiva (ESPAÑOL et al., 2002). Estudos com células LM3 demonstram que estas são capazes de metástase espontânea ao pulmão e são pouco sensíveis à citotoxicidade mediada por NO-exógeno, quando comparadas às células similares do tipo LM2 (EIJÁN et al, 1998).

2.2. O câncer e a imunovigilância

Em 1909, Paul Erlich desenvolveu a hipótese de que o sistema imune poderia controlar o desenvolvimento do câncer (ERLICH, 1909; revisto por ULLRICH et al., 2008). Muitos anos mais tarde, em 1970, Burnet estabeleceu um conceito que mudou a visão em relação ao câncer. Ele postulou a Teoria da Imunovigilância contra Tumores. Segundo esta

teoria, os tumores surgiriam com uma frequência maior do que se imaginava, e seria uma função primordial do sistema imune eliminar estas células antes de formarem um tumor clinicamente detectável. Sendo assim, apenas quando a célula tumoral fosse capaz de evitar a resposta imune, ela poderia proliferar a partir de um tecido normal e expandir para desenvolver um tumor (BURNET, 1970; revisto por CROCI et al., 2007). Estes trabalhos identificaram inicialmente que o sistema imune poderia combater o câncer e, mais tarde, que poderia combatê-lo antes mesmo de sua completa formação.

Uma resposta imune bem sucedida contra neoplasias inicia-se pelo reconhecimento de antígenos presentes nas células tumorais. Vários tipos de cânceres estão ligados à presença de agentes infecciosos, especialmente vírus capazes de modificar o material genético da célula hospedeira. Nestes casos, a célula transformada pode expressar desde o seu início mais precoce antígenos não próprios originalmente codificados pelos patógenos, e desta forma ser alvo de células imunes, incluindo linfócitos B e T. Outros cânceres surgem espontaneamente. Nestes tumores, antígenos próprios são por vezes super-expressos e podem vir a ativar o sistema imune adaptativo, quebrando a auto-tolerância codificada nos linfócitos durante seu desenvolvimento. Entretanto, se a auto-tolerância permanece, os linfócitos que seriam eventualmente capazes de reconhecer o antígeno são imunossuprimidos. Nestes casos, a supressão do tumor só poderá ocorrer através do sistema imune inato (RAULET e GUERRA, 2009).

Em geral, a resposta adaptativa é iniciada por sinais associados à inflamação, que é desencadeada pelo sistema imune inato. Estes sinais são cruciais para a diferenciação posterior de uma resposta imunoprotetora ou não. A tumorigênese é um processo complexo, com desregulação de vários mecanismos celulares, e cabe às células do sistema inato conseguir diferenciar uma célula normal de uma alterada. Entretanto, muitas das características apresentadas por células transformadas, como proliferação, invasão tecidual e

repressão dos mecanismos de apoptose, podem ser expressas por células normais em diversos contextos, especialmente sob estresse celular. O reconhecimento da célula transformada ocorre mediante a identificação de diversos sinais que coletivamente, mas não individualmente, identificam a alteração celular. Estes sinais incluem a expressão de oncogenes de forma persistente, a repressão de genes supressores de tumor, indispensável para a progressão do ciclo celular, mas que gera instabilidade genômica, o acúmulo de anormalidades cromossômicas e, tardiamente, com frequência ocorre a ativação de outros mecanismos induzidos por estresse celular. Além disto, muitas células tumorais apresentam em sua superfície ligantes capazes de ativarem células *natural killer* (NK) e, em alguns casos, células T, ou ainda capazes de ativarem mecanismos intracelulares de apoptose. Os mecanismos inatos podem promover uma resposta adaptativa mais intensa e capaz de gerar memória imunológica, mantendo uma proteção sistêmica (RAULET e GUERRA, 2009).

Por sua vez, a resposta imune desencadeada influencia o crescimento tumoral e acaba por selecionar as células tumorais mais aptas a sobreviverem neste ambiente hostil. Este processo é chamado de edição tumoral, e compreende três fases. A primeira fase é a “eliminação”, que inclui o conceito de imunovigilância, ou seja, o sistema imune como um todo está sempre reconhecendo e destruindo tumores, conforme eles vão surgindo, ao longo de toda uma vida. A segunda fase é o “equilíbrio”: enquanto o tumor tende a crescer, a resposta imune destrói as células tumorais e é criado um equilíbrio dinâmico. A terceira fase é o “escape”, na qual as células tumorais acabam gerando variantes capazes de evadir da destruição causada pela resposta imune e então proliferar e se desenvolver em neoplasias aparentes clinicamente (CROCI et al., 2007).

Esta evasão das células tumorais pode ocorrer através da redução de antígenos capazes de gerar resposta, sendo subexpressos, eliminados ou modificados. As células displásicas também podem ativar sinais negativos co-estimuladores, que geram tolerância nas células

imunes, produzir fatores imunossupressores ou gerar mediadores capazes de expandir e recrutar preferencialmente populações de células imunes regulatórias (células T regulatórias - Tregs -, células supressoras mielóides e células dendríticas regulatórias) (CROCI et al., 2007).

Um tumor sólido, como o câncer de mama, é composto de diferentes compartimentos celulares, incluindo o tecido neoplásico em si e as células da matriz estromal, ambos podendo interagir com o sistema imune (CROCI et al., 2007). O microambiente tumoral contém também células imunes, que são um participante indispensável no processo neoplásico. Todas as células envolvidas produzem mediadores de forma local e sistêmica que influenciam dramaticamente no desenvolvimento e/ou erradicação do tumor. A inflamação associada ao câncer é similar àquela observada em situações crônicas, com produção de fatores de crescimento e angiogênicos, que em uma fase mais tardia acabam promovendo a sobrevivência, implantação e o crescimento do câncer. Esta inflamação relacionada aos tumores é gerada principalmente por células do sistema imune e acarreta infiltração leucocitária, principalmente de macrófagos associados ao tumor (TAM), expressão de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) ou interleucina-1 (IL-1), quimiocinas, remodelamento tecidual e angiogênese (ALLAVENA et al., 2008; MANTOVANI et al., 2008).

A inflamação associada ao tumor também ocorre quando a resposta imune já não está muito eficiente, devido à edição tumoral e à imunossupressão local. Por causa disto, atualmente tem sido postulada uma nova teoria, que diz que a inflamação pode ser gerada por um caminho intrínseco, partindo das próprias células tumorais, por meio de seus oncogenes ativos, e não somente partindo do meio que as circunda. Seguindo a teoria da inflamação derivada de oncogenes, algumas revisões literárias destacam fatores tumorais que auxiliam na geração de inflamação diretamente e estão geneticamente alterados em vários cânceres, como o fator de von Hippel Lindau (vHL), fatores induzíveis por hipóxia (HIF) e moléculas de

sinalização intracelular, como o Ras, ou fatores de transcrição, como o NF-kB (ALLAVENA et al., 2008; BORRELLO et al., 2008).

A angiogênese tumoral normalmente se ativa durante os estágios pré-neoplásicos do desenvolvimento tumoral e é regulada positiva ou negativamente por células tumorais e leucócitos. Dentre outros fatores, as células tumorais produzem mediadores capazes de atrair os macrófagos, o que ocorre de forma mais intensa em estado de hipóxia. Os macrófagos são capazes de produzir fatores pró-angiogênicos, como fatores de crescimento, citocinas, enzimas proteolíticas, proteoglicanos, mediadores lipídicos e prostaglandinas, mas também são capazes de gerar moléculas anti-angiogênicas, que danificam a integridade das veias sanguíneas. Entretanto, as funções pró-angiogênicas tendem a ser mais importantes. É demonstrado que sem infiltração macrofágica, não ocorre angiogênese em tumor de mama. Além de seu papel direto na angiogênese, os macrófagos também podem atuar recrutando outras células inflamatórias para o microambiente tumoral, especialmente neutrófilos. Além dos macrófagos e neutrófilos, células imunossupressoras mielóides e células dendríticas podem contribuir para a linfangiogênese e angiogênese no câncer (LIN E POLARD, 2007; ALLAVENA et al., 2008; NOONAN et al., 2008; ONO, 2008).

Com o crescimento tumoral acelerado, que rapidamente esgota as reservas nutricionais antes de novos vasos se formarem, e com a presença de diversos mediadores neste microambiente, grandes quantidades de células neoplásicas morrem, tanto através de apoptose quanto de necrose. A apoptose é um padrão de modificações morfológicas nas células que culminam com a morte destas. Este processo envolve condensação da cromatina (picnose), fragmentação nuclear (cariorrexe), redução do citoplasma e, finalmente, desintegração da célula em corpos apoptóticos envolvidos por membrana. Estas modificações costumam ser observadas apenas *in vitro*, pois *in vivo* as células em processo apoptótico são rapidamente fagocitadas antes de chegarem aos estágios finais. A necrose se caracteriza morfológicamente

por um aumento do citoplasma (oncose) e das organelas citoplasmáticas, com presença de vacúolos, seguido por um rompimento da membrana e liberação do conteúdo celular, o que *in vivo* pode ser acompanhado de fagocitose e inflamação. Acreditava-se que a diferença morfológica entre os dois principais tipos de morte celular gerava imunotolerância para a apoptose e resposta imune para a necrose. Entretanto, este conceito não procede mediante uma verificação experimental mais vigorosa. Ainda assim, a necrose é frequentemente acompanhada de inflamação e, em um microambiente tumoral, este tipo de morte celular tende a auxiliar o crescimento tumoral. A morte celular, independente de sua morfologia, pode vir a causar resposta imune ou não e a principal diferença entre a morte imunogênica e a não imunogênica parece estar na ordem de exposição de moléculas associadas ao estresse celular, que são reconhecidas primariamente por células dendríticas, que atuam modulando a resposta imune inata e então definem a ação imune (TESNIERE et al., 2008; ULLRICH et al., 2008).

Na teoria, uma imunoterapia eficiente poderia alterar a ativação das células envolvidas e transformar este processo inflamatório favorável ao tumor em uma inflamação aguda, voltada para um padrão de resposta celular, que gerasse a destruição das células cancerígenas (MANTOVANI et al., 2008).

2.3. A dieta, a resposta imune sistêmica e o câncer

Dentre as possíveis imunoterapias, uma das mais visadas e relativamente “simples” de serem aplicadas na prática é o consumo de substâncias que interfiram diretamente no crescimento tumoral ou no sistema imune. Os tecidos imunes inicialmente afetados pela dieta são aqueles presentes na mucosa de absorção deste alimento. Os tecidos linfóides associados à mucosa constituem o maior órgão imune do corpo, agindo em várias regiões de interação entre o meio ambiente e o organismo. O sistema imune da mucosa intestinal está disperso na

parede intestinal, na lâmina própria, e também está localizado em pequenos microambientes, formando as placas de Peyer. A parede intestinal contém macrófagos, células dendríticas e linfócitos (células T e B) em íntimo contato com os alimentos no processo de absorção (WERSHIL E FURUTA, 2008). Os tecidos linfóides associados à mucosa do trato gastrintestinal desempenham um papel importante como primeira linha de defesa contra patógenos ingeridos, influenciando na resposta imune sistêmica, representada por linfonodos dispersos pelo organismo e o baço (ADOLFSSON et al., 2004).

Uma resposta inicial sistêmica gerada pela dieta pode ser desencadeada por macrófagos, fagócitos mononucleares que podem migrar de tecidos ou do peritônio para os linfonodos, apresentando antígenos e aumentando a capacidade de responder a microrganismos invasores. Esta migração pode ser enfatizada através da administração de bactérias lácticas (BELLIGAN et al., 1996). Uma vez ativados, os macrófagos expressam propriedades funcionais especializadas e polarizadas, podendo liberar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas.

Os macrófagos polarizados são conhecidos como M1 e M2. Os macrófagos ativados classicamente M1 são gerados por interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , fator estimulador de colônias granulócito-macrófagos (GM-CSF) ou em presença de um estímulo microbiano. Estas células possuem em fenótipo com alta produção de IL-12, alta produção de IL-23 e baixa produção de IL-10. São eficientes produtores de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α), além de induzirem respostas do tipo Th1, mediando a resistência contra parasitas intracelulares e tumores (MANTOVANI et al., 2008).

Os macrófagos do tipo M2 são alternativamente ativados, e gerados por IL-4 e IL-13, principalmente. Eles possuem um fenótipo característico de baixa produção de IL-12, baixa produção de IL-23 e alta produção de IL-10, com capacidade variável de produzir citocinas inflamatórias, dependendo do estímulo recebido. Estas células possuem grandes quantidades

de receptores do tipo “scavenger”, receptores de manose e galactose. Além disto, o metabolismo da arginina tende a ser voltado para a produção de ornitina e poliaminas, e não para a formação de óxido nítrico (NO). Em geral, células M2 participam de respostas Th2, promovendo morte e encapsulação de parasitas, e possuem funções imunorreguladoras. Em relação ao câncer, estas células estão presentes no microambiente tumoral e, localmente, recebem o nome de macrófagos associados ao tumor (TAM), onde promovem a progressão do tumor e o reparo e remodelação tecidual, além de contribuir para a imunossupressão local (ALLAVENA et al., 2008; MANTOVANI et al., 2008).

As células TAM se acumulam em regiões hipóxicas do tumor, o que ativa funções pró-angiogênicas. Nestas condições, as TAM liberam diversos fatores, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TNF- α e interleucina humana derivada de neutrófilos-8 (CXCL8), que contribuem para a expressão de moléculas que afetam diretamente a proliferação das células tumorais e a dissolução de tecidos conectivos, facilitando a progressão e invasão do tumor. TAM também produzem fatores, como fator de crescimento transformante- β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), IL-6 e ativador plasminogênico do tipo tecidual (t-PA), que causam a degradação da matriz extracelular diretamente. Além disto, as TAM liberam citocinas imunossupressoras, como TGF- β e IL-10 e liberam quimiocinas, como o ligante de quimiocinas de motivo C-C (CCL18), que atraem preferencialmente subpopulações de linfócitos T que não possuem atividade citotóxica. A atração de linfócitos T não ativados para a periferia tumoral, dominada de macrófagos M2 e células dendríticas imaturas, tende a gerar a anergia da célula T.

O sistema imune inato fornece sinais para a ativação do sistema imune adaptativo, que induzem a diferenciação dos linfócitos sistêmicos em diferentes fenótipos com ações efetoras ou de memória. Os clones Th (células T “helper”, T CD4⁺) são resultantes da ativação de linfócitos T virgens e se diferenciam em duas categorias distintas, na dependência das

citocinas produzidas: as células Th1 produzem IFN- γ , IL-2 e IL-12, e são eficientes na resposta imune celular, via ativação de macrófagos, atuantes no combate ao câncer; já as células Th2 liberam IL-4, IL5 e IL-10, que ativam a imunidade humoral (NOBEN-TRAUTH, 2000; RENGARAJAN et al., 2000).

O óxido nítrico (NO) é um dos produtos de macrófagos ativados e é produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), sendo derivado da L-arginina, um aminoácido semi-essencial derivado da dieta, da síntese endógena e do *turnover* de proteínas celulares. O NO apresenta inúmeras atividades, dentre elas antibacteriana, antiparasitária e antiviral. Porém, o descontrole na síntese de NO está implicado na patogênese da hipertensão, sepse, doenças cerebrais degenerativas e câncer (BOGDAN, 2001; COSTA et al., 2003; GALLI, et al., 2003; MORRIS et al., 2009). Localmente, os macrófagos ou as próprias células tumorais podem alterar os níveis de NO. Já é bem estabelecido que tumores sólidos possuem regiões com pouca vascularização, nutrição insuficiente e baixo pH devido à produção de lactato, enquanto possuem também regiões com melhor vascularização e, portanto, quantidades suficientes de oxigênio e nutrientes. Nas regiões normóxicas, os macrófagos infiltrados podem produzir NO de modo a garantir a sobrevivência da célula e gerar efeitos pró-angiogênicos. Entretanto, em regiões hipóxicas, a grande geração de NO pode ser tóxica e reduzir a sobrevivência das células tumorais (WEIGERT E BRÜNE, 2008). Paradoxalmente, quando o tumor está mais avançado, a produção de NO pelas próprias células tumorais ou por outras células do microambiente tumoral representa um pior prognóstico em vários tipos de tumores, incluindo câncer de mama e ovário (THOMSEN et al., 1995; COBBS et al., 1995; NOMELINI et al., 2008; WEIGERT E BRUNE, 2008), indicando uma função desta molécula na patogênese do câncer. Sendo assim, os efeitos do NO dependem fundamentalmente de sua concentração.

Além da iNOS, os macrófagos possuem outra enzima fundamental à resposta imune: a arginase. A hidrólise da arginina pela enzima arginase produz uréia e ornitina, que são precursores para a síntese de poliaminas, prolina e glutamato. Existem duas arginases em mamíferos: arginase I (citosólica) e arginase II (mitocondrial). Estas enzimas derivam de genes distintos, presentes em cromossomos diferentes, que são regulados independentemente, sendo expressos em diversas células sob variados estímulos patofisiológicos. A arginase I é uma isoforma mais induzível, sensível a alterações locais, e é proposto que esta enzima participa em muitos processos patológicos, como doenças vasculares, doença pulmonar, infecções, disfunções imunes e câncer (JENKINSON et al., 1996; MORRIS et al., 2009). Em condições fisiológicas, a arginase I compete com a iNOS pelo substrato em comum. O equilíbrio dinâmico criado entre as duas enzimas é modificado pelas citocinas de perfil Th1 e Th2, secretadas por linfócitos T: Th1 induz iNOS, enquanto Th2 induz arginase. É sabido que os macrófagos expressando iNOS participam de respostas pró-inflamatórias, entretanto, a função de macrófagos expressando arginase apresenta controvérsias. É sugerido que a expressão de arginase I em macrófagos pode promover inflamação, fibrose e reparação tecidual ao gerar um aumento na produção de L-prolina, poliaminas e um perfil de produção de citocinas do tipo Th2, além de haverem estudos demonstrando que os produtos desta enzima são capazes de levar à imunossupressão (MORRIS et al., 2009; PESCE et al., 2009).

Além do NO e dos produtos derivados da arginase, outros mediadores produzidos pelas células imunes influenciam no crescimento de um tumor. O IFN- γ é uma citocina pleiotrópica liberada principalmente por linfócitos T e atua principalmente ativando macrófagos e aumentando a produção de IL-12 e intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio por células fagocíticas. Desta forma, esta citocina representa um mecanismo de comunicação entre a imunidade adaptativa já desenvolvida estimulando ainda mais a imunidade inata pré-existente. Ela possui um potente efeito anti-tumoral, pois controla o

crescimento celular, aumenta a apoptose e reduz a angiogênese (KOVALOYSKY et al., 2000; DRANOFF, 2004).

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma importante citocina produzida por macrófagos, e possui atividade antitumoral contra uma ampla variedade de linhagens tumorais, mas paradoxalmente esta citocina pode aumentar a capacidade de invasão da célula tumoral. Por ativar a produção de intermediários reativos de oxigênio, em altos níveis esta citocina pode estar relacionada com a tumorigênese. Seus efeitos dependem do seu local de produção, da duração desta produção e da quantidade produzida durante a resposta imune. Em pequenas quantidades, esta citocina tende a contribuir para a cura, remodelando os tecidos e melhorando a defesa local do hospedeiro, mas a produção de grandes quantidades de TNF induz ao choque e gera lesão tecidual (CHARALAMPOS, 2005; LIN e KARIN, 2007; GERMANO et al., 2008).

A IL-6, por sua vez, é uma citocina pleiotrópica que pode afetar células T, B e macrófagos, contribuindo para o aumento da inflamação e auxiliando na passagem entre a resposta inflamatória inata e a adaptativa. Esta é uma citocina-chave para o crescimento tumoral, além de desempenhar função inflamatória e antiapoptótica, atuando em genes fundamentais para o controle do ciclo celular (LIN e KARIN, 2007; GERMANO et al., 2008).

A IL-12 é um heterodímero multifuncional, produzida por macrófagos e linfócitos, cujo papel biológico inclui a ativação de células T citotóxicas, e a ativação de macrófagos e linfócitos T para liberar citocinas inflamatórias, induzindo uma resposta imune efetora mais aguda, mediada especialmente contra células. Esta citocina estimula a imunidade inata e adaptativa direcionando o sistema imunológico à resposta imune Th1, necessária à eliminação tumoral, e ainda possui atividade antiangiogênica. É capaz de gerar a regressão de tumores já

estabelecidos. Normalmente, encontra-se reduzida em neoplasias mais avançadas (BARNES, 2003; LIN e KARIN, 2007; GERMANO et al., 2008; BERRAONDO et al., 2009).

Contrária às citocinas citadas acima, a IL-10 é uma molécula produzida principalmente por macrófagos e linfócitos, e expressa propriedades antiinflamatórias e funções imunossupressoras, parecendo agir desta forma estimulando o crescimento tumoral. Entretanto, esta citocina é capaz de reduzir a produção IL-6 e TNF- α , que em determinados tumores são cruciais para o desenvolvimento do câncer. Além disto, a IL-10 parece ser capaz de modular a apoptose e suprimir a angiogênese. Apesar de seu efeito dúbio, esta citocina é encontrada em maiores concentrações em neoplasias mais avançadas (LIN e KARIN, 2007; GERMANO et al., 2008; NAUNDORF et al., 2009).

A citocina IL-4 é um marcador e indutor da resposta imune do tipo Th2. Ela parece ser particularmente produzida mediante o rompimento de uma barreira mucosa, em especial o pulmão ou o intestino. Ela induz uma menor apresentação de antígenos por macrófagos e uma redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias por estes. Entretanto, esta citocina estimula os macrófagos a liberarem componentes da matriz extracelular, sendo indispensável para a reparação tecidual. Uma ação importante desta citocina é sua função anti-apoptótica, o que poderia ser prejudicial no microambiente tumoral (MOSSER e EDWARDS, 2008; TODARO et al., 2008). Os linfócitos do tipo Th2 também atuam liberando IL-5, e pouca informação há na literatura sobre o papel desta citocina mediante o câncer. Os linfócitos Th2 auxiliam na supressão da imunidade anti-tumoral, levando à progressão do câncer e à formação de metástases (TODARO et al., 2008).

Podemos notar dessa forma que as citocinas interagem entre si criando um ambiente favorável ou desfavorável ao crescimento tumoral. Portanto, além de serem marcadores característicos de função celular de células imunes, algumas citocinas já possuem papéis conhecidos no desenvolvimento do câncer.

2.4. Soja, isoflavonas e o câncer de mama

O câncer de mama é a segunda causa de morte entre todos os cânceres e existem evidências de que o consumo de soja (*Glycine max*) freqüente esteja relacionado a uma possível prevenção (ADLERCREUTZ e MAZUR, 1997; YAMAMOTO et al., 2003; WU et al., 2008). Há anos são realizadas pesquisas que tentam provar ou desmistificar o papel protetor da ingestão de alimentos contendo soja contra o câncer de mama.

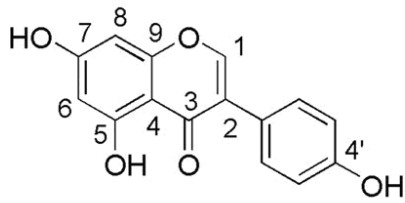
A soja contém todos os aminoácidos essenciais, apesar de a metionina estar presente em quantidades limitantes, e possui uma variedade de componentes bioativos, incluindo saponinas, inibidores de proteases e isoflavonas. As isoflavonas são compostos polifenólicos não esteroidais e podem ser encontradas na soja principalmente nas formas de β -glicosídeos conjugados: genistina, que é o composto majoritário, daidzina, glicitina, acetil daidzina, acetil glicitina, acetil genistina, malonil daidzina, malonil glicitina e malonil genistina; e sob a forma de agliconas: genisteína, daidzeína e gliciteína (Figura 1A) (KUDOU et al., 1991; BARRET, 2006; LAMPE, 2009). A quantidade de isoflavonas após o processamento de um grão de soja, torrado, mas ainda em forma sólida, é de aproximadamente 2661 $\mu\text{g/g}$, dos quais 53,58% seriam genisteína, e 35,36% de daidzeína. Se o processamento da soja for para a forma líquida, a bebida pronta possui apenas 28 $\mu\text{g/g}$ de isoflavonas (SAKAI e KOGISO, 2008), quantidade tal que é variável conforme a fonte dos grãos de soja (XIAO et al., 2008).

Quando as isoflavonas, predominantemente na sua forma glicosilada, passam pelo trato digestivo, o açúcar da molécula é clivado por bactérias ali presentes e a molécula pode então ser absorvida. A daidzeína pode ser clivada em equol por bactérias intestinais de 30 a 50% das pessoas, ou em O-desmetilangolensina em 80 a 90% ou ainda ser absorvida sob esta forma (Figura 1B). Esta diferença na clivagem das isoflavonas pode ser devido a uma variação inter-individual na composição da microflora intestinal, na fisiologia do intestino, genética do hospedeiro e dieta habitual. É sabido que bactérias facultativas anaeróbias, em sua

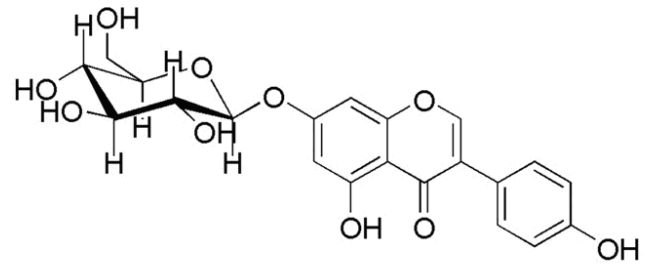
maioria, clivam as isoflavonas, enquanto as aeróbias dificilmente o fazem. Uma vez no sangue, a genisteína e a daidzeína livres são levadas ao fígado, onde são subseqüentemente conjugadas em vários tipos de compostos conjugados, estando principalmente sob a forma de compostos glicosilados ou sulfatos, os quais se pensa terem menor atividade biológica, mas ainda não há provas quanto a isto. Apenas uma pequena quantidade de genisteína permanece livre na corrente sanguínea, um por cento ou menos, provavelmente. Como a conversão da forma glicosilada para a forma passível de ser absorvida é feita por bactérias, produtos fermentados a base de soja podem ser os que contêm maiores índices de isoflavonas não glicosiladas, dependendo das bactérias utilizadas na fermentação (BARRET, 2006; YUAN et al., 2007; TSUCHIHASHI et al., 2008; LAMPE, 2009).

Estes compostos podem atuar regulando o sistema imunológico e inibindo proteases (BARRET, 2006). Também parecem ser capazes de diminuir as concentrações plasmáticas de colesterol total (MANZONI et al., 2005), LDL e triglicérides (ANDERSON et al., 1995). Frequentemente, elas são referidas como estrógenos fracos e podem induzir a atividade da enzima aromatase, limitante para a síntese de estrógeno. Por causa da sua fraca capacidade de ligação aos receptores de estrógeno, as isoflavonas podem agir como agonistas, agonistas parciais ou antagonistas em relação ao estrógeno fisiológico (como o estradiol). A potência e o efeito gerados variam de acordo com sua concentração tecidual, o tipo celular onde atuam, o tipo de receptor hormonal ao qual se liga e o estágio de diferenciação celular (ÁLVAREZ, 2006; BARRET, 2006; YEB et al., 2009). Os receptores para estrógenos são do tipo α ou β e podem ser encontrados em diversas células do corpo, e a genisteína se liga com uma afinidade maior ao receptor β de células neuronais ou imunes (VALSSECCHI et al., 2008).

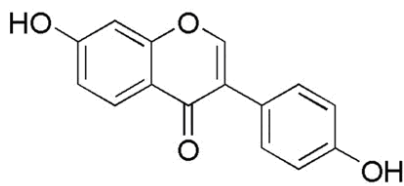
A)



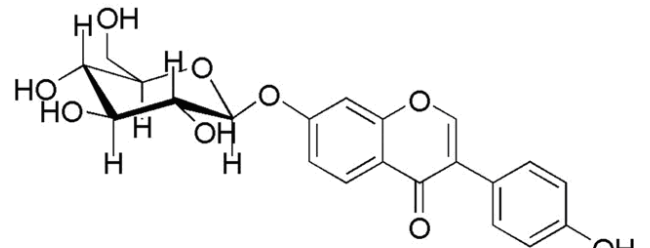
Genisteína (1)



Genistina (2)



Daidzeína (3)



Daidzina (4)

B)

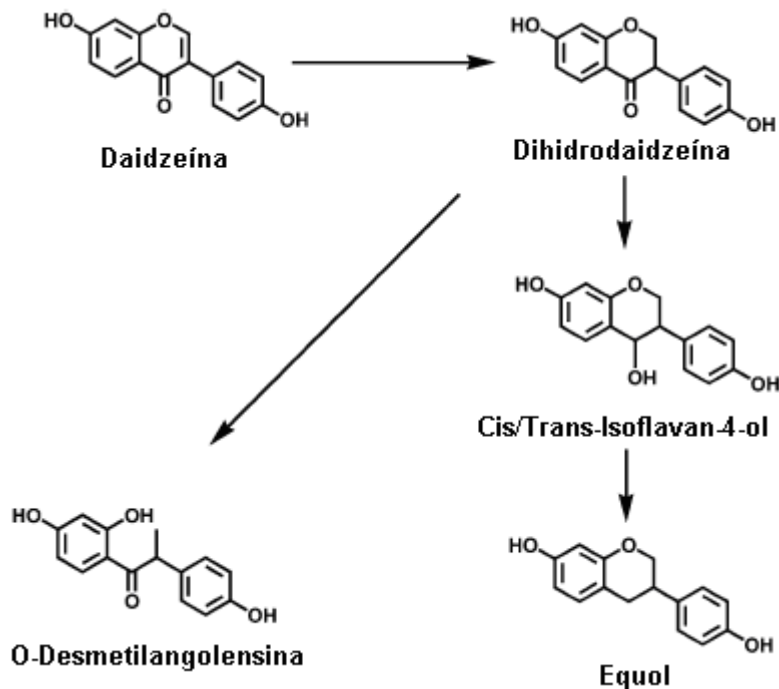


Figura 1. Isoflavonas da soja e metabolismo da daidzeína. (A) Quatro das isoflavonas da soja: 1) genisteína, 2) genistina, 3) daidzeína e 4) daidzina. Os compostos 2 e 4 estão na forma glicosilada, mais abundante na soja, de seus derivados 1 e 3, respectivamente, resultantes principalmente da quebra ocorrida por bactérias. (B) Metabolismo da daidzeína. Os produtos finais são equol em 30 a 50% das pessoas, ou O-desmetilangolensina em 80 a 90%.

As isoflavonas genisteína, daidzeína e seu metabólito equol parecem ser os componentes principais da soja no combate ao câncer, por apresentarem: 1) atividade antioxidante, particularmente mais potente pelas isoflavonas genisteína, daidzeína e seu metabólito equol (RUFER e KULLING, 2006); 2) inibição às enzimas tirosina quinase e DNA topoisomerase II, envolvidas no controle do crescimento celular; 3) aumento da síntese do hormônio sexual ligado à globulina, diminuindo os níveis de estrogênio ativo (THAM, 1998); 4) afinidade com os receptores de estrogênio α e β (KOSTELAC et al., 2003), sendo esta afinidade particularmente forte pelo equol (YUAN et al., 2007); 5) inibição da angiogênese (YIHAI, 2002); e 6) aumento da apoptose (ZHOU, 1998). Tais propriedades são relevantes na prevenção e no tratamento do câncer.

2.5. Probióticos, o sistema imune e o câncer

Outro aspecto da dieta que contribui para o bem-estar do organismo é a possível presença de bactérias probióticas. Em humanos e outros mamíferos, as superfícies mucosas são colonizadas por uma comunidade bacteriana dinâmica e heterogênea. Nos seres humanos, a microbiota associada a mucosas é composta por mais de quatrocentas espécies e o número de microorganismos supera em dez vezes o número de células totais do corpo (XU e GORDON, 2003). Esta microbiota começa a se formar ao nascimento e é fundamental para o correto desenvolvimento do sistema imune ao longo da vida, auxiliando na formação dos tecidos linfóides associados à mucosa e ajudando a educar o sistema imune como um todo. Na fase adulta, ela é mais estável e sofre poucas alterações (BÁLCAZAR et al., 2007). Esta microbiota está em permanente contato com as células do hospedeiro e com os compostos derivados da dieta, criando um ecossistema único, complexo e altamente regulado. Diversos fatores fazem da microbiota um importante componente para a saúde do hospedeiro, tais como: 1) manutenção de uma barreira física contra a colonização ou invasão por patógenos;

2) facilitação da digestão e assimilação de vários nutrientes; 3) geração de sinais que ativam e/ou estimulam a imunovigilância; e 4) neutralização de possíveis toxinas e carcinógenos ingeridos (WOLOWCZUK et al., 2008). Uma vez ingeridos, os microrganismos probióticos não se tornam membros estabelecidos da microbiota normal, mas persistem apenas durante os períodos de consumo ou por um pequeno intervalo após este (CORTHÉSY et al., 2007), preconizando, portanto, uma ingestão de longo período para que ocorra a modulação efetiva do sistema imune.

Os gêneros de microrganismos mais conhecidos para composição de produtos probióticos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, os quais são extensamente utilizados como principais bactérias na indústria alimentícia, auxiliando na preservação do alimento, na produção de componentes gustativos, aumentando o valor nutricional do alimento e gerando propriedades terapêuticas e/ou profiláticas (PARVEZ et al., 2006). Tem sido proposto que a ingestão de produtos probióticos pode aumentar a resistência às infecções, às alergias, especialmente a alergia alimentar, e também apresentam potencial de prevenir o câncer (WOLOWCZUK et al., 2008).

Matar et al. observaram que culturas de lactobacilos modulam a resposta imune e ativam principalmente a resposta celular (MATAR et al., 2001), necessária para o combate efetivo ao câncer. Há relatos de que o consumo de produtos fermentados reduz o risco de câncer de mama: LeBlanc et al. verificaram que a administração do leite fermentado com *Lactobacillus helveticus* gerou a ativação das células do sistema imune, aumentou a apoptose das células de adenocarcinoma mamário, aumentou a produção de TNF- α e diminuiu a expressão da proteína derivada do oncogene Bcl-2 nas células mamárias (LEBLANC et al., 2005). Os produtos probióticos podem, portanto, interferir na resposta imune contra tumores.

2.6. Estudos anteriores sobre o produto fermentado de soja

Visando unir as qualidades funcionais da soja com os já reconhecidos efeitos benéficos dos produtos probióticos segundo vasta literatura, foi desenvolvido um produto de “leite” de soja fermentado por *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp* jugurti 416 na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, SP (ROSSI et al., 1999), microorganismos fermentadores não capazes de clivar as isoflavonas da soja.

Os primeiros estudos logo demonstraram que o novo produto fermentado de soja possuía um efeito sobre os lipídeos séricos e apresentava propriedades hipocolesterolêmicas (ROSSI et al., 1999; ROSSI et al., 2000) e esta pesquisa foi aprofundada, enfatizando cada vez mais a ação benéfica do produto fermentado de soja enquanto produto hipocolesterolêmico e capaz de afetar o metabolismo de lipídeos em animais (MANZONI et al., 2005; CHEIK et al., 2008) e aumentar os níveis de colesterol-HDL em seres humanos (ROSSI et al., 2003).

Além disto, o produto fermentado de soja demonstrou ser capaz de aumentar a densidade mineral óssea em animais ovariectomizados, podendo vir a ser utilizado futuramente como um alimento auxiliar no combate à osteoporose (SHIGUEMOTO et al., 2007).

Em relação ao sistema imune, especificamente, a ação imunomoduladora do produto fermentado de soja foi comprovada. De início, observou-se que seu consumo não induzia uma sensibilização de mastócitos mesentéricos (CARLOS et al., 2000), contrariando o poder alergênico de derivados de soja. Foi verificado que o produto fermentado de soja atua estimulando a produção de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ por macrófagos/linfócitos e gera um aumento da produção de NO e H₂O₂ (VENDRAMINI, 2002). Aprofundando esta informação, estudos anteriores demonstraram uma melhora da resposta imune em animais que consumiram o produto fermentado de soja contra o tumor de

mama, evidenciada pelos mediadores NO, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ , tendo sido observado menor volume tumoral final em relação aos outros grupos de estudo (KINOUCI, 2006). Uma resposta imune também foi induzida pela administração da bactéria *Enterococcus faecium* CRL 183, uma das utilizadas na fermentação do produto de soja, contra o tumor de cólon induzido quimicamente, gerando resultados semelhantes e destacando uma resposta imunológica essencialmente celular, o que levou a uma menor formação de pólipos intestinais (SIVIERI et al., 2008), apesar de que o produto fermentado de soja, mesmo contendo a bactéria, não reduziu esta formação de pólipos (SILVA et al., 2009).

Diante do exposto, torna-se necessário conhecer melhor os alimentos funcionais derivados de soja e produtos probióticos atuantes no desenvolvimento de tumores.

Objetivos

3. OBJETIVOS

Verificar o papel da ingestão diária do produto não fermentado de soja (PNFS), do produto fermentado de soja com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp jugurti 416 acrescido de isoflavonas (PFSI) ou não (PFS) no desenvolvimento de câncer de mama murino experimental.

Mais especificamente, pretende-se:

- 1) Avaliar o perfil de ativação de macrófagos peritoneais, observando a liberação de óxido nítrico, a atividade da enzima arginase e a produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α ;
- 2) Avaliar o perfil de ativação de linfócitos esplênicos através da dosagem de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ ;
- 3) Observar localmente no tumor o grau de angiogênese e a quantidade de células apoptóticas em cada um dos grupos de estudo.

Materialis e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Os animais do estudo receberam diariamente o alimento em questão, conforme descrito no item 4.5, a partir do dia 1 do experimento por um total de 40 dias. No décimo dia, os animais foram inoculados subcutaneamente com uma suspensão de células de adenocarcinoma mamário murino LM3, que originou um tumor sólido. No dia 40, os animais foram eutanasiados e foram extraídos as células peritoneais, o baço e o tumor.

A partir das células peritoneais, os macrófagos foram separados por aderência em placa de cultura estéril e então foi feita uma cultura celular mediante a presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C (Figura 02). Desta cultura, o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de NO e das citocinas IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α . As células aderentes foram utilizadas para a dosagem da atividade da enzima arginase, responsável pela produção de uréia, e para o teste de viabilidade celular.

A partir das células esplênicas, foi realizada uma cultura celular, e as células não aderentes, majoritariamente linfócitos, foram separadas. Estas células foram submetidas a uma cultura celular de 24 horas mediante concanavalina A (ConA) ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C (Figura 03). Desta cultura, o sobrenadante foi utilizado para a dosagem das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ , e as células foram utilizadas para o teste de viabilidade celular.

O tumor extraído dos animais foi cortado em cortes de 5 μ m e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), para a observação das características gerais dos tumores, da presença de mitose e do grau de angiogênese; ou coradas com reagente de TUNEL e iodeto de propídio (PI) para a observação da apoptose.



Figura 2. Ensaio realizado a partir de macrófagos peritoneais dos animais de todos os grupos de estudo.

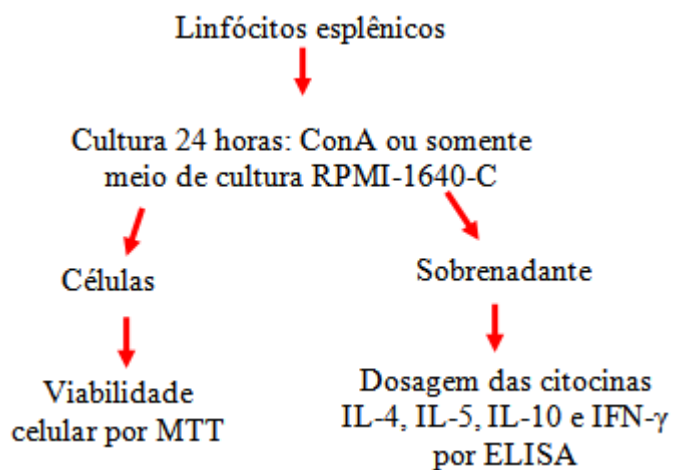


Figura 3. Ensaio realizado a partir da obtenção de linfócitos esplênicos de animais de todos os grupos de estudo.

4.2. Animais

Camundongos fêmeas Balb/c, pesando entre 18-25g, procedentes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP, São Paulo, foram utilizados em todos os experimentos. 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 claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam água e ração (Purina) esterilizadas, *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 . Todos os procedimentos que utilizaram células vivas dos animais foram realizados em duplicata e pelo menos duas vezes em momentos distintos, e então unidos. Todos os procedimentos com animais foram conduzidos conforme normas do SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e que obtiveram parecer do Comitê de Ética local (parecer nº08/2009 CEP/FCF/CAr).

4.3. Produtos de soja

Os animais foram tratados com produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416, acrescido ou não com isoflavonas, ou com amostras de produto não fermentado de soja. Os produtos foram preparados semanalmente e mantidos sob refrigeração.

4.3.1. Preparo do produto fermentado de soja (PFS)

O produto fermentado de soja foi produzido a partir do “leite” de soja, de acordo com metodologia de Rossi et al. (2000), no Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP. Foram utilizados os cultivos de *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 para a fermentação. Foram utilizadas 10^6 UFC/mL de cada um dos cultivos bacterianos. A fermentação ocorreu a

37°C, em aerobiose, até que o pH atingisse 4,3 a 4,5. O produto foi resfriado gradualmente e transferido à temperatura de refrigeração.

4.3.2. Preparo do produto não fermentado de soja (PNFS)

O produto não fermentado de soja foi obtido utilizando-se a mesma metodologia empregada na produção do produto fermentado, excluindo-se apenas a etapa de fermentação. A acidificação do produto foi alcançada com a adição direta de ácido láctico em quantidade suficiente para que o pH final estivesse entre 4,3 e 4,5, sendo posteriormente mantido em refrigeração.

4.3.3. Preparo do produto fermentado de soja acrescido de isoflavonas (PFSI)

O produto acrescido de isoflavonas foi obtido partindo-se do produto fermentado de soja preparado como descrito no item 4.2.1, e posteriormente acrescido de 1,125g/L de Isoflavin (Galena).

4.3.4. Viabilidade celular das bactérias fermentadoras dos produtos de soja

As células viáveis presentes nos produtos fermentados foram contadas em cada lote de produto fermentado de soja recém-preparado utilizando-se meio MRS (Sigma-Aldrich) para lactobacilos e em meio M17 (Sigma-Aldrich) para enterococos. Os resultados foram expressos em números absolutos.

4.4. Implante de células tumorais

Foi utilizada a linhagem tumoral de adenocarcinoma mamário murino LM3, gentilmente cedida pela Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, do Instituto de Oncologia Angel H. Roffo (Buenos Aires, Argentina). Esta linhagem foi mantida em cultura através de repiques,

três vezes por semana, em meio MEM (Minimum Essential Médium, Gibco), acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma). A suspensão celular foi ajustada para 5×10^5 células/mL, a partir da qual foram inoculados 250µL subcutaneamente no flanco traseiro esquerdo do animal, local escolhido pela facilidade de acesso para inoculação e por permitir fácil acompanhamento de seu desenvolvimento e posterior extração (URTREGER et al., 1997).

4.5. Grupos de estudo

Os animais receberam os diferentes produtos por gavagem, 0,5 mL/dia, durante 10 dias, antes do implante de células tumorais, e estes produtos continuaram sendo administrados diariamente por mais 30 dias, entre 11:00 e 12:00, até o sacrifício dos animais.

Os grupos se constituíram assim:

- 1) Grupo Produto Não Fermentado de Soja (PNFS) – recebeu, por gavagem, 0,5 mL/dia do produto não fermentado de soja e recebeu implante de células tumorais;
- 2) Grupo Produto Fermentado de Soja (PFS) – recebeu, por gavagem, 0,5 mL/dia do produto fermentado e recebeu implante de células tumorais;
- 3) Grupo Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) – recebeu, por gavagem, 0,5 mL/dia do produto fermentado acrescido de isoflavonas e recebeu implante de células tumorais;
- 4) Grupo Solução Salina (SS) – recebeu, por gavagem, 0,5 mL/dia de solução salina 0,85% de cloreto de sódio estéril, e teve implantadas as células tumorais, representando o grupo controle de todo o experimento.

4.6. Obtenção dos tumores

Após o sacrifício, os tumores foram retirados com auxílio de material cirúrgico, e medidos em seus diâmetros maior e menor utilizando paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper. O tumor também foi pesado com auxílio de uma balança não analítica (Boeco). O volume do tumor foi calculado pela fórmula (ZHOU et al.,1998):

$$\text{Volume} = 0,5 \times \text{diâmetro maior} \times (\text{diâmetro menor})^2$$

4.7. Determinação da ocorrência de apoptose em células tumorais por TUNEL

A quebra do DNA genômico, que ocorre no processo de apoptose, origina fragmentos de DNA. Estes podem ser identificados por marcação das terminações 3'-OH livres, através de uma reação enzimática que catalisa a incorporação de nucleotídeos modificados (marcados com fluoresceína), chamado teste do TUNEL (“Terminal dUTP Nick-End Labeling”).

A técnica do TUNEL foi realizada através do kit de ensaio In Situ Cell Death Detection - FITC (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Os tumores, obtidos conforme item 4.6, foram cortados em secções de 5 µm e fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno e embebidos em parafina. Posteriormente, os cortes foram fixados em lâmina e incubados com 50 a 80 µL do reagente de TUNEL por 2 horas em temperatura ambiente em câmara úmida, ao abrigo da luz. Foi utilizada co-marcação das células com iodeto de propídio (PI) a 0,5 µg/mL, realizada simultaneamente com o reagente de TUNEL. Em seguida, as lâminas foram montadas com glicerol 50% entre lâmina e lamínula. A observação foi realizada em microscópio de fluorescência, e cada campo foi analisado em filtros branco, verde e azul, em aumento de 1000x.

As células foram previamente analisadas por sua morfologia e coloração. Então, foram contadas estereometricamente 300 células tumorais totais, em campos aleatórios, contracoradas com iodeto de propídio, dentre as quais foram observadas aquelas que tenham

sido coradas com a solução de TUNEL. Foram consideradas apenas aquelas células que possuíam a morfologia esperada, que tivessem núcleo aparente, estivessem contracoradas com iodeto de propídio e, se fosse o caso, cuja marcação de TUNEL se mostrasse em formato adequado e na posição esperada nas células. As células marcadas com o reagente de TUNEL ainda foram comparadas com os dois controles negativos de cada animal, contendo apenas iodeto de propídio e sem nenhuma marcação, também analisados nos três filtros citados. Os resultados foram expressos como porcentagem de células marcadas pelo reagente de TUNEL em relação ao total de células.

4.8. Análise da angiogênese pelo Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS)

O sistema de gradação para angiogênese por microscopia (MAGS) foi desenvolvido seguindo a técnica de Brem et al. (1972), modificado por Shankar et al. (2006). A vasoproliferação (KnN), a hiperplasia de células endoteliais (KeE) e a citologia endotelial (KxX) foram observadas esterometricamente em microscópio óptico em cortes de 5 μm do tecido tumoral mamário fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno e embebidos em parafina, e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina, utilizando um aumento de 400 vezes. A pontuação foi calculada como: $\text{MAGS} = \text{KnN} + \text{KeE} + \text{KxX}$, onde as constantes são: $\text{Kn} = 1$, $\text{Ke} = 3$ e $\text{Kx} = 6$.

A vasoproliferação (KnN) possui um valor máximo de 40, com N sendo o número de capilares vistos sob o aumento de 400 vezes em cada campo. A hiperplasia de células endoteliais (KeE) possui valor máximo de 30, sendo E o número de células alinhadas na seção transversal do capilar, com valor máximo de 10. A citologia endotelial (KxX) possui um valor máximo de 30; X possui um valor entre 0 e 5 indicando a aparência histológica das células endoteliais na zona de hiperplasia, sendo 0 = célula endotelial normal; 1 = célula aumentada,

mas com núcleo normal e claro; 2 = célula aumentada, mas com núcleo claro e proeminente; 3 = célula com núcleo grande e hiper cromático; 4 = células endoteliais “bizarras”; 5 = células que se apresentem como figura mitótica. A graduação MAGS calculada por esta fórmula varia entre 0 e 100, em valores arbitrários. Os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão em valores arbitrários, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo.

4.9. Determinação da presença de mitoses

A ocorrência de mitoses foi observada estereometricamente em microscópio óptico em cortes de 5 μ m do tecido tumoral mamário fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno e embebidos em parafina, e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina, utilizando um aumento de 400 vezes. Os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão do número de células em mitose em 5 campos aleatórios de cada animal, em 3 animais de cada grupo de estudo.

4.10. 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 em câmara de CO₂. Estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar Classe 100 e o peritônio exposto. Posteriormente, foram inoculados 5,0 mL de solução PBS gelado com pH 7,2 na cavidade abdominal. O líquido peritoneal resultante foi coletado e transferido para um tubo cônico estéril com capacidade de 15,0 mL (Corning, Inc.) e centrifugado a 700 g durante 5 min a 4°C (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.), sendo o sedimento celular lavado duas 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 2 β -

mercaptoetanol (Sigma), 2×10^{-5} M, penicilina 100 U/mL (Sigma), estreptomicina 100 U/mL (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 e a suspensão celular ajustada à concentração de 5×10^6 células para realização dos testes propostos.

4.11. Obtenção das células esplênicas

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e tiveram a pele da região abdominal e torácica retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar Classe 100 para a extração do baço, com auxílio de pinça de metal. O baço extraído foi macerado em malha de nylon em uma placa de Petri estéril (Corning, Inc.) contendo 2,0 mL de RPMI-1640-C de pH 7,2, gelado, para liberação das células. O conteúdo da placa foi aspirado por seringa de 3,0 mL para obtenção de suspensão celular homogênea. Após este procedimento as células foram transferidas para tubo cônico estéril de 15,0 mL (Corning, Inc.) e centrifugadas com 5,0 mL de cloreto de amônio 0,17 M para ocorrer lise das hemácias. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640-C e lavadas 2 vezes neste meio centrifugando a 700 g por 5 min a 4°C (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). As células foram então ressuspensas em 6,0 mL de meio RPMI-1640-C. A suspensão celular foi incubada em placa estéril de 6 poços (Corning, Inc.), 3,0 mL por poço, por 1 hora. Após este período, as células não aderentes foram coletadas e centrifugadas em tubo cônico estéril de 15,0 mL a 700 g por 5 min a 4°C. As células esplênicas foram 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, a suspensão celular foi ajustada à concentração de 5×10^6 células/mL para determinação de citocinas.

4.12. Obtenção do sobrenadante de cultura 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. 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 1,0 mL de LPS (lipopolissacarídeo obtido de *E. coli*, Sigma-Aldrich) a 10 µg/mL, como controle positivo, ou somente mais 1,0 mL de 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 24 h. Após esta incubação, os sobrenadantes obtidos das placas de culturas foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C, durante 10 min a 7800 g. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados em freezer a -80°C até o momento da determinação de citocinas.

4.13. Obtenção do sobrenadante de cultura das células esplênicas

A suspensão celular contendo as células esplênicas foi ajustada a 5×10^6 células/mL, distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc), 1,0 mL por cavidade e expostas a 1,0 mL de concanavalina A (ConA) (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,5 µg/mL, como controle positivo, ou somente 1,0 mL de meio de cultura nos controles de células. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific) por 24 h. Após esta incubação, as soluções contidas em cada poço da placa foram transferidas para tubos estéreis de 1,5 mL (Corning, Inc) e foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C durante 10 min a 700 g (Hettich, Inc.). Em seguida, os

sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados a -80°C para posterior dosagem de citocinas.

4.14. Determinação de citocinas

As citocinas IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α foram quantificadas no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais, e as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ foram quantificadas no sobrenadante das culturas de células esplênicas, através do teste imunoenzimático ELISA. Foram utilizados kits da BD Biosciences Pharmingen de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina, diluído em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) ou carbonato de sódio (pH 9,6), conforme indicado pelo fabricante, (100 μl por cavidade) e incubadas *overnight* à 4°C . No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (tampão de lavagem) e bloqueadas com 300 μL de diluente de ensaio (tampão PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado, Sigma-Aldrich, pH 7,2 a 7,4) à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas de 3 vezes com tampão de lavagem. 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 5 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μL /cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina, diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de ensaio. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 60 min e lavadas 5 vezes com tampão de lavagem, sendo então adicionados 100 μL do conjugado peroxidase-estreptavidina na diluição adequada para cada citocina e incubadas novamente à

temperatura ambiente por 60 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 7 vezes com tampão de lavagem e em seguida foram adicionados de 100 µL do substrato [10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2 mM de H₂O₂ (Mallinckrodt Chemical)]. 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 através de curvas padrão estabelecidas com quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.15. Avaliação da viabilidade celular de células peritoneais aderentes

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983).

A uma placa estéril de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 µL por cavidade das suspensões de célula do exsudato peritoneal de camundongos, obtidas conforme o item 4.7, ajustadas à concentração de 5x10⁶ células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C em presença de 100 µL de LPS a uma concentração de 10 µg/mL, ou apenas meio de cultura (controle negativo), em duplicata. As placas foram incubadas por 24 hs a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Após esse período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes tratadas com 100µL de uma solução de MTT (Across Organics) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640-C. A placa foi então incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade

ótica foi determinada em espectrofotômetro (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

4.16. Avaliação da viabilidade celular das células esplênicas não aderentes

A uma placa estéril de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 µL por cavidade das suspensões de células esplênicas de camundongos, obtidas conforme o item 4.8, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C, em presença de 100 µL de ConA (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,5 µg/mL, como controle positivo, ou somente meio de cultura nos controles de células, em duplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). A seguir, foram adicionados 20 µL de uma solução concentrada de MTT (5mg/mL e meio RPMI 1640) em cada cavidade e as placas foram incubadas por 3 horas em estufa a 37°C, com tensão de 5% de CO₂. Após esse procedimento, as placas foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos a 10°C em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha). Os sobrenadantes foram retirados por aspiração com auxílio de uma micropipeta e descartados e as células foram tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

4.17. Determinação da produção de óxido nítrico

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%, utilizando NaNO_2 como padrão (GREEN et al., 1982).

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 96 cavidades. A cada cavidade foram adicionados 100 μL dessa suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 min em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Thermo Electron Hepa Class 100). Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640-C e ainda 100 μL de LPS (lipopolissacarídeos) a 10 $\mu\text{g/mL}$, como controle positivo, ou somente de RPMI-1640-C como controle de células. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO_2 (Thermo Electron Hepa Class 100) por 24 horas. Então, alíquotas de 50 μL dos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram transferidas para uma placa de cultura de células não estéril contendo 96 cavidades de fundo plano e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada com filtro de 540 nm em espectrofotômetro. As concentrações de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, e os valores foram expressos em μmols de nitrito.

4.18. Determinação da atividade da arginase em macrófagos peritoneais

A mensuração da atividade da arginase foi realizada através da dosagem de seu produto uréia. A reação baseia-se na ocorrência de hidrólise de L-arginina pela enzima arginase, em lisado de células, método modificado de Corraliza et al. (1994).

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 96 cavidades. A cada cavidade foram adicionados 100 μ L 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). Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640-C e ainda 100 μ L de LPS (lipopolissacarídeos) a 10 μ g/mL, como controle positivo, ou somente de 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 24 horas. As células foram lisadas com 100 μ L de Triton X-100 0,1%, por 30 minutos sobre um agitador. Então, a 50 μ L do lisado de células foram adicionados 50 μ L de Tris-HCl 25 Mm e 25 μ L de MnCl₂ 100 mM, e a placa foi incubada por 10 minutos a 56°C, para ativação da enzima. Foram adicionados 50 μ L de L-arginina 0,5 M (pH 9,7) e a placa foi incubada a 37°C por 60 minutos. A reação foi paralisada com 400 μ L de solução de H₂SO₄ (96%), H₃PO₄ (85%) e H₂O, na proporção 1:3:7. Após este período, foram adicionados 25 μ L de α -isonitrosopropiofenona 9% (Sigma), dissolvido em etanol 100%, seguido de incubação a 95°C por 30 minutos. A placa foi lida após um período de 10 minutos, em temperatura ambiente, em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de uréia foi calculada através de uma curva padrão previamente estabelecida, com quantidade conhecidas de uréia. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de uréia por minuto.

4.19. Análise estatística

Análise estatística foi realizada utilizando um método de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste *t*-Student na versão de comparações múltiplas de Tukey-Kramer para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa GraphPad InStat 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Quantidade de bactérias probióticas no produto fermentado de soja

Logo após preparo, o produto fermentado de soja passou por um controle de qualidade, que incluía a contagem de suas bactérias fermentadoras. A tabela 1 contém a quantidade média de células em cada mês do experimento, pesquisada através do uso do meio MRS para *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 e do meio M17 para *Enterococcus faecium* CRL 183.

Tabela 1. Média do número de células viáveis em lotes do produto fermentado de soja, contadas através da utilização de meio MRS para lactobacilos e M17 para enterococos.

Mês	Enterococos	Lactobacilos
Setembro 2008	$1,4025 \times 10^7$	$1,35 \times 10^8$
Outubro 2008	$6,99 \times 10^7$	$1,15 \times 10^8$
Janeiro 2009	$1,77 \times 10^7$	$1,60 \times 10^8$
Fevereiro 2009	$1,49 \times 10^7$	$1,40 \times 10^8$
Mai 2009	$2,11 \times 10^7$	$1,90 \times 10^8$
Junho 2009	$1,955 \times 10^7$	$1,85 \times 10^8$
Agosto 2009	$1,7325 \times 10^7$	$1,425 \times 10^8$
Setembro 2009	$1,565 \times 10^7$	$1,30 \times 10^8$

5.2. Análise macroscópica e microscópica do tumor

Foi observado macroscopicamente que o tumor é elíptico e pode crescer aderindo-se ao músculo da pata traseira do animal ou de forma mais isolada em relação a este, invadindo-o ou sem penetrar a fáscia muscular. Exteriormente, tende a apresentar cor esbranquiçada ou amarelada, com grande presença de vasos sanguíneos. Em seu interior, apresenta regiões centrais de coloração mais arroxeadas e, às vezes, forma-se uma pequena cavidade contendo líquido escuro.

Microscopicamente, o tumor apresenta uma região central com presença notável de cordões tumorais e, na periferia, grande quantidade de vasos sanguíneos. O tumor contém

células atípicas, com diferença no tamanho celular, no tamanho dos núcleos e na intensidade de coloração do citoplasma. Além disto, estas células apresentam aumento no número de nucléolos. Há presença de mitoses em diversas regiões. Em algumas regiões dos tumores ocorre grande infiltrado inflamatório, com maior presença de linfócitos e macrófagos, bastante identificável na periferia do tumor e na cavidade cística, quando esta estava presente.

5.3. Determinação do volume tumoral

Os animais dos grupos que receberam produto fermentado de soja acrescido ou não de isoflavonas tiveram um menor desenvolvimento tumoral (Tabela 2) ao final do estudo em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina ($p < 0,05$ para ambos), indicando que possivelmente haja uma ação do produto probiótico no desenvolvimento tumoral. O grupo NFP também apresentou um volume tumoral menor do que SS, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Tabela 2. Peso e volume tumoral de adenocarcinoma mamário murino extraído dos animais dos diferentes grupos.

Grupos	Peso do Tumor (g)	Volume Tumoral (mm ³)
SS	3,52 ± 0,737	3683,78 ± 762,9 ^a
PNFS	2,67 ± 0,780	2835,73 ± 931,5 ^{a,b}
PFS	1,89 ± 0,412	1445,32 ± 391,3 ^b
PFSI	1,36 ± 0,231	858,63 ± 225,4 ^b

Os tumores dos animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram extraídos ao término do estudo e pesados e medidos, para cálculo do volume tumoral. Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão de todos os animais de cada grupo. Os volumes tumorais de PFS e PFSI foram significativamente menor do que SS ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa quando comparado o peso tumoral entre os diferentes grupos.

^{a,b}Classificação estatística baseada no teste ANOVA.

5.4. Determinação do grau de angiogênese nos tumores

Não houve diferença estatística significativa em relação ao grau de angiogênese entre os grupos de estudo (Figuras 4 e 5, Tabela 3).

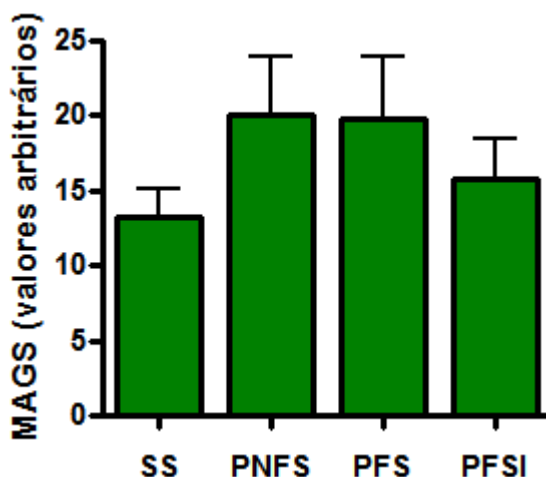


Figura 4. Grau de angiogênese no tumor. Os tumores de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram extraídos após 40 dias de ingestão dos produtos. O grau de angiogênese foi determinado em lâminas coradas com hematoxilina e eosina através do Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS). Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em valores arbitrários, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo.

Tabela 3. Grau de angiogênese no tumor.

Grupos	Score MAGS*
SS	13,25 \pm 1,883
PNFS	20,00 \pm 3,853
PFS	19,75 \pm 4,162
PFSI	15,75 \pm 2,728

*Resultados expressos como a média \pm desvio-padrão em valores arbitrários, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo.

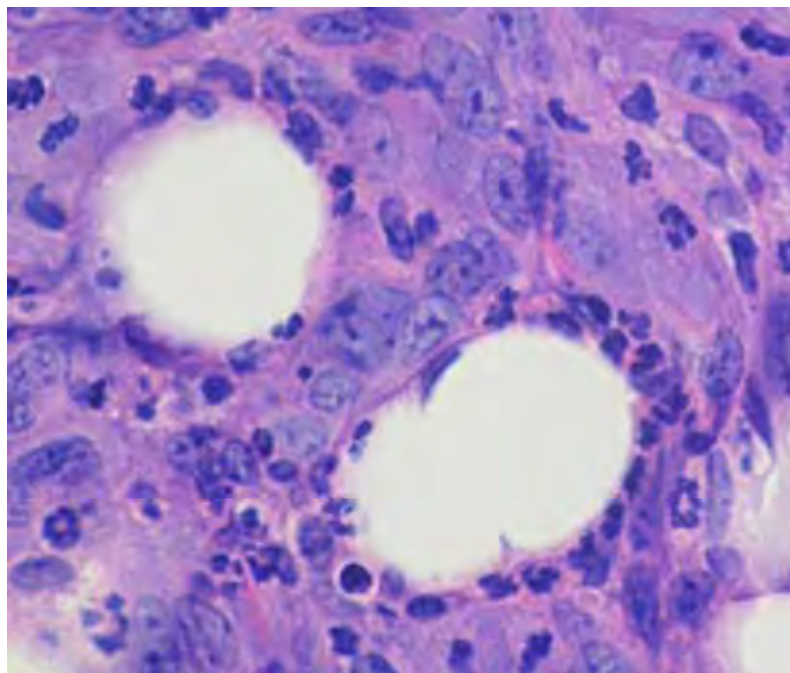


Figura 5. Vasos sanguíneos tumorais. Os tumores de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram extraídos após 40 dias de ingestão dos produtos. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina e observadas sob aumento de 400x. Nesta figura observamos dois vasos sanguíneos com presença de mitose nas células endoteliais.

5.5. Quantidade de mitoses nos tumores

Quando comparada a quantidade de células em mitose em cada tumor (Figuras 6 e 7, Tabela 4), observa-se que os grupos SS e PFS apresentam menor quantidade de células neste estágio, diferindo significativamente de PNFS ($p < 0,05$), mas não significativo em relação ao PFSI ($p > 0,05$).

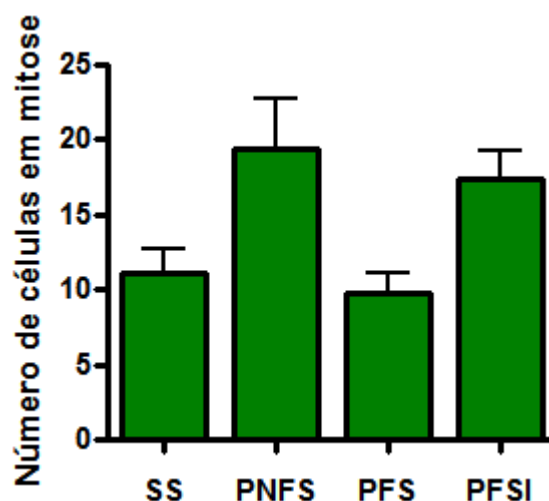


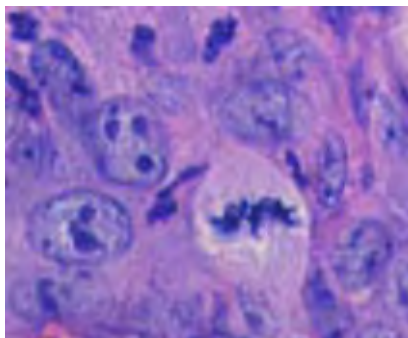
Figura 6. Quantidade de células em mitose no tumor. Os tumores de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram extraídos após 40 dias de ingestão dos produtos. As células em mitose foram contadas em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em números absolutos, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo. Os grupos SS e PFS diferiram significativamente de PNFS ($p < 0,05$).

Tabela 4. Quantidade de células em mitose no tumor.

Grupos	Mitoses*
SS	11,08 \pm 1,559 ^a
PNFS	19,33 \pm 3,342 ^b
PFS	9,75 \pm 1,382 ^a
PFSI	17,33 \pm 1,831 ^{a,b}

*Resultados expressos como a média \pm desvio-padrão em números absolutos, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo. ^{a,b}Classificação estatística baseada no teste ANOVA.

A)



B)

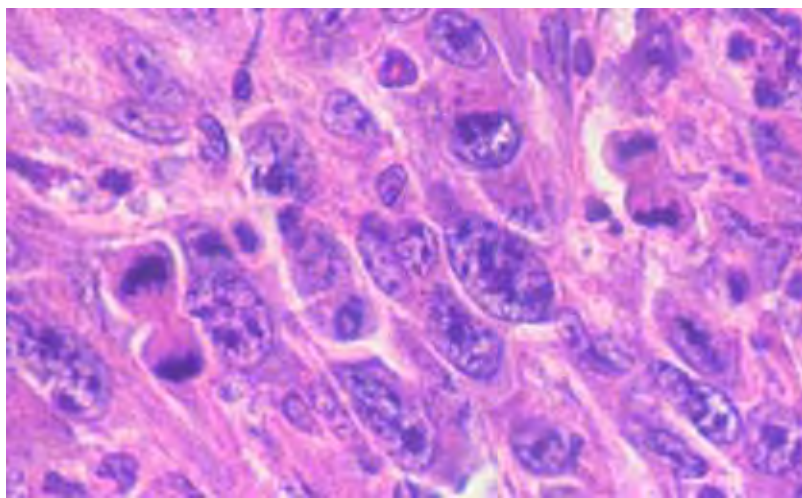


Figura 7. Mitose em células tumorais. Os tumores de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram extraídos após 40 dias de ingestão dos produtos. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina e observadas sob aumento de 400x. A) Célula em metáfase. B) Duas células em telófase.

5.6. Quantidade de células em apoptose nos tumores

A quantidade de células apoptóticas em cada tumor (Figuras 8 e 9, Tabela 5) foi contada estereometricamente através da marcação das células com o reagente de TUNEL associado ao fluorocromo FITC. As células foram contracoradas com iodeto de propídio.

Observa-se uma quantidade maior de células em estágio apoptótico nos animais que receberam produto derivado de soja. Quando comparado ao grupo controle SS, houve um aumento na quantidade de células apoptóticas nos grupos PFS ($p < 0,05$) e PFSI ($p < 0,001$). O grupo PFSI também apresenta um resultado significativamente mais elevado em relação ao grupo PNFS ($p < 0,05$).

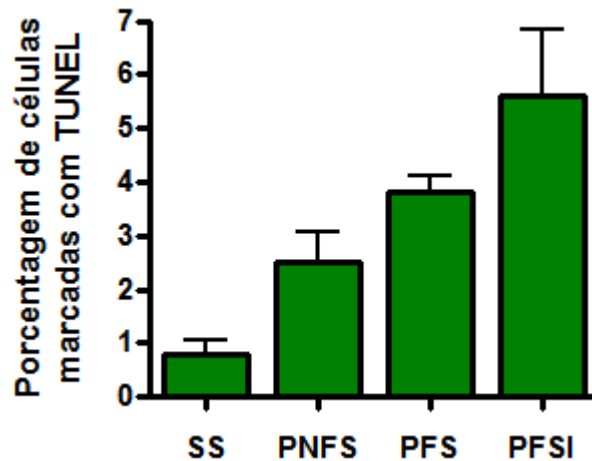


Figura 8. Quantidade de células em apoptose no tumor. Os tumores de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram extraídos após 40 dias de ingestão dos produtos. As células em apoptose foram contadas em lâminas coradas com reagente de TUNEL e iodeto de propídio. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em números absolutos, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo. O grupo SS diferiu significativamente de PFS ($p < 0,05$) e PFSI ($p < 0,001$); o grupo PNFS diferiu significativamente de PFSI ($p < 0,05$).

Tabela 5. Quantidade de células em apoptose no tumor.

Grupos	Células apoptóticas*
SS	0,7933 \pm 0,2460 ^a
PNFS	2,493 \pm 0,5786 ^{a,b}
PFS	3,800 \pm 0,2945 ^{b,c}
PFSI	5,610 \pm 1,241 ^c

*Resultados expressos como a média \pm desvio-padrão em números absolutos, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo. ^{a,b,c}Classificação estatística baseada no teste ANOVA.

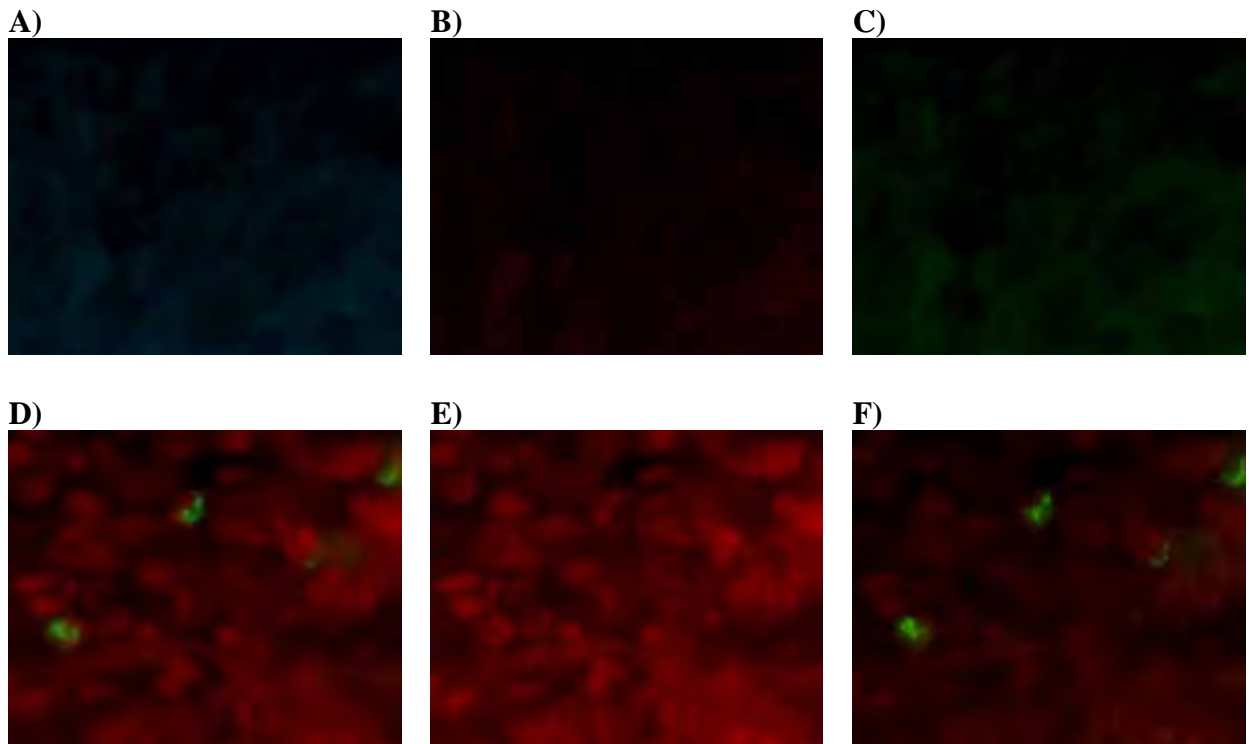


Figura 9. Células tumorais apoptóticas. Os tumores de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram extraídos após 40 dias de ingestão dos produtos. As células em apoptose foram observadas em lâminas coradas com reagente de TUNEL e iodeto de propídio em microscópio de fluorescência, em aumento de 1000x, nos filtros branco, verde e azul. Os controles estão representados por A (filtro branco), B (filtro verde) e C (filtro azul); células marcadas com reagente de TUNEL (em verde) e iodeto de propídio (em vermelho) podem ser observadas em D (filtro branco), E (filtro verde) e F (filtro azul).

5.7. Avaliação da citotoxicidade de macrófagos peritoneais e linfócitos esplênicos através da técnica de MTT

Os ensaios para determinação da citotoxicidade demonstraram que as células peritoneais, não são sensíveis ao cultivo em presença de LPS a 10 µg/mL por 24 horas, apresentando viabilidade celular média de $93,36 \pm 3,283\%$.

Os linfócitos esplênicos não são sensíveis ao cultivo mediante ConA a 0,5 µg/mL por 24 horas, apresentando viabilidade celular média de $97,45 \pm 1,573\%$.

5.8. Determinação da produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais

Nos macrófagos peritoneais murinos, o LPS, utilizado como controle positivo, foi o composto que gerou uma maior produção de NO (Figura 10, Tabela 6) quando comparado ao controle negativo ($p < 0,001$ para todos os grupos), conforme esperado ($p < 0,001$ para todos os grupos).

Quando comparada a produção de NO entre animais de grupos diferentes, mas submetidos *ex vivo* ao mesmo estímulo, não se observa diferença significativa ($p > 0,05$).

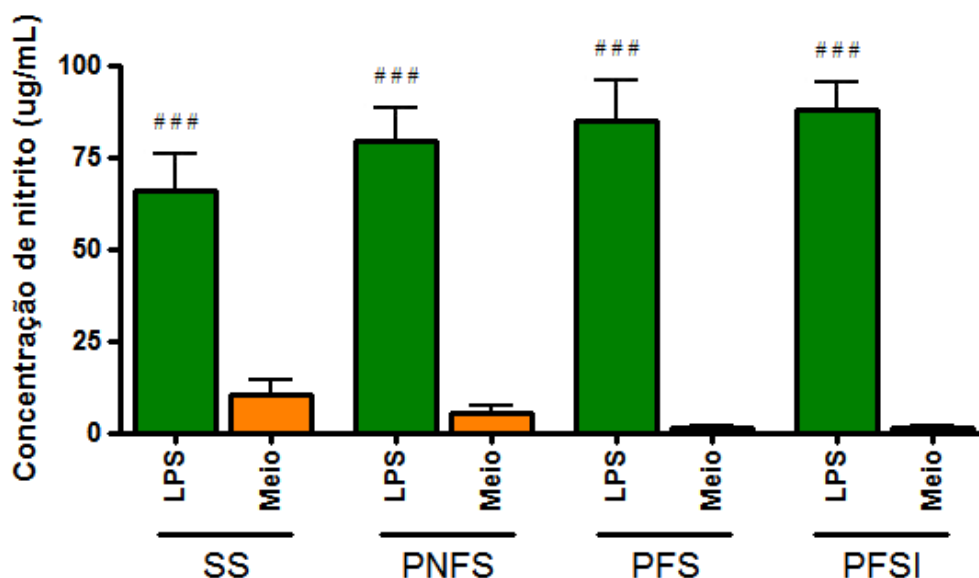


Figura 10. Produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais. As células aderentes de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com LPS ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A concentração de nitrito foi determinada utilizando o reagente de Griess. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão de μ mol de nitrito de duplicatas de 5 animais.

$p < 0,001$ quando comparado LPS com Meio dentro de um mesmo grupo.

Tabela 6. Produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais.

Grupos	LPS (μ mol de nitrito)	Meio (μ mol de nitrito)
SS	65,83 \pm 10,04	10,47 \pm 3,928
PNFS	79,17 \pm 9,231	5,391 \pm 2,045
PFS	85,03 \pm 10,97	1,279 \pm 0,387
PFSI	87,85 \pm 7,250	1,221 \pm 0,7798

As células aderentes tratadas com LPS apresentaram diferença estatística em relação ao Meio ($p < 0,001$) em cada um dos grupos. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos mediante mesmo estímulo *ex vivo* ($p < 0,05$).

5.9. Determinação da atividade da arginase em macrófagos peritoneais

A atividade da enzima arginase (Figura 11, Tabela 7) não diferiu naquelas células dos animais expostas ao LPS ou apenas ao meio de cultura por 24 horas dentro de um mesmo grupo ($p>0,05$).

Entretanto, quando analisada a diferença entre células de grupos diferentes que tenham sido expostas ao mesmo estímulo *ex vivo*, observa-se que as células do grupo controle SS, tanto quando exposta ao LPS ou não, apresentam uma atividade enzimática significativamente menor do que em relação aos três outros grupos do estudo ($p<0,05$).

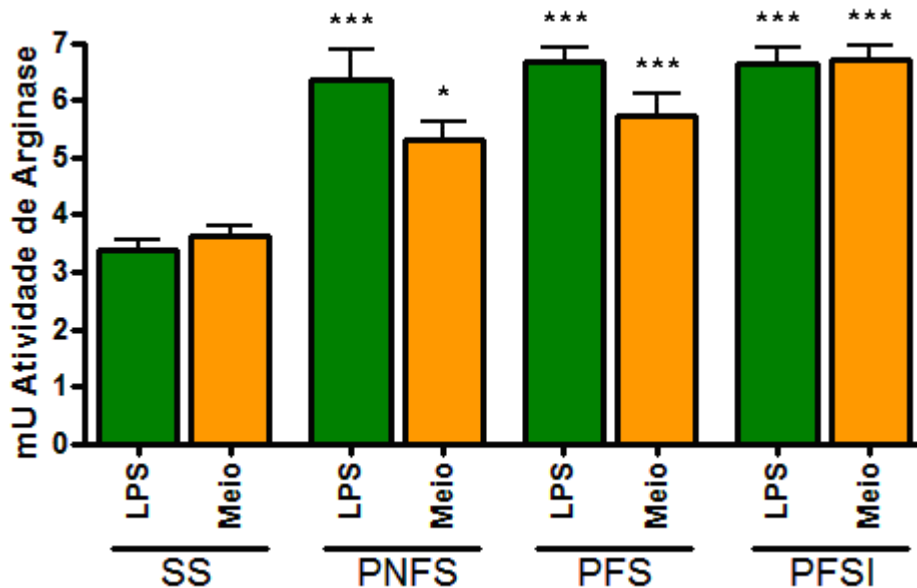


Figura 11. Atividade da arginase em culturas de macrófagos peritoneais. As células aderentes de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com LPS ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de uréia por minuto. Os resultados foram expressos como a média ± desvio-padrão de mU de atividade enzimática de duplicatas de 5 animais.

* p<0,05 quando comparada a atividade enzimática de um grupo com o grupo controle SS mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

*** p<0,001 quando comparada a atividade enzimática de um grupo com o grupo controle SS mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

Tabela 7. Atividade da arginase em culturas de macrófagos peritoneais.

Grupos	LPS*	Meio*
SS	3,394 ± 0,1628 ^a	3,636 ± 0,1823
PNFS	6,349 ± 0,5422 ^b	5,323 ± 0,2845
PFS	6,684 ± 0,2411 ^b	5,736 ± 0,3782
PFSI	6,650 ± 0,2744 ^b	6,709 ± 0,2588

As células aderentes de animais do grupo controle SS mediante estímulo do LPS apresentaram menor atividade enzimática quando comparados aos grupos PNFS, PFS e PFSI (p<0,001 para todos os grupos), mediante mesmo estímulo *ex vivo*. As células aderentes de animais do grupo controle em ausência de estímulo, apresentaram menor atividade enzimática quando comparados aos grupos PNFS (p<0,05), PFS (p<0,001) e PFSI (p<0,001), em ausência de estímulo. *Resultados expressos como a média ± desvio-padrão de mU de atividade enzimática de duplicatas de 5 animais. ^{a,b}Classificação estatística baseada no teste ANOVA.

5.10. Determinação da citocina TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Nos macrófagos peritoneais murinos, a produção de TNF- α (Figura 12, Tabela 8) foi maior sob o estímulo do LPS quando comparado ao Meio, em cada um dos grupos ($p < 0,01$).

A quantidade de TNF- α liberada pelas células dos grupos SS e PNFS, mediante estímulo do LPS, foi significativamente menor do que a liberada pelos grupos PFS e PFSI ($p < 0,001$ em todas as análises) mediante o mesmo estímulo.

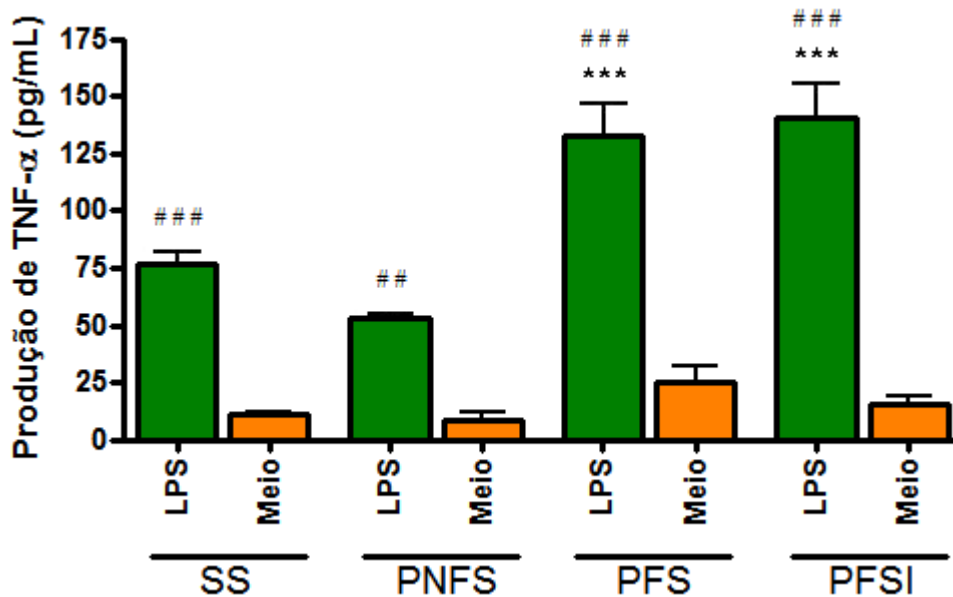


Figura 12. Produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais. As células aderentes de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com LPS ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A determinação desta citocina foi realizada através do ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

$p < 0,01$ quando comparado LPS com Meio dentro de um mesmo grupo.

$p < 0,001$ quando comparado LPS com Meio dentro de um mesmo grupo.

*** $p < 0,001$ quando comparada a produção da citocina de um grupo com o grupo controle SS mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

Tabela 8. Produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.

Grupos	LPS*	Meio*
SS	77,11 \pm 5,095 ^a	11,28 \pm 0,704
PNFS	53,29 \pm 1,900 ^a	8,713 \pm 3,214
PFS	132,4 \pm 14,25 ^b	25,04 \pm 6,833
PFSI	141,0 \pm 14,19 ^b	15,15 \pm 3,915

As células aderentes que receberam o estímulo do LPS apresentam maior produção da citocina em relação àquelas que não receberam, dentro dos grupos SS ($p < 0,001$), PNFS ($p < 0,01$), PFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,001$). As células aderentes de animais dos grupos SS e PNFS, mediante estímulo do LPS, apresentaram menor produção da citocina quando comparados aos grupos PFS e PFSI ($p < 0,001$ para todas as análises realizadas), mediante mesmo estímulo *ex vivo*. *Resultados expressos em média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais. ^{a,b}Classificação estatística baseada no teste ANOVA.

5.11. Determinação da citocina IL-12 em culturas de macrófagos peritoneais

Nos macrófagos peritoneais murinos, a produção de IL-12 (Figura 13, Tabela 9) foi maior sob o estímulo do LPS quando comparado ao Meio, em cada um dos grupos ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre a quantidade de IL-12 liberada pelas células dos diferentes grupos de estudo, mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

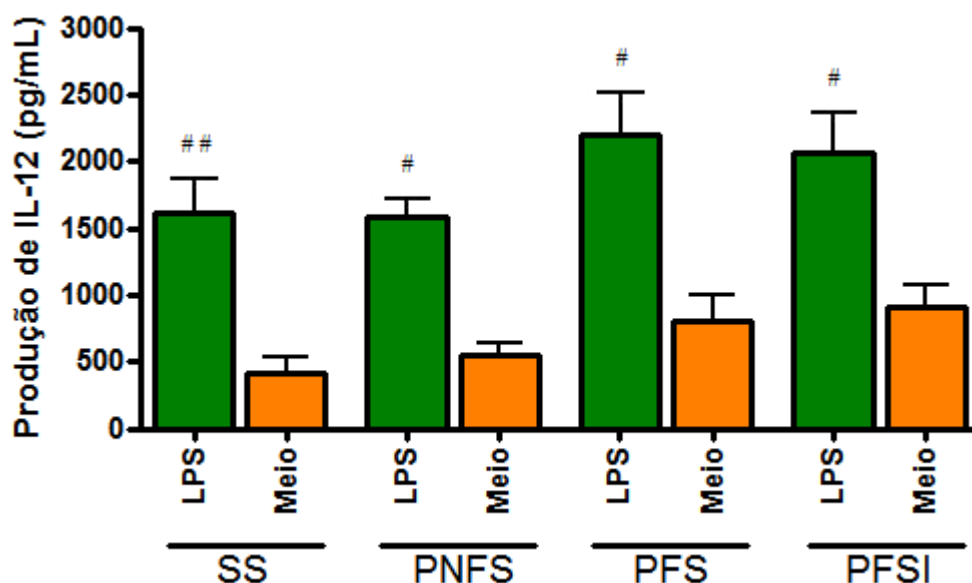


Figura 13. Produção de IL-12 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais. As células aderentes de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com LPS ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A determinação desta citocina foi realizada através do ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

$p < 0,05$ quando comparado LPS com Meio dentro de um mesmo grupo.

$p < 0,01$ quando comparado LPS com Meio dentro de um mesmo grupo.

Tabela 9. Produção de IL-12 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.

Grupos	LPS*	Meio*
SS	1610 \pm 257,3	412,3 \pm 120,0
PNFS	1582,0 \pm 137,4	544,7 \pm 93,82
PFS	2193,0 \pm 319,4	809,5 \pm 194,2
PFSI	2062,0 \pm 296,7	916,7 \pm 158,5

As células aderentes que receberam o estímulo do LPS apresentam maior produção da citocina em relação àquelas que não receberam, dentro dos grupos SS ($p < 0,001$), PNFS ($p < 0,01$), PFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,001$). *Resultados expressos em média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

5.12. Determinação da citocina IL-6 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Nos macrófagos peritoneais murinos, a produção de IL-6 (Figura 14, Tabela 10) foi maior sob o estímulo do LPS quando comparado ao Meio, em cada um dos grupos ($p < 0,01$).

Não houve diferença significativa entre a quantidade de IL-6 liberada pelas células dos diferentes grupos de estudo, mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

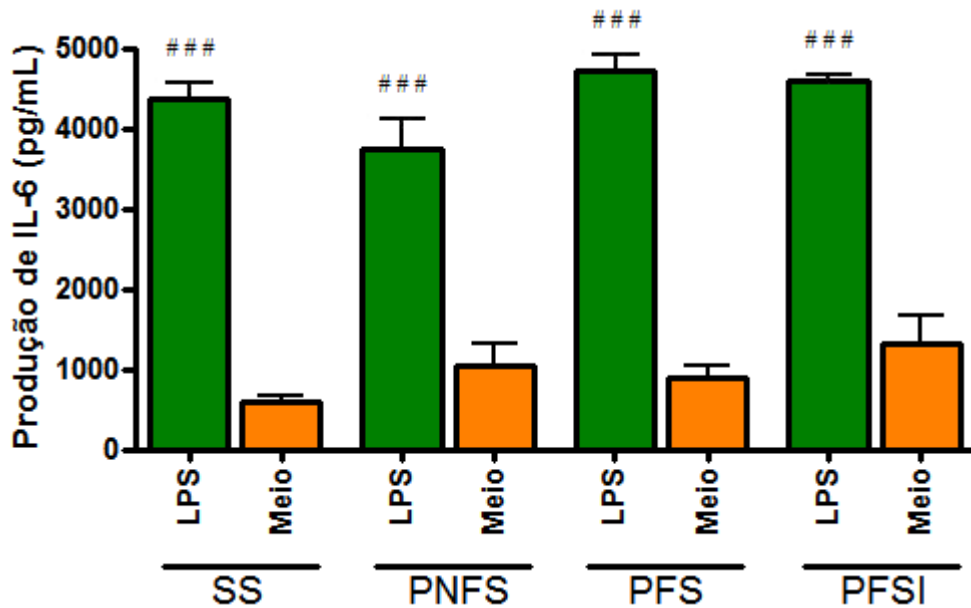


Figura 14. Produção de IL-6 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais. As células aderentes de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com LPS ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A determinação desta citocina foi realizada através do ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

$p < 0,001$ quando comparado LPS com Meio dentro de um mesmo grupo.

Tabela 10. Produção de IL-6 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.

Grupos	LPS*	Meio*
SS	1355,0 \pm 211,5	599,5 \pm 62,28
PNFS	3746,0 \pm 377,5	1048,0 \pm 275,0
PFS	4718,0 \pm 195,8	887,1 \pm 149,6
PFSI	4580 \pm 90,44	1311,0 \pm 346,0

As células aderentes que receberam o estímulo do LPS apresentam maior produção da citocina em relação àquelas que não receberam, em todos os grupos ($p < 0,001$). *Resultados expressos em média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

5.13. Determinação da citocina IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Nos macrófagos peritoneais murinos, a produção de IL-10 (Figura 15, Tabela 11) foi maior sob o estímulo do LPS quando comparado ao Meio, em cada um dos grupos ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre a quantidade de IL-10 liberada pelas células dos diferentes grupos de estudo, mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

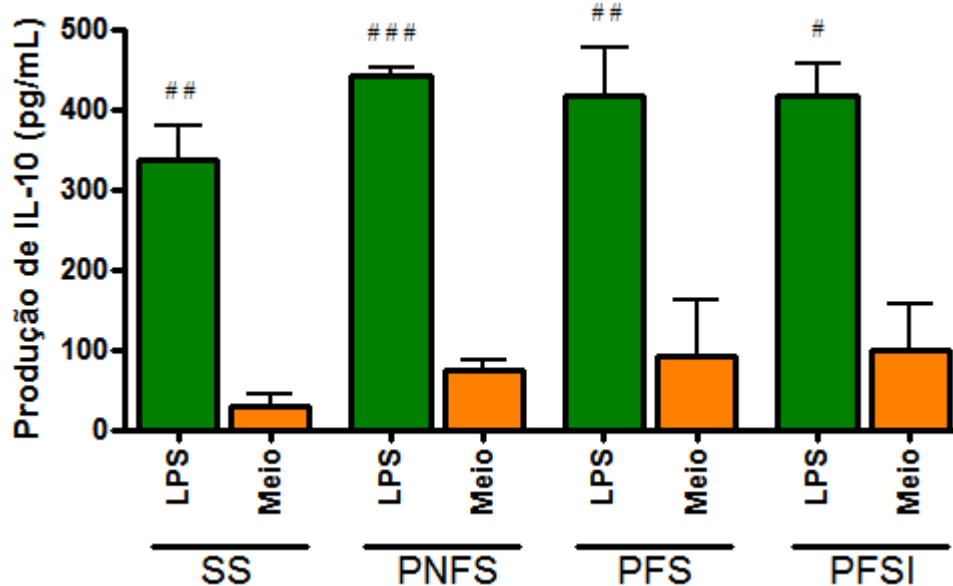


Figura 15. Produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais. As células aderentes de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com LPS ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A determinação desta citocina foi realizada através do ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

$p < 0,05$ quando comparado LPS com Meio dentro de um mesmo grupo.

$p < 0,01$ quando comparado LPS com Meio dentro de um mesmo grupo.

$p < 0,001$ quando comparado LPS com Meio dentro de um mesmo grupo.

Tabela 11. Produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.

Grupos	LPS*	Meio*
SS	337,4 \pm 40,88	29,12 \pm 13,89
PNFS	440,5 \pm 10,16	73,61 \pm 14,02
PFS	416,2 \pm 61,03	90,45 \pm 71,32
PFSI	417,3 \pm 38,77	100,2 \pm 57,59

As células aderentes que receberam o estímulo do LPS apresentam maior produção da citocina em relação àquelas que não receberam, dentro dos grupos SS ($p < 0,01$), PNFS ($p < 0,001$), PFS ($p < 0,01$) e PFSI ($p < 0,05$). *Resultados expressos em média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

5.14. Determinação da citocina IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos

Nos linfócitos esplênicos murinos, a produção de IFN- γ (Figura 16, Tabela 12) foi maior sob o estímulo do ConA quando comparado ao Meio, nos grupos SS ($p < 0,01$) e PNFS ($p < 0,001$).

A quantidade de IFN- γ liberada pelas células do grupo PFS, mediante estímulo de ConA, foi significativamente menor do que a liberada pelos grupos SS ($p < 0,001$), PNFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,01$) mediante o mesmo estímulo.

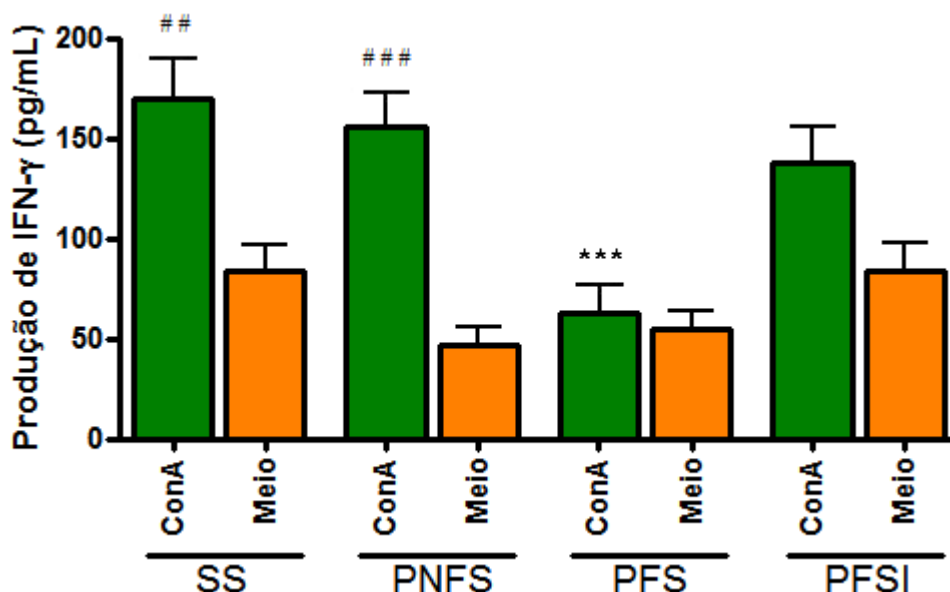


Figura 16. Produção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos. As células de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com ConA ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A determinação desta citocina foi realizada através do ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

$p < 0,01$ quando comparado ConA com Meio dentro de um mesmo grupo.

$p < 0,001$ quando comparado ConA com Meio dentro de um mesmo grupo.

*** $p < 0,001$ quando comparada a produção da citocina de um grupo com o grupo controle SS mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

O grupo PFS, mediante estímulo de ConA, diferiu significativamente dos grupos SS ($p < 0,001$), PNFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,01$).

Tabela 12. Produção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.

Grupos	ConA*	Meio*
SS	169,4 \pm 20,07 ^a	83,83 \pm 12,56
PNFS	156,2 \pm 16,13 ^a	46,43 \pm 9,574
PFS	62,61 \pm 14,10 ^b	54,87 \pm 9,144
PFSI	137,7 \pm 18,17 ^a	83,44 \pm 14,07

As células que receberam o estímulo de ConA apresentam maior produção da citocina em relação àquelas que não receberam, dentro dos grupos SS ($p < 0,01$) e PNFS ($p < 0,001$). As células de animais do grupo PFS, mediante estímulo de ConA, apresentaram menor produção da citocina quando comparados aos grupos SS ($p < 0,001$), PNFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,01$), mediante mesmo estímulo *ex vivo*. *Resultados expressos em média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

^{a,b}Classificação estatística baseada no teste ANOVA.

5.15. Determinação da citocina IL-4 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos

Nos linfócitos esplênicos murinos, a produção de IL-4 (Figura 17, Tabela 13) foi maior sob o estímulo do ConA quando comparado ao Meio, no grupo PFS ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre a quantidade de IL-4 liberada pelas células dos diferentes grupos de estudo, mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

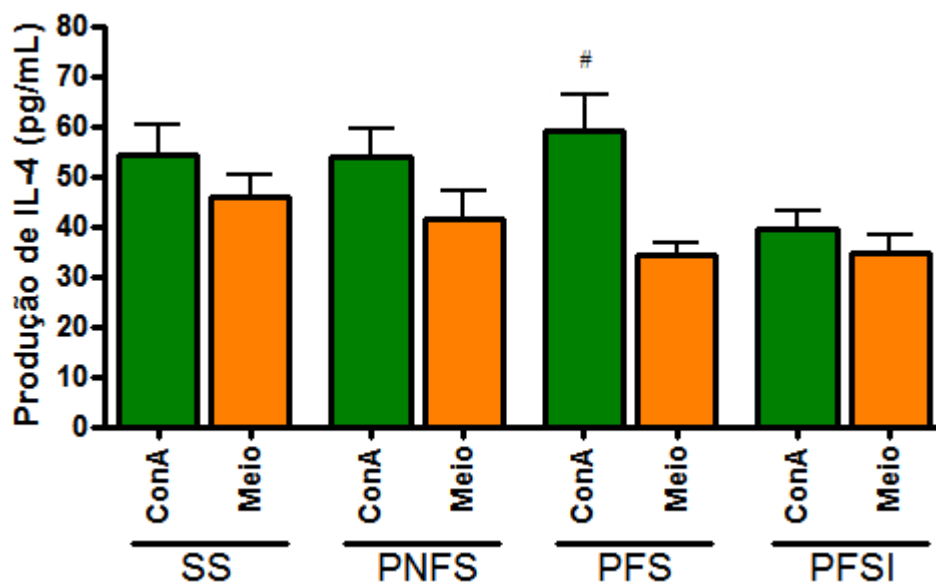


Figura 17. Produção de IL-4 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos. As células de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com ConA ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A determinação desta citocina foi realizada através do ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos como a média ± desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

p<0,05 quando comparado ConA com Meio dentro de um mesmo grupo.

Tabela 13. Produção de IL-4 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.

Grupos	ConA*	Meio*
SS	54,38 ± 5,922	45,83 ± 4,480
PNFS	53,83 ± 5,442	41,30 ± 5,630
PFS	59,01 ± 7,248	34,44 ± 2,309
PFSI	39,59 ± 3,653	34,76 ± 3,316

As células que receberam o estímulo de ConA apresentam maior produção da citocina em relação àquelas que não receberam, dentro do grupo PFS (p<0,05). *Resultados expressos em média ± desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

5.16. Determinação da citocina IL-5 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos

Nos linfócitos esplênicos murinos, a produção de IL-5 (Figura 18, Tabela 14) foi maior sob o estímulo do ConA quando comparado ao Meio, nos grupos SS e PNFS ($p < 0,001$ para ambos).

A quantidade de IL-5 liberada pelas células do grupo SS, mediante estímulo de ConA, foi significativamente maior do que a liberada pelos grupos PNFS ($p < 0,01$), PFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,001$) mediante o mesmo estímulo. Além disto, a produção de IL-5 do grupo PNFS, mediante estímulo de ConA, também foi significativamente maior do que a dos grupos PFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,05$).

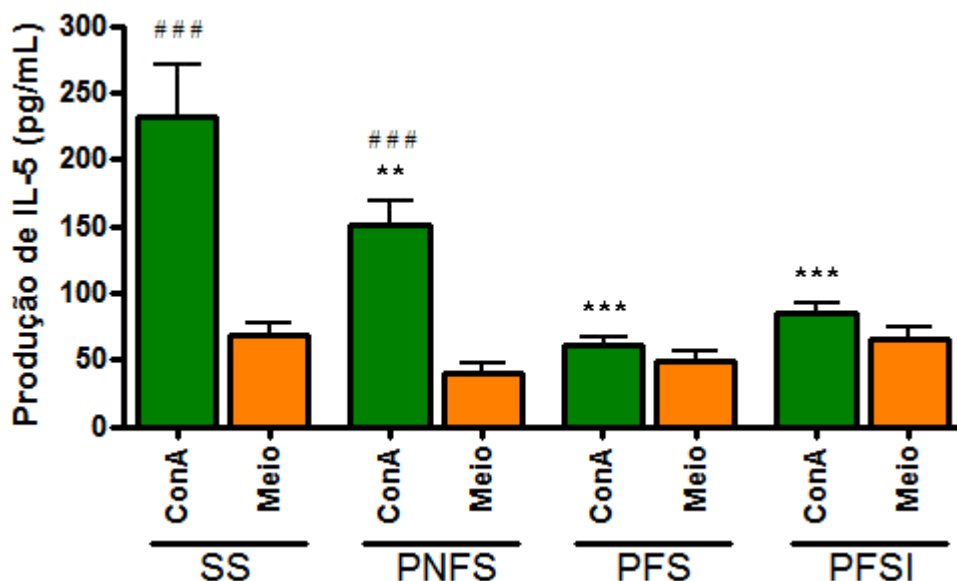


Figura 18. Produção de IL-5 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos. As células de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com ConA ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A determinação desta citocina foi realizada através do ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos como a média ± desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

p<0,001 quando comparado ConA com Meio dentro de um mesmo grupo.

** p<0,01 quando comparada a produção da citocina de um grupo com o grupo controle SS mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

*** p<0,001 quando comparada a produção da citocina de um grupo com o grupo controle SS mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

O grupo PNFS, mediante estímulo de ConA, diferiu significativamente dos grupos SS (p<0,01), PFS (p<0,001) e PFSI (p<0,05).

Tabela 14. Produção de IL-5 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.

Grupos	ConA*	Meio*
SS	232,1 ± 38,73 ^a	68,51 ± 9,598
PNFS	150,9 ± 17,56 ^b	39,98 ± 7,889
PFS	60,84 ± 6,319 ^c	49,17 ± 7,252
PFSI	85,41 ± 7,134 ^c	65,21 ± 8,721

As células que receberam o estímulo de ConA apresentam maior produção da citocina em relação àquelas que não receberam, dentro dos grupos SS (p<0,001) e PNFS (p<0,001). As células de animais do grupo SS, mediante estímulo de ConA, liberaram significativamente mais citocina do que os grupos PNFS (p<0,01), PFS (p<0,001) e PFSI (p<0,001), mediante o mesmo estímulo. A produção da citocina do grupo PNFS, mediante estímulo de ConA, foi significativamente maior do que a dos grupos PFS (p<0,001) e PFSI (p<0,05). *Resultados expressos em média ± desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais. ^{a,b,c}Classificação estatística baseada no teste ANOVA.

5.17. Determinação da citocina IL-10 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos

Nos linfócitos esplênicos murinos, a produção de IL-10 (Figura 19, Tabela 15) foi maior sob o estímulo do ConA quando comparado ao Meio, em todos os grupos ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre a quantidade de IL-10 liberada pelas células dos diferentes grupos de estudo, mediante mesmo estímulo *ex vivo*.

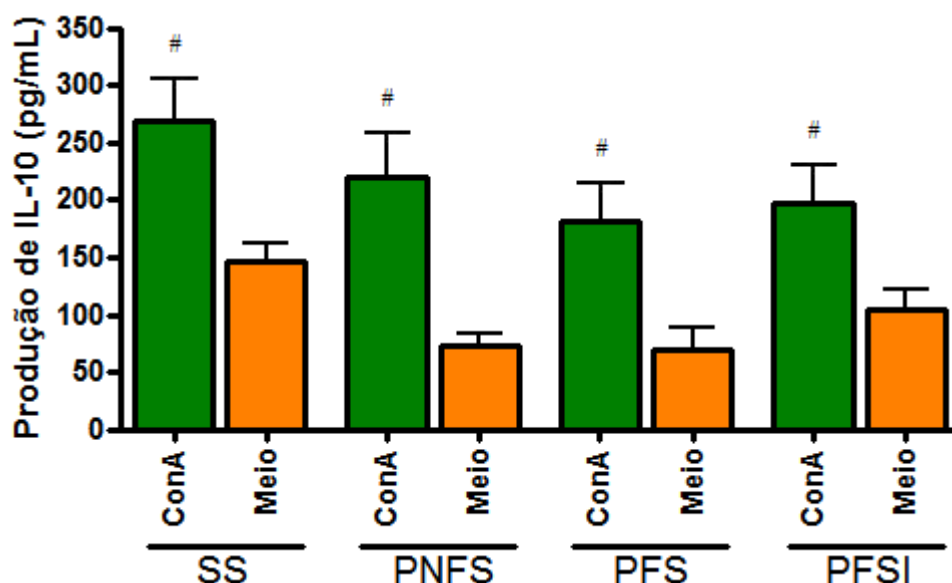


Figura 19. Produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos. As células de animais dos grupos Solução Salina (SS), Produto Não Fermentado de Soja (PNFS), Produto Fermentado de Soja (PFS) e Produto Fermentado de Soja Acrescido de Isoflavonas (PFSI) foram incubadas com ConA ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C por 24 hs a 37°C. A determinação desta citocina foi realizada através do ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

$p < 0,05$ quando comparado ConA com Meio dentro de um mesmo grupo.

Tabela 15. Produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de linfócitos esplênicos.

Grupos	ConA*	Meio*
SS	268,0 \pm 38,34	146,2 \pm 15,86
PNFS	219,1 \pm 39,80	72,06 \pm 11,37
PFS	180,9 \pm 33,44	70,28 \pm 18,23
PFSI	197,1 \pm 32,71	103,6 \pm 18,53

As células que receberam o estímulo de ConA apresentam maior produção da citocina em relação àquelas que não receberam, dentro dos grupos SS, PNFS, PFS e PFSI ($p < 0,05$). *Resultados expressos em média \pm desvio-padrão em pg/mL de duplicatas de 5 animais.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A função primordial do sistema imune é proteger o organismo contra possíveis ameaças, dentre as quais o câncer. Uma resposta sistêmica pode ser iniciada pelo sistema imune inato, através da ativação de diversas células, dentre as quais, o macrófago. Os macrófagos são células originadas a partir dos monócitos provenientes da medula óssea e constituem a segunda maior população celular do sistema imune. Abrigam tecidos, dentre os quais o intestino, e desempenham um papel importante na resposta imune inata deste órgão. A fagocitose é seu principal mecanismo de ação como uma das primeiras linhas de defesa contra possíveis ameaças (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005).

Os macrófagos ativados podem responder em dois perfis principais distintos, conhecidos como M1 e M2. Os macrófagos M1 possuem um fenótipo com alta produção de IL-12, alta produção de IL-23 e baixa produção de IL-10 e são eficientes produtores de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , induzindo em linfócitos T respostas do tipo Th1, fundamental contra tumores. Os macrófagos do tipo M2 possuem um fenótipo característico de baixa produção de IL-12, baixa produção de IL-23 e alta produção de IL-10, com capacidade variável de produzir citocinas inflamatórias. O seu metabolismo da arginina tende a ser voltado para a produção de ornitina e poliaminas, e não para a formação de óxido nítrico (NO). Em geral, células M2 participam de respostas Th2, possuindo funções imunorreguladoras. Em relação ao câncer, estas células estão presentes no microambiente tumoral e contribuem para a progressão do tumor (ALLAVENA et al., 2008; MANTOVANI et al., 2008).

Inicialmente, foi realizado um teste para verificar o potencial tóxico dos agentes estimulantes que seriam utilizados *ex vivo* ao longo do estudo. Foi empregada a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) para verificação da atividade e integridade mitocondrial, interpretada

como uma medida da viabilidade celular (MOSMAN, 1983). Tanto os macrófagos peritoneais murinos tratados com LPS ($93,36 \pm 3,283\%$) quanto os linfócitos esplênicos tratados com ConA ($97,45 \pm 1,573\%$) demonstraram uma viabilidade satisfatória mediante cultivo 24 hs, indicando serem estas substâncias passíveis de uso na pesquisa, sem induzirem morte celular nestas concentrações utilizadas (item 5.2).

Observando-se as propriedades funcionais dos alimentos derivados de soja e das bactérias probióticas, foi desenvolvido um produto de soja fermentado por *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, SP (ROSSI et al., 1999), que foi testado no presente estudo quanto à capacidade de possuir atividade antitumoral. Para verificar a presença de tal atividade, no presente estudo, camundongos fêmeas foram alimentados com 0,5 mL/dia de solução salina (grupo SS), produto não fermentado de soja (PNFS), produto fermentado de soja (PFS) ou produto fermentado de soja acrescido de isoflavonas (PFSI) durante 40 dias de estudo. No décimo dia, os animais receberam um inóculo de adenocarcinoma mamário murino LM3 subcutaneamente no flanco esquerdo. Após este período, os animais foram eutanasiados e todos os testes foram realizados.

Os ensaios biológicos realizados com macrófagos peritoneais foram: observação da produção de NO, através da técnica de Griess, verificação da atividade da arginase e dosagem das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12 através do teste de ELISA. O NO é um dos produtos de macrófagos ativados e apresenta inúmeras atividades, dentre elas antibacteriana, antiparasitária e antiviral. Porém, o descontrole na síntese de NO está implicado na patogênese da hipertensão, sepse, doenças cerebrais degenerativas e câncer (COSTA et al., 2003). Nas regiões normóxicas tumorais, os macrófagos infiltrados podem produzir NO de modo a garantir a sobrevivência da célula e gerar efeitos pró-angiogênicos. Entretanto, em regiões hipóxicas, a grande geração de NO pode ser tóxica e reduzir a sobrevivência das células tumorais (WEIGERT E BRÜNE, 2008). Entretanto, é suposto que, além de contribuir para a sobrevivência e angiogênese de células tumorais em tumores já estabelecidos, o NO e outros intermediários reativos de oxigênio

poderiam acarretar em danos ao DNA e mutações, contribuindo para a iniciação tumoral (LIN e KARIN, 2007). Neste estudo, não foi observada uma produção sistêmica de NO (Figura 4, Tabela 2) diferente do grupo controle ($p > 0,05$) em culturas de macrófagos peritoneais de animais que receberam produtos de soja, o que acaba por evitar possíveis efeitos maléficos que este mediador poderia gerar. Entretanto, em um estudo prévio utilizando um delineamento experimental diferente, com maiores quantidades de produto administrado diariamente, foi demonstrado que o consumo diário do produto fermentado de soja reduziu a produção de NO por macrófagos sistêmicos (KINOUCI, 2006). Possivelmente, a diferença entre o presente estudo e o anterior pode indicar que a quantidade de produto administrada diariamente afete os resultados obtidos. Ainda há muito que se conhecer em relação à interação dos componentes dos produtos de soja utilizados, a quantidade ideal dos mesmos e a resposta fisiológica obtida.

Apesar de não modificar a produção de NO, o consumo do produto não fermentado de soja e do produto fermentado de soja, acrescido ou não de isoflavonas, gerou o aumento da atividade da enzima arginase de macrófagos peritoneais ($p < 0,001$, mediante estímulo de LPS; Figura 5, Tabela 3) quando comparados ao grupo controle. A disponibilidade de L-arginina é um fator limitante para a produção de NO através da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e também para a produção de uréia e poliaminas através da arginase. O balanço entre as duas enzimas é regulado competitivamente pelas citocinas de perfil Th1 e Th2 secretadas por linfócitos T: Th1 induz iNOS, enquanto Th2 induz arginase. O aumento da atividade da arginase tende a estar relacionado com uma redução dos níveis de NO (MORRIS et al., 2009), apesar da redução de NO não ter sido observada no presente estudo. Enquanto os macrófagos expressando iNOS participam de respostas pró-inflamatórias, a função de macrófagos expressando arginase apresenta controvérsias. É sugerido pela literatura que a expressão de arginase I em macrófagos poderia promover inflamação, fibrose e reparação tecidual ao gerar um aumento na produção de L-prolina, poliaminas e um perfil de produção de citocinas do tipo Th2. Entretanto, um estudo compreendendo infecção por *Schistosoma mansoni*, de perfil Th2, mostrou haver um aumento da

atividade da arginase I associado com inibição da inflamação e da fibrose. Quando os camundongos do estudo tiveram o gene para a enzima modificado, de modo a não se ativar, os animais morreram rapidamente durante a infecção por causa de inflamação granulomatosa, fibrose no fígado e hipertensão portal. Esta atividade imunomoduladora da arginase foi independente das citocinas IL-10 e TGF- β , sugerindo que os produtos desta enzima possam agir diretamente de forma imunossupressora, e não apenas indutores de um perfil Th2 (MORRIS et al., 2009; PESCE et al., 2009).

Quando analisadas as citocinas, observamos que os macrófagos peritoneais dos animais que receberam produto fermentado de soja e produto fermentado de soja acrescido de isoflavonas foram capazes de produzir mais TNF- α em relação aos grupos PNFS e SS ($p < 0,001$ em todas as análises; Figura 6, Tabela 4), mas não houve diferença estatística para nenhum dos grupos de estudo em relação às citocinas IL-6 ($p > 0,05$, Figura 8, Tabela 6), IL-10 ($p > 0,05$, Figura 9, Tabela 7) e IL-12 ($p > 0,05$, Figura 7, Tabela 5). Corroborando nossos resultados, estudos anteriores realizados com produto fermentado de soja, com administração de 1,0 mL/dia, indicam que este pode ser capaz de elevar a produção de IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α por macrófagos peritoneais (KINOUCI, 2006) e que a ingestão da bactéria *Enterococcus faecium* CRL 183 acarreta em maior produção de TNF- α (SIVIERI et al., 2008). Além disto, a administração do leite fermentado com *Lactobacillus helveticus* pode ativar as células do sistema imune, aumentando a produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em animais portadores de adenocarcinoma mamário (LEBLANC et al., 2005). A literatura demonstra claramente que ambas as espécies probióticas utilizadas nos produtos fermentados de soja e o próprio produto fermentado, observado em estudo anterior, são capazes de aumentar a produção de TNF- α , concordantes com os resultados aqui expostos. O TNF- α possui atividade antitumoral contra várias linhagens tumorais, em parte por estimular a liberação de IFN's. Entretanto, ela pode aumentar a capacidade de invasão, proliferação e sobrevivência da célula tumoral ao ativar os genes dependentes de NF- κ B (LIN e KARIN, 2007; GERMANO et al., 2008). Os efeitos do

TNF- α são ambíguos, e sua produção aumentada no presente estudo poderia estar voltada para um efeito benéfico, ao invés de um maléfico, visto que o volume tumoral final dos animais dos grupos PFS e PFSI foram significativamente menor do que dos outros grupos, o que será discutido mais adiante.

A citocina IL-6 é fundamental para o crescimento tumoral e sobrevivência à apoptose, e muitos dos genes relacionados a ela estão ligados à progressão do ciclo celular (LIN e KARIN, 2007), enquanto a IL-10 é uma citocina imunossupressora, capaz de inibir a liberação de diversas outras citocinas e mediadores pelos macrófagos, impedindo a resposta contra neo-antígenos (MOSSE e EDWARDS, 2008). Não houve alterações nos níveis destas duas citocinas neste presente estudo, não havendo, portanto, nenhum possível efeito prejudicial relacionado a elas durante o consumo dos produtos de soja. A citocina IL-12 é importante para a resistência do hospedeiro aos tumores, e sua atividade antitumoral foi extensivamente descrita para modelos de câncer utilizando camundongos. Ela parece ser capaz de inibir a tumorigênese e induzir a regressão de tumores já estabelecidos, especialmente ao induzir uma resposta imune do tipo Th1 (LIN e KARIN, 2007). Neste estudo não observamos produção aumentada de IL-12.

Em resumo, as análises realizadas utilizando macrófagos peritoneais de animais portadores de adenocarcinoma mamário murino mostraram que os animais que consumiram diariamente PNFS, PFS ou PFSI apresentaram aumento na atividade da enzima arginase, além de que aqueles que consumiram os produtos fermentados PFS e PFSI apresentaram um aumento nos níveis de TNF- α , em relação ao grupo controle SS. Os macrófagos do tipo M1 apresentam maiores níveis de produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , mas esta condição costuma ser acompanhada de produção de NO e, necessariamente, de baixos níveis de IL-10, como de fato ocorre, mas altos níveis de IL-12, o que não ocorreu neste estudo.

O papel dos macrófagos no câncer é controverso. Os mecanismos de imunovigilância do macrófago são essenciais para prevenir a proliferação de células pré-transformadas. Entretanto, há evidências de que a depleção de macrófagos não tem efeito na suscetibilidade do hospedeiro

ao câncer e, ao contrário, em alguns casos pode até ser benéfica. Os macrófagos M1 têm um potencial de contribuir para os estágios iniciais da neoplasia, liberando radicais livres que geram danos ao DNA, causando mutações. Entretanto, conforme o tumor progride, o microambiente tumoral se modifica e “educa” os macrófagos, levando-os a outro extremo de perfil de ativação: o macrófago M2. Estes macrófagos parecem ser capazes de atuar sinergicamente com o tumor, liberando fatores de crescimento e angiogênicos (LIN e KARIN, 2007; MANTOVANI, 2008). Os macrófagos do tipo M2 possuem um metabolismo da L-arginina voltado para a produção de poliaminas e uréia, através da arginase, uma característica que obtivemos mediante o consumo dos produtos a base de soja. Os macrófagos assim classificados podem produzir citocinas inflamatórias, como o TNF- α , em intensidades variáveis dependendo do estímulo recebido, como, por exemplo, a estimulação através de bactérias probióticas. Entretanto, macrófagos do tipo M2 apresentam caracteristicamente uma alta produção de IL-10, o que não ocorreu neste estudo. Os macrófagos do tipo M2 assumem completamente suas características no microambiente tumoral, onde são expostos a inúmeros estímulos imunossupressores, à hipóxia, e às células em diversos estágios de apoptose e necrose (ALLAVENA et al., 2008; MANTOVANI et al., 2008; MORRIS et al., 2009), e uma análise sistêmica indica apenas o potencial de uma população celular ou de parte do sistema imune de pender a balança para o lado anti- ou pró-tumoral. Além disto, esta classificação rotineira do fenótipo macrofágico não está presente *in vivo*. Nesta situação, existem diversos tipos de fenótipos, variando entre aquele M1 tradicional, responsável por uma inflamação aguda que destrói as células tumorais, e um M2 do tipo imunossupressor e/ou do tipo de reparação tecidual, em diversos níveis de intensidade de ativação e de mesclagem fenotípica entre si (MOSSER e EDWARDS, 2008).

Uma vez ativado, o sistema imune inato auxilia na ativação do sistema imune adaptativo, através da apresentação de antígenos, da expressão de moléculas co-estimulatórias e da secreção de citocinas. Desta forma, há a indução da diferenciação dos linfócitos em diferentes fenótipos com ações efetoras ou de memória. Os linfócitos T virgens se diferenciam em duas categorias

distintas: as células Th1 produzem IFN- γ , IL-2 e IL-12, e são eficientes na resposta imune celular, via ativação de macrófagos, atuantes no combate ao câncer; já as células Th2 liberam IL-4, IL5 e IL-10, que ativam a imunidade humoral (NOBEN-TRAUTH, 2000; RENGARAJAN et al., 2000).

Os ensaios biológicos realizados com linfócitos esplênicos foram as dosagens das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ . A citocina IFN- γ foi produzida em menores quantidades no grupo PFS, quando comparado aos grupos SS ($p < 0,001$), PNFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,01$) (Figura 10, Tabela 8). Semelhantemente, a produção de IL-5 foi reduzida nos grupos que consumiram produtos a base de soja PNFS ($p < 0,01$), PFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,001$), em relação ao grupo controle. Além disto, o grupo que ingeriu o produto não fermentado teve uma produção ligeiramente mais elevada do que os grupos que consumiram os produtos fermentados PFS ($p < 0,001$) e PFSI ($p < 0,05$) (Figura 12, Tabela 10). Os níveis das citocinas IL-4 (Figura 11, Tabela 9) e IL-10 (Figura 9, Tabela 7) foram semelhantes para todos os grupos ($p > 0,05$).

A citocina IL-10 se correlaciona negativamente com o TNF- α e inibe a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias (LIN e KARIN, 2007), e não é surpresa que esta citocina esteja reduzida mediante os altos níveis de TNF- α expressos pelos macrófagos de animais que consumiram PFS ou PFSI.

O IFN- γ é uma citocina anti-tumoral potente, capaz de influenciar nos níveis de IL-12 e TNF- α produzidos por macrófagos, e possui um efeito tóxico direto às células tumorais e apresenta atividade antiangiogênica (LIN e KARIN, 2007). Concordando com o presente estudo, foi observado que, em humanos, as isoflavonas da soja genisteína e daidzeína e seu metabólito equol podem ser potentes redutores das funções leucocitárias, gerando, dentre outros efeitos, uma redução marcante na produção de IFN- γ através de um mecanismo não dependente do receptor de estrogênio. A redução da produção desta citocina era observada a partir de concentrações não tão altas de genisteína (10 μ M), e em concentrações maiores (50 μ M) a genisteína também possuía um efeito inibitório para as citocinas IL-2 e IL-4 (GREDEL et al.,

2008). Como os produtos utilizados ao longo do presente estudo estavam sob a forma líquida, as concentrações de genisteína de PFS e de PFSI se aproximam mais dos menores valores (até 10 μM) utilizados no estudo de Gredel et al. (2008) (baseado em valores fornecidos por SAKAI e KOGISO, 2008), indicando uma possível modulação de IFN- γ pelas isoflavonas, mas sem acarretar nenhum efeito para IL-4. Outros estudos utilizando modelos experimentais diversos corroboram esta regulação negativa de IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias pela genisteína e/ou daidzeína, reduzindo também o NF- κB (PAULA et al., 2008; VALSSECCHI et al., 2008; WANG et al., 2008). Apesar disto, existem estudos que indicam que os produtos fermentados de soja poderiam aumentar a produção de IFN- γ em camundongos (VENDRAMINI, 2002; KINOUCI, 2006). Com frequência, a alteração dos níveis de IFN- γ pode ser correlacionada positivamente com os níveis de TNF- α produzidos por macrófagos (LIN e KARIN, 2007), mas parece que neste caso, os níveis mais elevados de TNF- α não foram gerados por uma produção de IFN- γ , mas de forma independente, como discutido anteriormente.

Quando analisada a resposta imune adaptativa, pouco há na literatura sobre outras citocinas além do IFN- γ . A citocina IL-4 estimula a atividade da arginase em macrófagos, contribuindo desta forma para a produção da matriz extracelular (MOSSER e EDWARDS, 2008). Apesar de haver aumento na atividade da arginase em animais consumindo produtos de soja, o aumento desta atividade não se correlaciona com os níveis de IL-4 no presente estudo. Esta citocina é fundamental para o desenvolvimento de respostas imunes do tipo Th2, que reduzem as funções do macrófago contra tumores ou patógenos, mas ativam estas células para a produção de componentes da matriz extracelular. Além disto, a IL-4 parece fazer uma regulação cruzada com IFN- γ , de modo que o aumento nos níveis de um acarreta na redução nos níveis do outro (MOSSER e EDWARDS, 2008). Entretanto, os níveis de IFN- γ nos animais consumindo PFS estão reduzidos em relação ao grupo controle enquanto os níveis de IL-4 não se encontram elevados. Além disso, os níveis de IL-5, uma citocina produzida por linfócitos do tipo Th2, encontram-se reduzidos em todos os animais que consumiram algum dos produtos de soja. Os

resultados presentes, que indicam redução de IL-5, característico de perfil Th2, e IFN- γ , característico de perfil Th1, sem elevação de IL-4, sugerem primariamente uma redução na função linfocitária, mas, apesar das referências literárias sobre a soja (YELLAYI et al., 2003; GREDEL et al., 2008; PAULA et al., 2008; VALSSECCHI et al., 2008) também indicarem esta possibilidade, seriam necessários mais estudos para afirmar se é realmente isto o que ocorre neste modelo experimental.

Apesar da resistência gerada pelo sistema imune, o tumor é capaz de subverter o sistema de defesa do organismo e se expandir. O câncer de mama é a segunda causa de morte entre todos os cânceres e existem evidências de que o consumo de soja freqüente esteja relacionado a uma possível prevenção (ADLERCREUTZ E MAZUR, 1997; YAMAMOTO et al., 2003; WU et al., 2008). As análises realizadas utilizando células tumorais foram: observação das características gerais do tumor, do grau de angiogênese e da quantidade de mitoses, utilizando como coloração hematoxilina e eosina, e quantificação das células em apoptose, utilizando reagente de TUNEL.

Microscopicamente, o tumor apresenta todas as características esperadas de uma neoplasia bem sucedida expandindo-se no hospedeiro. O tumor apresenta hiper celularidade e contém células atípicas, com diferença no tamanho celular e nuclear. Mitoses podem ser observadas em diversas regiões, indicando proliferação acentuada. Há presença marcante de cordões tumorais e, na periferia, grande quantidade de vasos sanguíneos. É conhecido pela literatura que tumores autólogos desenvolvem uma rede de vasos sanguíneos desde seu início mais precoce, acumulando estes capilares no centro do tumor. Diferentemente, tumores transplantados, como é o caso do presente estudo, atraem a formação de vasos através da liberação de mediadores solúveis, e estes vasos então crescem partindo da periferia para o centro tumoral (LIN E POLARD, 2007). No centro tumoral de alguns dos tumores extraídos há presença de líquido cístico, provavelmente derivado da necrose de células tumorais e do acúmulo de metabólitos liberados pelas células circundantes, decorrente do crescimento acelerado sem suporte nutricional adequado.

Quando analisado o volume tumoral final (Tabela 12) foi observado que os animais dos grupos que receberam PFS ou PFSI tiveram um menor desenvolvimento tumoral em relação ao grupo que recebeu apenas SS ($p < 0,05$ para ambos), indicando que possivelmente haja uma ação do produto probiótico no crescimento do implante tumoral. O grupo PNFS também apresentou um volume tumoral menor do que SS, mas esta diferença não foi significativa estatisticamente. Em estudos utilizando indução química para a formação de tumores de cólon, foi observado que o consumo da bactéria *Enterococcus faecium* CRL 183 reduz a quantidade de pólipos formados em relação ao grupo controle (SIVIERI et al., 2008), apesar de este efeito não ocorrer mediante o consumo do produto fermentado de soja (SILVA et al., 2009). Isto indica que o consumo do produto probiótico pode influenciar o desenvolvimento tumoral e ainda enaltece um possível papel das bactérias probióticas neste efeito. Além disto, os componentes da soja podem estar atuando diretamente nas células tumorais (ZHOU, 1998; YIHAI, 2002), o que parece ser particularmente verdade para alguns tipos de tumores, como os mutantes para BRCA1, que são sensíveis à genisteína (PRIVAT et al., 2009).

Um perfil de citocinas do tipo Th1, especialmente com produção de IFN- γ , tende a reduzir o crescimento do tumor. Já um padrão de resposta do tipo Th2, com liberação de IL-4, IL-5 e IL-10, está diretamente relacionado ao crescimento tumoral e à redução da resposta imune efetiva contra tumores, levando a um pior prognóstico (LIN e KARIN, 2007; TODARO et al., 2008). Apesar de não obtermos um padrão do tipo Th1, o perfil Th2 parece estar reduzido, ao se observar os baixos níveis de IL-5, ou pelo menos não estimulado nos animais que consumiram produtos de soja no presente estudo. Apesar da resposta imune adaptativa que encontramos parecer falha em combater o tumor, os níveis de TNF- α produzidos por macrófagos estão elevados e esta citocina pode influenciar drasticamente no combate ao câncer (LIN e KARIN, 2007).

Para analisar o grau de angiogênese tumoral (Figura 14, Tabela 13), foram observados campos microscópicos em regiões de centro e periferia do tumor. Neste modelo experimental,

não houve diferença no grau de angiogênese entre os animais do grupo controle e aqueles que consumiram alimentos de soja ($p>0,05$), apesar dos animais dos grupos PFS e PFSI apresentarem um aumento de TNF- α (Figura 6, Tabela 4) que pode se correlacionar positivamente com a angiogênese quando em concentrações maiores (NOONAN et al., 2008; ONO, 2008). A citocina IL-10 também se correlaciona positivamente com a angiogênese (LIN e KARIN, 2007) e era de se esperar que não houvesse diferença no grau de angiogênese entre os grupos, visto que não houve liberação diferenciada de IL-10 nem em culturas de macrófagos peritoneais nem em culturas de linfócitos esplênicos. Igualmente, é demonstrado que o IFN- γ também pode ser capaz de modular negativamente a angiogênese (DRANOFF, 2004; LIN e KARIN, 2007), mas seus níveis no presente estudo estão significativamente reduzidos e nenhuma alteração no grau de angiogênese foi observada.

Quando observado o nível de apoptose nos tumores (Figura 18, Tabela 15), o resultado parece estar mais claro. Os animais do grupo PNFS apresentaram um aumento não significativo no número de células apoptóticas em relação ao grupo controle ($p>0,05$), enquanto um aumento significativo é observado nos grupos PFS ($p<0,05$) e PFSI ($p<0,001$), sendo este último mais elevado do que PNFS ($p<0,05$). Estes resultados indicam que o consumo de produtos de soja poderia beneficiar o hospedeiro, sendo este efeito significativo para aqueles alimentos fermentados.

A apoptose é o mecanismo predominante pelo qual as células neoplásicas morrem em resposta ao ataque imune ou mesmo após a utilização de drogas citotóxicas (CONTICELLO et al., 2004). Concordando com o resultado obtido, foi observado que o consumo de leite fermentado com *Lactobacillus helveticus* pode ativar as células do sistema imune, observado pela dosagem de TNF- α , e aumentar a apoptose de células de adenocarcinoma mamário murino, além de reduzir a expressão do oncogene Bcl-2 (LEBLANC et al., 2005). Os receptores de estrógeno também influenciam na apoptose de diversos tipos celulares de forma dúbia: eles podem induzir a apoptose em células de câncer de mama e outros tipos, mas em células normais

eles agem inibindo esta morte celular, por mecanismos ainda desconhecidos envolvendo caminhos extrínsecos e intrínsecos às células (WAMBI e JORDAN, 2009). Algumas citocinas também parecem influenciar na apoptose de células neoplásicas, de uma forma ou de outra, como IL-4, IL-6 e IL-10 (CONTICELLO et al., 2004; LIN e KARIN, 2007; TODARO et al., 2008), nenhuma das quais apresentou alteração em suas concentrações nas culturas celulares em relação aos grupos controle. Contraditoriamente, o TNF- α é capaz de promover a sobrevivência da célula tumoral levando à expressão de genes anti-apoptóticos em muitos tumores mais avançados (LIN e KARIN, 2007), ao mesmo tempo em que possui atividade antitumoral contra várias linhagens tumorais (GERMANO et al., 2008). Devido aos altos níveis de TNF- α produzidos por macrófagos peritoneais de animais que consumiram PFS e PFSI e o aumento do número de células apoptóticas nestes dois grupos, parece que a função desempenhada pelo TNF- α neste modelo experimental durante este tempo de estudo é primariamente anti-tumoral.

Ao se observar a quantidade de mitoses nos animais de todos os grupos experimentais (Figura 16, Tabela 14), o grupo PNFS apresentou um aumento significativo em relação ao controle ($p < 0,05$), enquanto o grupo PFSI apresentou um aumento não significativo ($p > 0,05$). Ainda assim, como o volume tumoral final é menor do que o do grupo controle, parece que o consumo destes produtos é benéfico ao hospedeiro. Não conseguimos determinar o que levou o grupo que recebeu produto fermentado de soja sem acréscimo de isoflavonas a não apresentar resultado semelhante. Ainda há muito que ser estudado em relação a influência da dieta em regiões distintas do organismos, especialmente em se tratando de uma situação patológica.

Analisando todos os resultados em conjunto, o consumo dos produtos pesquisados parece induzir uma resposta imune em macrófagos, mas reduzir a resposta imune adaptativa. Entretanto, o tumor apresenta menor volume final nestes animais e maior número de células apoptóticas, o que pode ocorrer devido a uma alteração no perfil de resposta do macrófago ou por um efeito direto dos componentes do alimento funcional.

Compreender uma doença crônica e maligna como o câncer requer uma sabedoria muito além do que atingimos hoje. Seria necessário entender todos os mecanismos mais básicos que ocorrem em uma célula normal e como eles podem ser modificados em uma célula transformada, entender ainda a forma pela qual esta alteração a nível celular modifica o microambiente que a circunda, como influencia dramaticamente no organismo como um todo e ainda observar como o estilo de vida e as escolhas pessoais afetam este todo. Ainda há muito que ser esclarecido em relação ao consumo de produtos probióticos de soja, especialmente mediante a magnitude do câncer.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o presente momento permitem concluir que o consumo do produto não fermentado de soja (PNFS), produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 acrescido (PFSI) ou não (PFS) de isoflavonas, na forma e quantidade em que foram administrados, aumenta a produção de TNF- α e eleva a atividade da enzima arginase I de macrófagos peritoneais de um animal portador de câncer de mama. Além disto, houve redução nas concentrações de IFN- γ e IL-5 produzidos por linfócitos esplênicos.

Entretanto, o crescimento tumoral é significativamente menor naqueles animais que consomem produto fermentado de soja, acrescido ou não de isoflavonas, e o número de células apoptóticas é maior.

Referências

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W (1997). Phyto-estrogens and western disease. *Lancet*, 29(2):95-120.

ADOLFSSON, O.; MEYDANI, S.N.; RUSSELL, R.M (2004). Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr*, 80:245-56.

ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M.G.; SICA, A.; MANTOVANI, A (2008). Pathways connecting inflammation and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18:3-10.

ÁLVAREZ, P.; ALVARADO, C.; MATHIEU, F.; JIMÉNEZ, L.; FUENTE, M (2006). Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leucocytes. *European Journal of Nutrition*, 45(8):428-438.

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

BARNES, P.J (2003). Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine and Growth Factor Rev.*, 14:511-522.

BARRET, J.R (2006). The science of soy: what do we really know. *Environmental Health Perspectives*, 114(6):A352-A359.

BELLINGAN, G.J.; COLDWELL, H.; HOWIE, S.E.M.; DRAUSFIELD, I.; HASLETT, C (1996). *In vivo* fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammatory. *J. Immunol.*, 157:2577-2585.

BERRAONDO, P.; PRIETRO, J.; GONZALES-ASEQUINOLAZA, G (2009). Advances in Interleukin-12 Gene Therapy for Acquired Liver Diseases. *Current Gene Therapy*, 10:62-71.

BOGDAN, C (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, 2:907-916.

BORRELLO, M.G.; DEGLINNOCENTI, D.; PIEROTTI, M.A (2008). Inflammation and cancer: The oncogene-driven connection. *Cancer Letters*, 267:262–270.

BREM, S.; COTRAN, R.; FOLKMAN, J (1972). Tumor angiogenesis: a quantitative method for histological grading. *J Natl Cancer Inst*, 48:347–56.

BURNET, F.M (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, 13:1–27.

CARLOS, I.Z.; ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; MACHADO, C.O.; CYRILLO, R.N.S.; PERAZZO, F.F.; VALDEZ, G.F (2000). Avaliação do potencial alergênico de um novo produto fermentado de soja. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 21(1):103-113.

CHARALANPOS, A.; ROILIDES, E (2005). Cytokines and fungal infections. *J. Hematol.*, 129:583-596.

CHEIK, N.; ROSSI, E.; GUERRA, R.; TENÓRIO, N.; NASCIMENTO, C.O.; VIANA, F.; MANZONI, M.; CARLOS, I.Z.; SILVA, P.L.; VENDRAMINI, R.; DÂMASO, A (2008). Effects of a ferment soy product on the adipocyte area reduction and dyslipidemia control in hypercholesterolemic adult male rats. *Lipids in health and disease*, 7:50.

COBBS, C.S.; BRENMAN, J.E.; ALDAPE, K.D.; BREDT, D.S.; ISRAEL, M.A (1995). Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res.*, 55:727-730.

CONTICELLO, C.; PEDINI, F.; ZEUNER, A.; PATTI, M.; ZERILLI, M.; STASSI, G.; MESSINA, Q.; PESCHLE, C.; MARIA, R (2004). IL-4 Protects Tumor Cells from Anti-CD95 and Chemotherapeutic Agents via Up-Regulation of Antiapoptotic Proteins. *The Journal of Immunology*, 172:5467–5477.

CORRALIZA, I.M.; CAMPO, M.L.; SOLER, G.; MODOLELL, M (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods*, 174:231-235.

CORTHÉSY, B.; GASKINS, H.R.; MERCENIER, A (2007). Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J. Nutr.*, 137, 781S–790S.

COSTA, M.T.; FABENI, R.C.; APTEKMANN, K.P.; MACHADO, R.R (2003). Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Ciência Rural*, 33(5), 967-974.

CROCI, D.O.; FLUCK, M.F.Z.; RICO, M.J.; MATAR, P.; RABINOVICH, G.A.; SCHAROVSKY, O.G (2007). Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in

orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*, 56:1687–1700.

DRANOFF, G (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews*, 4, 11-22.

EHRlich, P.U (1909). Ber den jetztigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk*, 5:273–290.

ESPAÑOL, A.; EIJÁNI, A.M.; MAZZONI, E.; DAVEL, L.; JASNIS, M.A.; LUSTIG, E.S.; SALESI, M.E (2002). Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines. *International Journal Of Molecular Medicine*, 9: 651-657.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K (2005). Macrophages in inflammation. *Curr. Drug. Targets Inflamm.Allergy*, 4:281-286.

GALLI, S.; LABATO, M.I.; JOFFÉ, E.B.K.; CARRERAS, M.C., PEDROSO, J.J (2003). Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behaviour. *Cancer Res.*, 63:6370-6377.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A (2008). Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine*, 43:374-379.

GREDEL, S.; GRAD, C.; RECHKEMMER, G.; WALTZ, B (2008). Phytoestrogens and phytoestrogen metabolites differentially modulate immune parameters in human leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 46:3691–3696.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1):131-138.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70.

JENKINSON, C.P.; GRODY, W.W.; CEDERBAUM, S.D (1996). Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol*, 114B:107–132.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: 2009. 98p. Versão online disponível em www.inca.gov.br.

KINOUCI, F.L. “Iogurte” de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama. 2006. Dissertação (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

KOSTELAC, D.; RECHKEMMER, G.; BRIVIBA, K (2003). Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors α and β to the estrogen response element. *J. Agric. Food Chem.*, 51:7632-7635.

KOVALOYSKY, D.; REFOJO, D.; HOSBOER, F.; ARZT, E (2000). Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *J Neuroimmunol.*, 109(1):23-29.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K (1991). Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRIL). *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(9):2227-2233.

LAMPE, J.W (2009). Is equol the key to the efficacy of soy foods? *Am J Clin Nutr*, 89(suppl):1664S–1667S.

LEBLANC, A.M.; MATAR, C.; THERIAULT, C.; PERDIGON, G (2005). Effect of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. *Breast Cancer Research*, 7:R477-R486.

LIN, E.Y.; POLLARD, J.W (2007). Tumor-Associated Macrophages Press the Angiogenic Switch in Breast Cancer. *Cancer Res*, 67(11):5064–5066.

LIN, W.W.; KARIN, M (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest*, 117:1175-1183. doi:10.1172/JCI31537.

MANTOVANI, A.; ROMERO, P.; PALUCKA, A.K.; MARINCOLA, F.M (2008). Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet*, 371:771–783.

MANZONI, M.S.J.; ROSSI, E.A.; CARLOS, I.Z.; VENDRAMINI, R.C.; DUARTE, A.C.G.O.; DÂMASO, A.R (2005). Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats. *Nutrition*, 21:1018-1024.

MATAR, C.; PERDIGON, G (2001). Immuno-modulating effect of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J. of Dairy Res.*, 68:601-609.

MERIC, J.B.; ROTTEY, S.; OLAUSSEN, K.; SORIA, J.C.; KHAYAT, D.; RIXE, O.; SPANO, J.P (2006). Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Oncology Hematology*, 59:51–64.

MORRIS, S.M (2009). Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacology*. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x.

MOSMANN, T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol. Methods.*, 65:55-63.

NAUNDORF, S.; SCHRODER, M.; HOFLICH, C.; SUMAN, N.; VOLK, H.D.; GRUTZ, G (2009). IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 39(4):1066-1077.

NOBEN-TRAUTH, N (2000). Conventional naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J. Immunol.*, 165:3620-3625.

NOMELINI, R.S.; RIBEIRO, L.C.A.; TAVARES-MURTA, B.M.; ADAD, S.J.; MURTA, E.F.C (2008). Production of Nitric Oxide and Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Ovarian Cystic Tumors. *Mediators of Inflammation*. doi:10.1155/2008/186584.

NOONAN, D.M.; BARBARO, A.L.; VANNINI, N.; MORTARA, L.; ALBINI, A (2008). Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev*, 27:31–40.

ONO, M (2008). Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci*, 99:1501-1506.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; KANG, S.A.; KIM, H.Y (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1171–1185.

PAULA, M.L.; RODRIGUES, D.V.; TEIXEIRA, H.C.; BARSANTE, M.M.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, A.P (2008). Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *International Immunopharmacology*, 8:1291–1297.

PESCE, J.T.; RAMALINGAM, T.R.; KANE, M.M.M.; WILSON, M.S.; KASMI, K.C.; SMITH, A.M.; THOMPSON, R.W.; CHEEVER, A.W.; MURRAY, P.J.; WYNN, T.A (2009). Arginase-1-Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine-Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathog*, 5(4). doi:10.1371/journal.ppat.1000371.

PRIVAT, M.; AUBEL, C.; ARNOULD, S.; COMMUNAL, Y.; FERRARA, M.; BIGNON, Y (2009). Breast cancer cell response to genistein is conditioned by BRCA1 mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379:785–789.

RENGARAJAN, J.; SZABO, S.J.; GLIMCHER, L.H (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today*, 21(9):479-483.

ROSSI, E.A.; CARLOS, I.Z.; PEI, Y.C.; VALDEZ, G.F (1999). Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *European Food Research and Technology*, 5:305-307.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; OLIVEIRA, M.N.; VALDEZ, G.F (2003). Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53:47-51.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; UEIJI, I.S.; SQUINZARI, M. M.; SILVA JÚNIOR, S.I.; VALDEZ, G.F (2000). Effects of a Novel Fermented Soy Product on the Serum Lipids of Hypercholesterolemic Rabbits. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 74:213-216.

SAKAI, T.; KOGISO, M (2008). Soy isoflavones and immunity. *J. Med. Invest.*, 55:167-173.

SHIGUEMOTO, G.; ROSSI, E.A.; BALDISSERA, C.H.; BALDISERA, V.; GOUVEIA, C.H.; VALDEZ, G.F.; PEREZ, S.A (2007). Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increases bone mineral density of ovariectomized rats. *Maturitas*, 57:261-270.

RAULET, D.H.; GUERRA, N (2009). Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nature Reviews*.

SHANKAR, R.; TIWARY, S.K.; KHANNA, R.; KUMAR, M; KHANNA, A.K (2006). Tumor Angiogenesis: Determined By VEGF Expression, MAGS Scoring, Doppler Study, As Prognostic Indicator In Carcinoma Breast. *The Internet Journal of Surgery*, 8(1).

SILVA, M.F.; SIVIERI, K.; ROSSI, E.A (2009). Effects of a probiotic soy product and physical exercise on formation of pre-neoplastic lesions in rat colons in a short-term model of carcinogenic. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 6:1-6.

SIVIERI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A.L.T.; BARBISAN, L.F.; BEDANI, R.; PAULY, N.D.; CARLOS, I.Z.; BENZATTI, F.; VENDRAMINI, R.C.; ROSSI, E.A (2008). Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. *European Food Research and Technology*, 228:231-237.

TESNIERE, A.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; JOZA, N.; PANARETAKIS, T.; KEPP, O.; SCHLEMMER, F.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G (2008). Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Current Opinion in Immunology*, 20:504–511.

THAM, D.M (1998). Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. *JCEM*, 83(7):2223-2235.

THOMSEN, L.L.; MILES, D.W.; HAPPERFIELD, L.; BOBROW, L.G.; KNOWLES, R.G.; MONCADA, S (1995). Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br. J. Can.*, 72:41-44.

TODARO, M.; LOMBARDO, Y.; FRANCIANE, M.G.; ALEA, M.P.; CAMMARERI, P.; IOVINO, F.; STEFANO, A.B.; BERNARDO, C.D.; AGRUSA, A.; CONDORELLI, G.; WALCZAK, H.; STASSI, G (2008). Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death and Differentiation*, 15:762–772.

TSUCHIHASHI, R.; SAKAMOTO, S.; KODERA, M.; NOHARA, T.; KINJO, J (2008). Microbial metabolism of soy isoflavones by human intestinal bacterial strains. *J Nat Med*. DOI 10.1007/s11418-008-0271-y.

ULLRICH, E.; BONMORT, M.; MIGNOT, G.; KROEMER, G.; ZITVOGEL, L (2008). Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death and Differentiation*, 15:21-28.

URTREGER, A.J.; LADEDA, V.E.; PURICELLI, L.; RIVELLI, A.; VIDAL, M.D.C.; SACERDOTE, L.E.; BAL, K.J.E (1997). Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *International Journal of Oncology*, 11:489-496.

VALSSECCHI, A.E.; FRANCHI, S.; PANERAI, A.E.; SACERDOTE, P. ; TROVATO, A.E.; COLLEONI, M (2008). Genistein, a natural phytoestrogen from soy, relieves neuropathic pain following chronic constriction sciatic nerve injury in mice: anti-inflammatory and antioxidant activity. *J. Neurochem.*, 107:230-240.

VENDRAMINI, A.P. 2002. 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. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

WAMBI, J.S.L.; JORDAN, V.C (2009). Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Research*, 11:206. doi:10.1186/bcr2255.

WANG, J.; ZHANG, Q.; JIN, S.; HE, D.; ZHAO, S.; LIU, S (2008). Genistein modulate immune responses in collagen-induced rheumatoid arthritis model. *Maturitas*, 59:405–412.

WEIGERT, A.; BRÜNE, B (2008). Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide*, 19:95-102.

WERSHIL, B.K.; FURUTA, G.T (2008). Gastrointestinal mucosal immunity. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*, 121(2):S380-S383.

WOLOWCZUK, I.; VERWAERDE, C.; VILTART, O.; DELANOYE, A.; DELACRE, M.; POT, B.; GRANGETTE, C (2008). Feeding Our Immune System: Impact on Metabolism. *Clinical and Developmental Immunology*, 2008:ID 639803. doi:10.1155/2008/639803.

WU, A.H.; KOH, W.P.; WANG, R.; LEE, H.P.; YU, M.C (2008). Soy intake and breast cancer risk in Singapore Chinese Health Study. *British Journal of Cancer*, 99:196-200.

XU, J.; GORDON, J.I (2003). Inaugural article: honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18):10452–10459.

YAMAMOTO, S.; SOBUE, T.; KOBAYASHI, M.; SASAKI, S.; TSUGANE, S (2003). Soy, Isoflavones, and Breast Cancer Risk in Japan. *J Natl Cancer Inst*, 95:906-913.

YEB, L.; CHANB, M.Y.; LEUNG, L.K (2009). The soy isoflavone genistein induces estrogen synthesis in an extragonadal pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302:73-80.

YELLAYI, S.; ZAKROCZYMSKI, M.A.; SELVARAJ, V.; VALLI, V.E.; GHANTA, V.; HELFERICH, W.G.; COOKE, P.S (2003). The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. *Journal of Endocrinology*, 176:267-274.

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

YUAN, J.; WANG, J.; LIU, S (2007). Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora – implications for health. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51:765-781.

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