

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado em Ciências da Saúde

**EFEITO ADJUVANTE DOS TOCOFERÓIS NA
QUIMIOTERAPIA COM CICLOFOSFAMIDA INDUZ À
IMUNOMODULAÇÃO PRÓ Th1**

ANDRÉ ALVARES MARQUES VALE

São Luís
2022

ANDRÉ ALVARES MARQUES VALE

**EFEITO ADJUVANTE DOS TOCOFERÓIS NA
QUIMIOTERAPIA COM CICLOFOSFAMIDA INDUZ À
IMUNOMODULAÇÃO PRÓ Th1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para a obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª **Ana PaulaSilva deAzevedo dos Santos**

São Luís

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Vale, André Alvares Marques.

Efeito adjuvante dos tocoferóis na quimioterapia com
ciclofosfamida induz à imunomodulação pró Th1 / André
Alvares Marques Vale. - 2022.
136 f.

Orientador(a): Ana PaulaSilva deAzevedo dos Santos.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2022.

1. Adjuvantes neoplásicos. 2. Imunoedição. 3.
Suplementação vitamínica. 4. Vitamina E. I. dos Santos,
Ana PaulaSilva deAzevedo. II. Título.

ANDRÉ ALVARES MARQUES VALE

**EFEITO ADJUVANTE DOS TOCOFERÓIS NA
QUIMIOTERAPIA COM CICLOFOSFAMIDA INDUZ À
IMUNOMODULAÇÃO PRÓ Th1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão,
como requisito para obtenção do título de doutor em
Ciências da Saúde.

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª. Alessandra Lima Rocha
Universidade UNINASSAU

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira
Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª. Márcia Cristina Gonçalves Maciel
Universidade de Brasília

“May it be a light for you in dark places,
when all other lights go out.”

Galadriel, Senhor dos Anéis
(J. R. R. Tolkien)

Dedico este trabalho as estrelas, aos planetas, as bruxas, aos deuses, aos homens e as mulheres, que apesar de toda a maldade, crueldade e frieza do nosso mundo, ainda tem a coragem de possuir um coração e serem gentis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos deuses, em especial Cernunnos, o senhor das florestas e a Hécate, a senhora das encruzilhadas, por terem continuado ao meu lado nas noites mais desalentadas da minha vida. Homenageio aqui também a lua, o sol dos perdidos, loucos e apaixonados. E também o sol dos cientistas, que são as três coisas juntas.

Agradeço profundamente meus antepassados, em especial minha mãe e minha avó. Minhas estrelas, que acreditaram em mim quando ninguém mais era capaz de fazê-lo. Stella, minha querida e amada mãe, que me deixou tão cedo, se cheguei até aqui, foi em grande parte pela sua força, pela sua fé e acima de tudo pelo seu amor. Minha promessa para com a senhora continua, até que possamos nos encontrar novamente, em uma nova forma e um outro tempo.

A meu pai, meu silencioso e gentil guerreiro, que nunca fugiu de nem uma batalha e nunca negou aos filhos o amor e o carinho que mora em seu coração.

As minhas irmãs, Taís e Yasmin, que de longe ou de perto mantiveram o carinho e amor de nossa família vivo ao longo do tempo. Minha querida e estimada Yasmin, minha pequena chama de esperança e alegria, pequeno sol de nossa família agora incompleta, mas jamais partida, obrigado por ser quem você é, fantástica, energética e alegre. Perfeita por si só, completa, mesmo sozinha.

A meu companheiro Gabriel, que testemunhou minha raiva, ódio, desespero, e sofrimento sem nunca vacilar. Que enfrentou junto a mim, a sua própria maneira, as doenças do meu corpo e da minha mente. Meu amado e perspicaz Gabriel, você nunca foi meu príncipe encantando, em uma armadura brilhante, montado em um corcel negro. Você nunca foi o que eu quis. Você foi o que eu precisava, você é real.

A meus três pequenos guardiões, seres de luz infinita, que de dia me trazem paz e de noite os dons da magia. A Link, o Sol. A Ravena, a Lua e a Hades, o entardecer.

A minha estimada orientadora Ana Paula, minha pequena grande guerreira e companheira nessa jornada científica por vezes cruel. Se agradeço a luz da minha mãe lá

em cima, agradeço a sua luz aqui na terra. Obrigado professora, por todos os momentos em que a senhora foi muito mais do que minha orientadora. Por ter me levantado quando eu caí, por ter me consolado quando eu chorei, por ter compartilhado sua esperança e fé quando eu não tinha mais nenhuma. Que sua luz e leveza nunca se apaguem, que a bondade e gentileza no seu coração nunca vacilem e que sua compaixão para com os outros nunca esfrie, mesmo no frio mundo da ciência e da burocracia.

Aos meus mentores e amigos do mundo científico. A minha primeira orientadora, Mayara Cristina, a mãe gentil. A primeira a me dar uma chance no mundo da ciência, Flavia Raquel, a professora cientista. A meu modelo de força e coragem, Thiare, a guerreira. A Lucilene, a perseverante. A Paulo Vitor, o conhecedor profundo de muitas coisas. A Marcia Marciel, a mãe da microbiologia. A Eder, a gentil presença de Deus. A Rosane Guerra, corajosa papisa da imunologia. A Lilliam, a guerreira sorridente. A Liana, a doce perfeccionista. A Douglas, o belo e inteligente. A Mirtes, a que dança com serpentes. A Elis, a energética. A Ana Butarele, a gentil guerreira das adversidades. A Ana Serpa, a poliglota carinhosa. A Raquel, a força capaz de mudar o mundo. A Eduardo, o biólogo filósofo. A Danrley, o cientista por vezes incomunicável. A Hiran, o pai da hematologia. A Leticia, a tocada por Deus. A Hellen, a que abre as portas. A Carreno, o professor das terras distantes. A Silma, a razão que não se silencia. A Vera, amiga de outras vidas. A minha querida Sulayne, a deusa africana da força, inteligência e alegria.

Aos meus amigos, em especial Leila, o coração do mundo. A Fernanda, a indomável. A Lucas, o que anda com borboletas. A Marco, o espírito antigo. A Diego, a força em si. A Luciana, a gentil amiga dos animais e das plantas.

Aos que mantem a integridade física e humana do meu local de trabalho e estudo em especial Ao Sr. Josuel, o guardião alegre. Ao sr. Hilton, o guardião silencioso. A sra. Dica, a alegria de Deus. A sra. Dinalva, a gentileza silenciosa. A Dona Sonia, a alma da festa.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, por ter permitido minha jornada acadêmica e meu crescimento como cientista e, acima de tudo, como ser humano.

A todos os seres que direta e indiretamente estiverem comigo nessa jornada, dos camundongos aos humanos, das maquinas aos espíritos, dos mortos aos vivos e dos amigos aos não tão amigos. Ao mundo, as circunstâncias, as vitórias e as derrotas. A ciência e a fé, a razão e a loucura. Pois apesar de tudo, eu continuo tendo um coração e sendo gentil. E onde há gentileza, há bondade e onde há bondade há a magia. Obrigada a todos e a tudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compilação das características inerentes as células cancerígenas..	20
Figura 2. Descrição conceitual do processo de carcinogênese levando-se em conta o processo tripartido de iniciação, promoção e progressão..	22
Figura 3. Mecanismos de eliminação das células tumorais pelo sistema imune do hospedeiro conforme previsto pela teoria da imunovigilância.....	25
Figura 4. Mecanismos de escape empregados por células tumorais.....	26
Figura 5. Descrição do microambiente tumoral do tumor de Erlich.....	28
Figura 6. Possíveis tratamentos para a eliminação e ou controle de tumores malignos.	30
Figura 7. Mecanismos de ação da ciclofosfamida sobre o câncer e seus efeitos colaterais locais e sistêmicos.....	31
Figura 8. Efeito da ciclofosfamida sobre diferentes grupos de células imunes, com foco na diferenciação das respostas Th2 para Th1..	32
Figura 9. Divisão dos vitâmeros da vitamina E..	34
Figura 10. Mecanismos de ação da vitamina E sobre processos imunológicos.....	35
Figura 11. Mecanismo de ação da vitamina E sobre a imunidade inata regulando a produção de IL-2 que culmina na expansão clonal de linfócitos	37
Figura 12. Mecanismos de ação geral dos tocoferóis.....	40
Figura 13. Ilustração do desenho experimental.	47
Figura 14. A suplementação com o mix de tocoferóis de forma terapêutica é capaz de melhorar os parâmetros nutricionais em camundongos com tumor solido de Erlich.....	51
Figura 15. A suplementação com o mix de tocoferóis de forma continuada acelera o desenvolvimento do tumor solido de Erlich..	53
Figura 16. A suplementação com o mix de tocoferóis no grupo CS aumenta a quantidade de células presentes nos órgãos linfoides assim como a produção de oxido nítrico produzido pelos esplenócitos.....	56
Figura 17. A suplementação com o mix de tocoferóis não altera de forma significativa o padrão de ativação das células do baço de camundongos com tumor solido de Erlich..	58
Figura 18. Ilustração do desenho experimental.....	74
Figura 19. Índice de viabilidade e capacidade de clonicidade independente de ancoragem das células Hs578T tratadas com mix de tocoferóis.....	78

Figura 20. Capacidade de invasão das células da linhagem Hs578T através da matriz extracelular feita com Matrigel após 24 horas.	80
Figura 21. Caracterização do citoesqueleto através do conteúdo de actina e tubulina de células Hs578T tratadas com diferentes concentrações de vitamina E.....	81
Figura 22. Utilização do mix de tocoferóis junto ao tratamento quimioterápico com ciclofosfamida e capaz de reverter parcialmente a caquexia em camundongos com tumor solido de Erlich..	82
Figura 23. O mix de tocoferóis não altera a ação da ciclofosfamida no desenvolvimento tumoral..	84
Figura 24. O efeito adjuvante do mix de tocoferóis no tratamento com ciclofosfamida é capaz de ativar células da imunidade inata e adaptativa no baço de camundongos com tumor de Erlich.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modificações causadas pela suplementação com o mix de tocoferóis no padrão hematológico de camundongos com tumor sólido de Erlich.	52
Tabela 2. Padrão de citocinas produzidas pelo microambiente tumoral	54
Tabela 3. Dados de parâmetros de deslocamento individuais de células Hs578T.....	79
Tabela 4. Alterações hematológicas causadas pelo tratamento com a ciclofosfamida não são alteradas pelo uso do mix de tocoferóis.	83
Tabela 5. Citocinas e quimosinas provenientes do microambiente tumoral dos diferentes grupos experimentais.....	86
Tabela 6. Citocinas e quimiocinas provenientes do soro dos diferentes grupos experimentais.	86

RESUMO

O uso de vitaminas na prevenção e no tratamento do câncer sempre trouxe dúvidas quanto sua eficácia e, neste contexto polêmico, os tocoferóis ou vitâmeros de vitamina E também estão inseridos. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos de um mix de tocoferóis no desenvolvimento tumoral em modelos *in vitro* e *in vivo*, focando nos processos de imunomodulação e ativação celular, originando dois artigos. No primeiro artigo se avaliou a capacidade da suplementação com tocoferóis em promover um desfecho positivo no contexto oncológico. Para isso foi aplicado o modelo de tumor sólido de Ehrlich (ET) em camundongos Swiss e separados nos grupos experimentais (n=7/grupo): Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC), tratado com 25 mg/kg intraperitoneal; Grupo suplementação pré e pós-tumor (CS), tratado com 100mg/Kg/dia tocoferóis via oral (v.o.) por 14 dias antes e 16 dias após o inóculo do tumor; Grupo suplementação pós-tumor (TS), tratado com 100mg/Kg/dia, v.o. de tocoferóis após 2 dias do inóculo do tumor, durante 15 dias. Ao longo do experimento foram coletados os dados nutricionais e o valor do volume da pata com tumor. Após a eutanásia, foram coletadas amostras para análise dos parâmetros hematológicos, produção de óxido nítrico (NO) e fenotipagem dos esplenócitos, além da produção de citocinas pelo microambiente tumoral em cultura *ex vivo*. Os dados mostraram que, independentemente do tempo de suplementação, os tocoferóis foram capazes de aumentar o número de leucócitos e eritrócitos no sangue, entretanto sem alteração no fenótipo de ativação de leucócitos. Os animais suplementados antes e após o inóculo do ET apresentaram aumento do tumor com produção de citocinas inflamatórias (IL-12, IFN- γ e MCP-1) e menor concentração de IL-10, que parece justificar a maior produção de NO. Assim, este estudo ratifica a inércia da suplementação por tocoferóis na prevenção e/ou tratamento do câncer, entretanto sua ação imunomoduladora abre uma perspectiva interessante não só no contexto do câncer, bem como com outras doenças inflamatórias. O segundo artigo estuda a ação da suplementação de tocoferóis como adjuvante na quimioterapia neoplásica. Para isso foram feitas análises *in vitro* avaliando possíveis efeitos diretos dos tocoferóis sobre as células tumorais e o ensaio *in vivo* com modelo de tumor sólido de Ehrlich sob tratamento com ciclofosfamida. Os resultados obtidos com a linhagem tumoral descartaram um efeito citotóxico direto dos tocoferóis, excluindo uma ação quimioterápica. No ensaio *in vivo* foi possível observar que a suplementação reduz a caquexia, leucopenia e anemia nos animais com ET em tratamento com ciclofosfamida, sem modificar a ação antineoplásica do mesmo. Além disso, a suplementação demonstrou maior ativação de linfócitos citotóxicos (CD3; CD8; CD69), macrófagos (CD14; CD69) e células natural killer (NK 1.1; CD86) no baço. Esse padrão celular corrobora com o padrão Th1 de citocinas (IL-12 e IFN- γ) regulada pela IL-10. No plasma, a menor produção de IL-6 pode reforçar o padrão Th1 e mitigar a caquexia associada ao câncer/quimioterapia. Os dados sugerem que a imunomodulação mediada pelos tocoferóis promove um padrão Th1 associado a ação de reiniciação da resposta imunológica causada pela ciclofosfamida. Considerando que a resposta Th1 é favorável a eliminação de células tumorais, especula-se que a suplementação com tocoferóis induza uma imunocompetência antitumoral e minimize os efeitos danosos da quimioterapia sendo uma opção de adjuvante na oncologia.

Palavras-chave: Vitamina E; Imunoedição; Suplementação vitamínica; adjuvantes neoplásicos.

ABSTRACT

The use of vitamins in the prevention and treatment of cancer has always raised doubts about their effectiveness and, in this controversial context, tocopherols or vitamin E vitamers are also included. The main objective of this work was to evaluate the effects of a mix of tocopherols on tumor development in *in vitro* and *in vivo* models, focusing on the processes of immunomodulation and cellular activation, resulting in two articles. In the first article, the ability of tocopherol supplementation to promote a positive outcome in the oncological context was evaluated. For this, the Ehrlich solid tumor model (ET) was applied to Swiss mice and separated into experimental groups (n=7): Control group (NC), Cyclophosphamide group (PC), treated with 25 mg/kg intraperitoneally; Pre- and post-tumor supplementation group (CS), treated with 100mg/kg/day tocopherols orally (v.o.) for 14 days before and 16 days after tumor inoculum; Post-tumor supplementation group (TS), treated with 100mg/kg/day, v.o. of tocopherols after 2 days of tumor inoculum, for 15 days. Throughout the experiment, nutritional data and the volume of the paw with the tumor were collected. After euthanasia, samples were collected for analysis of hematological parameters, production of nitric oxide (NO) and splenocyte phenotyping, in addition to the production of cytokines by the tumor microenvironment in *ex vivo* culture. The data showed that, regardless of the time of supplementation, tocopherols were able to increase the number of leukocytes and erythrocytes in the blood, however without changing the leukocyte activation phenotype. The animals supplemented before and after the ET inoculum showed an increase in the tumor with production of inflammatory cytokines (IL-12, IFN- γ and MCP-1) and lower concentration of IL-10, which seems to justify the higher production of NO. Thus, this study confirms the inertia of tocopherol supplementation in the prevention and/or treatment of cancer, however its immunomodulatory action opens an interesting perspective not only in the context of cancer, as well as with other inflammatory diseases. The second article studies the action of tocopherol supplementation as an adjuvant in neoplastic chemotherapy. For this, *in vitro* analyzes were carried out evaluating possible direct effects of tocopherols on tumor cells and the *in vivo* assay with Ehrlich's solid tumor model under treatment with cyclophosphamide. The results obtained with the tumor lineage ruled out a direct cytotoxic effect of tocopherols, excluding a chemotherapeutic action. In the *in vivo* assay, it was possible to observe that supplementation reduces cachexia, leukopenia and anemia in animals with ET undergoing cyclophosphamide treatment, without modifying its antineoplastic action. Furthermore, supplementation showed greater activation of cytotoxic lymphocytes (CD3; CD8; CD69), macrophages (CD14; CD69) and natural killer cells (NK 1.1; CD86) in the spleen. This cellular pattern corroborates the Th1 pattern of cytokines (IL-12 and IFN- γ) regulated by IL-10. In plasma, lower IL-6 production may reinforce the Th1 pattern and mitigate cancer/chemotherapy-associated cachexia. The data suggest that tocopherol-mediated immunomodulation promotes a Th1 pattern associated with the action of resetting the immune response caused by cyclophosphamide. Considering that the Th1 response is favorable to the elimination of tumor cells, it is speculated that supplementation with tocopherols induces an antitumor immunocompetence and minimizes the harmful effects of chemotherapy.

Keywords: Vitamin E; Quality of life; Immunoediting; Metabolism

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-LOX	Araquidonato 5-lipoxigenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
APCs	Células apresentadoras de antígeno
Bax	Proteína X associada a BCL-2
Bcl-2	Linfoma de células B 2
Bcl-xl	Linfoma de células B-extra grande
BSA	Albumina bovina
CBA	Ensaio citometrico de esferas ordenadas
CD25	Cadeia alfa do receptor de interleucina-2 ou Cluster de diferenciação 25
CD28	Glicoproteína de superfície específica para células T ou Cluster de diferenciação 28
CD3	Co-receptor de células T ou Cluster de diferenciação 3
CD4	Co-receptor de células T auxiliares ou Cluster de diferenciação 4
CD8	Co-receptor de células T citotóxicas ou Cluster de diferenciação 8
CD86	Antígeno de ativação de linfócitos T ou Cluster de diferenciação 86
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CS	Grupo suplementação pré e pós-tumor
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAS-L	Antígeno de apoptose 1 ou Cluster de diferenciação 95
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxp3	Forkhead box P3 ou Escurfina
GTP	Guanina trifosfato
HCl	Ácido clorídrico
HPV	Papilomavírus Humano
Hs578T	Carcinoma basal de mama triplo negativo

i.p	Inoculação intraperitoneal
IFN- γ	Interferon Gamma
IL-1	Interleucina-1
IL-17	Interleucina-17
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
LPS	Lipopolissacarídeo ou endotoxina bacteriana
MAPs	Proteínas associadas aos microtúbulos
MCH I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe 1
MCH II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe 2
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MCT	Óleo de triglicérides de cadeia média
MDSCs	Células supressoras derivadas da linhagem mielóide
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
NC	Grupo não tratado
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NK	Células assassinas naturais
NKG2D	Grupo Assassino Natural 2D
NO	Óxido nítrico
ONOO	Peroxinitrito
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Grupo tratado com ciclofosfamida
PE	Ficoeritrina
CD14	Antígeno de diferenciação de monócitos ou Cluster de diferenciação 14
PGE2	Prostaglandina E2
Rac1	Família Rac das GTPase pequenas do tipo 1
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute
S1P	Esfingosina 1-fosfato
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

sFasL	Antígeno de apoptose 1 solúvel
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT 3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
STAT 6	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6
TAN	Neutrófilo associado ao tumor
TCR	Receptor de célula T
TGF	Fator de crescimento transformante
TGFb	Fator de crescimento transformante beta
Th0	Células T auxiliares em repouso ou não ativadas
Th1	Células T auxiliares da resposta 1 ou reposta predominantemente celular
Th17	Células T auxiliares da resposta 17
Th2	Células T auxiliares da resposta 2 ou reposta predominantemente
humoral	
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
Treg	Células T auxiliares da resposta reguladora
TS	Grupo suplementação pós tumor
TSC	Grupo suplementação pós tumor associado a ciclofosfamida
v.o	Administração via oral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WAVE 2	Proteína homóloga da verprolina da família WASP 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. Apresentação da estrutura da tese.....	18
2. Capítulo Um: Referencial teórico	19
2.1 Origem e epidemiologia do câncer	19
2.2 Fatores de risco e carcinogênese.....	21
2.3 Câncer e o sistema imune	23
2.5 Estratégias atuais para o combate ao câncer	28
2.7 Vitamina E: Efeitos sobre o câncer.....	33
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos específicos	41
3.2.1 Objetivos específicos do capítulo 2.....	41
4. Capítulo dois	42
5. Capítulo três	64
Referencias	98
Apêndice.....	122
Anexos	131

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um padrão biológico determinado por uma variedade de processos complexos e interativos. Apesar dessa grande diversidade, as diferentes patologias que resultam no seu desencadeamento estão relacionadas ao descontrole do ciclo celular (WHO, 2021). Essa heterogeneidade é responsável pela grande incidência e mortalidade relacionada a esse processo biológico, cujos números chegaram a 19 milhões e 10 milhões, respectivamente, em 2020 (IARC, 2021).

Para lidar com um processo tão dinâmico e variável, os tratamentos para o câncer também precisam ser igualmente diversos. Apesar do grande avanço na área oncológica, a maioria dos agentes antineoplásicos ainda apresentam efeitos adversos importantes, como, por exemplo, anorexia e leucopenia (DICKENS; AHMED, 2018).

Um dos maiores exemplos de quimioterápico já produzidos é a ciclofosfamida, um agente nitrogênico do grupo das oxazoforinas (POVIRK; SHUKER, 1994). Trata-se de uma pró-droga com propriedades alquilantes capaz de impedir a divisão das células tumorais (CHEN et al., 2004). Apesar do seu largo uso, preço acessível e relativa seletividade, o uso da ciclofosfamida causa efeitos adversos severos, em especial sobre o sistema imune (DROZ et al., 2013). Estudos têm demonstrado uma interessante capacidade imunomoduladora da ciclofosfamida devido a sua ação sobre células e processos relacionados ao escape tumoral (AHLMANN; HEMPEL, 2016; FEERICK et al., 2021).

Para que ocorra uma modulação efetiva frente ao câncer, uma resposta celular resolutive deve ocorrer. Nesse contexto, a resposta ótima está relacionada com um subtipo específico de linfócitos helps, denominada resposta Th1, capaz de destruir as células cancerígenas restabelecendo a homeostase (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). A estratégia mais robusta proposta nos últimos anos vem justamente da utilização do conhecimento dos processos de imunoedição e imunomodulação propiciados pelo tratamento oncológico para favorecer não só a eliminação do tumor, como também a manutenção de uma resposta favorável frente a ele (DESAI; COXON; DUNN, 2021a).

Um possível agente imunomodulador no contexto oncológico é a vitamina E, que possui propriedades biológicas importantes, sendo encontrada em vários tipos de vegetais, em especial em seus óleos (A. SHETTY, 2013). Esta substância subdivide-se em 02 grupos, os tocoferóis (cadeia lateral saturada) e os tocotrienóis (cadeia lateral insaturada), cada um desses possuindo 04 vitâmeros identificadas pelos prefixos alfa, beta, gama e delta. Esta diferença deve-se a quantidade e localidade de grupos metil que

se encontram no anel aromático do tocol (COLOMBO, 2010). A forma mais comum é o α -tocoferol seguida do γ -tocoferol, sendo a primeira a mais economicamente importante e biodisponível (REBOUL et al., 2006).

A ação imunomoduladora dos tocoferóis se dá de várias formas, entre elas a capacidade de inibir a ação enzimática da ciclo-oxigenase-2 (Cox-2), que por sua vez, impede a produção da prostaglandina E2, através da interrupção da oxidação do ácido araquidônico. Outro mecanismo importante é a supressão do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) 6 e 3 (JIANG, 2014).

A inativação desses fatores e enzimas leva a menor produção de citocinas pró inflamatórias, como IL-6, TNF- α e IL-1 pelas células imunológicas. Essa diminuição está relacionada à proteção contra doenças crônicas e, até mesmo, a desregularização imunológica causada pelo processo carcinogênico (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Além disso, a suplementação com tocoferóis leva ao aumento da produção de IL-2, e por tanto, a uma maior produção de linfócitos T e B frente a estímulos imunológicos, como por exemplo vacinas, entre elas hepatite B e tétano (MORIGUCHI, 1997; WU; MEYDANI, 2014).

Estas propriedades imunoestimulantes são, por vezes, relacionadas a capacidade da vitamina E (em especial ao vitâmero alfa tocoferol) de melhorar a sinapse imunológica entre linfócitos T naive e células apresentadoras de antígenos. Essa interação feita de forma mais robusta está associada à melhora ativação e proliferação de linfócitos frente a estímulos diversos tanto *in vitro* quanto *in vivo* em camundongos idosos (MARKO et al., 2007).

A suplementação com vitamina E também foi relacionada com maior resistência a infecções virais em humanos, sendo isso desencadeado pelo o aumento da atividade citotóxica de linfócitos T e células NK, além da atividade fagocítica de macrófagos alveolares, correspondendo assim, a uma resposta Th1 (HAN et al., 2000; LAI et al., 2021).

Dessa forma, o presente trabalho pretende estudar a ação direta de um mix de tocoferóis na linhagem celular Hs578T e sua capacidade de imunomodular o tratamento com ciclofosfamida, como forma de amplificar a resposta frente a neoplasias malignas ao mesmo tempo que atenua possíveis efeitos deletérios da quimioterapia.

2. Apresentação da estrutura da tese

No primeiro capítulo, intitulado referencial teórico, são dispostos os conhecimentos científicos necessários para que se possa entender os capítulos seguintes.

No segundo capítulo, nomeado “Suplementação com uma mistura heterogênea de tocoferóis não altera o destino do desenvolvimento tumoral em camundongos portadores do tumor sólido de Erlich” é demonstrado como a suplementação com um mix de tocoferóis de forma isolada interfere no desenvolvimento tumoral. O principal objetivo neste trabalho é esclarecer se a suplementação com tocoferóis e sua posologia, tem de fato algum tipo de desfecho positivo no contexto oncológico e quais as possíveis explicações para este fenômeno.

O terceiro capítulo é denominado “Efeito adjuvante da mistura de tocoferóis na quimioterapia da ciclofosfamida induz à imunomodulação Th1”. Nesse trabalho buscamos explorar inicialmente o efeito direto do mix de tocoferóis sobre células tumorais extremamente agressivas. Os experimentos feitos nesta sessão, em particular, foram realizados no Institute for Research in Immunology and Cancer – IRIC, localizado na Universidade de Montreal, no Canadá. Sendo sua realização possível devido ao programa de doutorado-sanduíche no exterior (PDSE). Além disso exploramos como a combinação da suplementação com um mix de tocoferóis juntamente com o tratamento com ciclofosfamida pode modular de forma favorável a resposta imune frente ao tumor e quais os mecanismos envolvidos nesse fenômeno.

Na quarta seção deste trabalho são apresentadas as referências coletivas de todas as informações usadas na tese. Na seção apêndice estão os trabalhos publicados pelo autor ao longo do doutorado e em anexos estão listados documentos adicionais relacionados aos trabalhos apresentados.

2. Capítulo Um: Referencial teórico

2.1 Origem e epidemiologia do câncer

Câncer é um padrão biológico determinado por uma variedade de processos complexos e interativos. Apesar dessa grande diversidade, as diferentes patologias que resultam no seu desencadeamento estão relacionadas ao descontrole do ciclo celular (WHO., 2021). Essa heterogeneidade é responsável pela grande incidência e mortalidade relacionada a esse processo biológico, cujas estimativas chegaram a 19 milhões e 10 milhões, respectivamente, em 2020 (IARC, 2021).

Ainda em 2020, 2,3 milhões mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama, e 685 mil foram a óbito devido a complicações da doença. A prevalência alcançada nos últimos 5 anos de 7,8 milhões torna esse tumor o mais prevalente na população humana (WHO, 2021) .

Estudos preveem que no ano de 2035 a ocorrência de tumores malignos aumentará em até 70% (MOHEBBI et al., 2017), sendo os tipos de câncer com maior incidência no mundo os de pele, pulmão, mama, colorretal, próstata, estômago e fígado. Esta alta incidência e mortalidade associada ao câncer está diretamente correlacionada a altos custos públicos investidos no seu estudo, tratamento e prevenção.

Apesar de não se saber ao certo a carga econômica mundial relacionada as neoplasias malignas, dados de diferentes países nos permitem ter uma dimensão da importância dessa doença no contexto global. Apenas nos Estados Unidos da América (EUA), em 2017, foi estimado um gasto de aproximadamente 342,2 bilhões de dólares, divididos entre serviços de atenção básica, perda de produtividade e mortalidade prematura causada pelo câncer (ACS, 2021b). No Brasil, o Ministério da Saúde, em 2020, gastou cerca de R\$ 425 milhões na área de atenção oncológica (SILVA, 2021), sendo que a perda monetária pela morte prematura causada pelo câncer é estimada em aproximadamente R\$ 294 mil por indivíduo (ACS, 2021b).

Entre as características biológicas que determinam o câncer pode-se destacar: a incapacidade das células tumorais em responder aos sinais de diferenciação, autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de não proliferação, capacidade de evasão da apoptose, ampliação do potencial de divisão, capacidade de induzir e sustentar o processo de angiogênese e de se proliferar além de seus limites usuais, causando assim a metástase (HANAHA; WEINBERG, 2011).

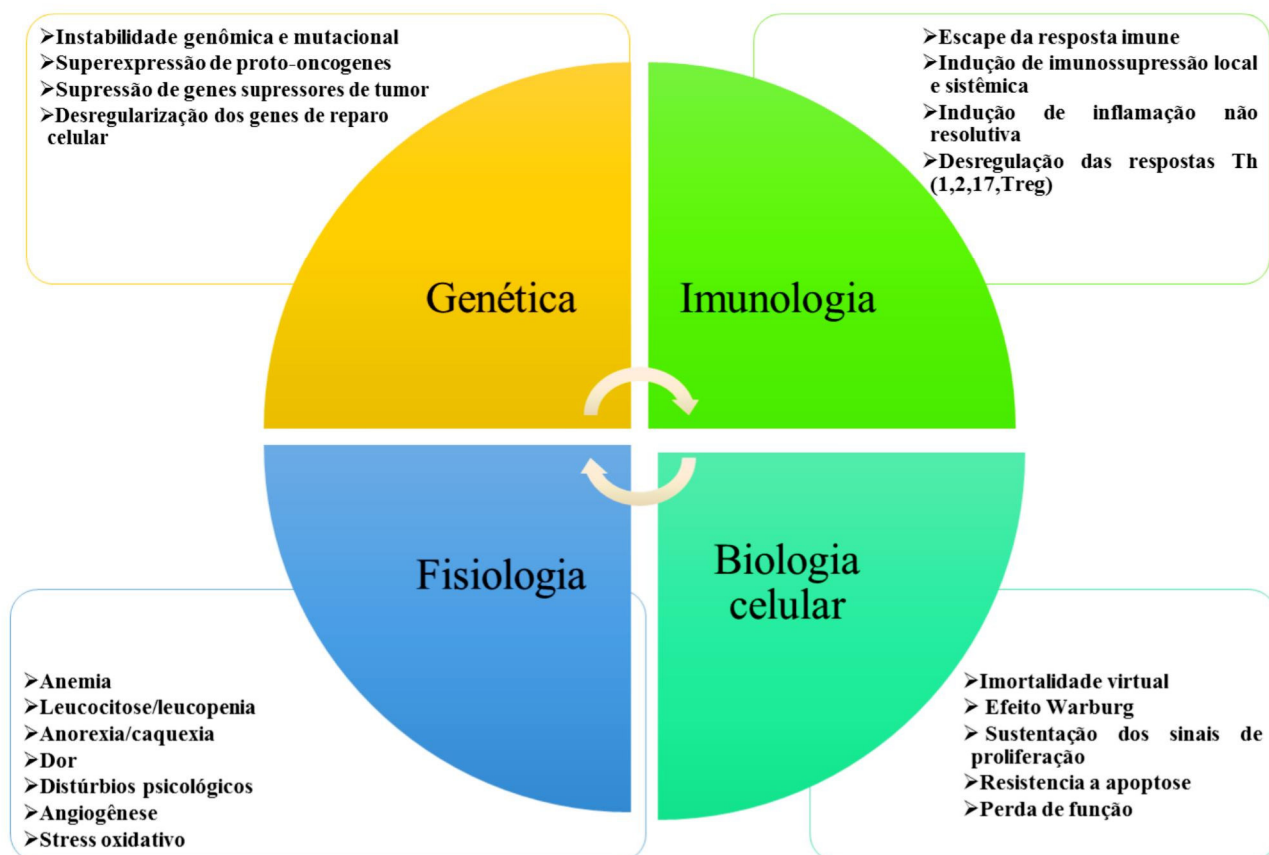


Figura 1. Compilação das características inerentes as células cancerígenas. Diagrama proposto inicialmente por Hanahan e Weinberg em 2000 e posteriormente expandido pelos mesmos autores em 2011. Em 2017 Kaber e colaboradores atualizam o diagrama exemplificando as consequências das características originalmente propostas pelos autores originais. Figura do autor.

Muitos estudos tem demonstrado a capacidade das células tumorais de se adaptarem a diferentes tipos de fontes energéticas. Isso pode gerar interações metabólicas únicas, que por extensão, geram microambientes tumorais extremamente diversos (PAVLOVA; THOMPSON, 2016). Essa diversidade molda a forma como as células imunológicas do hospedeiro reagem as células tumorais. Muitas vezes, o sistema imune acaba por ser sobrepujado pelas novas redes de interação em desenvolvimento durante o processo de carcinogênese, podendo até mesmo ter sua função original redirecionada para o crescimento do tumor (MITTAL et al., 2014).

2.2 Fatores de risco e carcinogênese

Entre os fatores de risco mais associados ao desencadeamento do processo de carcinogênese estão o tabagismo, alcoolismo, dieta não saudável e a falta de exercícios físicos (OTT et al., 2011). Em países em desenvolvimento, porém, as doenças infecciosas crônicas também possuem importância de destaque para esse quadro.

Em 2012, até 25% de todos os cânceres diagnosticados em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, foram atribuídos a infecções com potencial carcinogênico. O vírus do papiloma humano (HPV), vírus da hepatite B e C assim como o vírus Epstein-Barr são alguns dos patógenos detectados (PLUMMER et al., 2016).

Muitas destas doenças e hábitos configurados como fatores de risco acabam por favorecer ou, em alguns casos, acelerar a carcinogênese. A carcinogênese pode ser entendida como o processo pelo qual uma célula normal adquire características que podem torná-la um potencial iniciador de um tumor (MERLO et al., 2006). A aquisição dessas características, porém, não ocorrem de forma imediata, mas sim, através de um processo relativamente gradual (OHNISHI et al., 2013). Três fases deste percurso são usualmente descritas: a iniciação, a promoção e a progressão (BARCELLOS-HOFF; LYDEN; WANG, 2013).

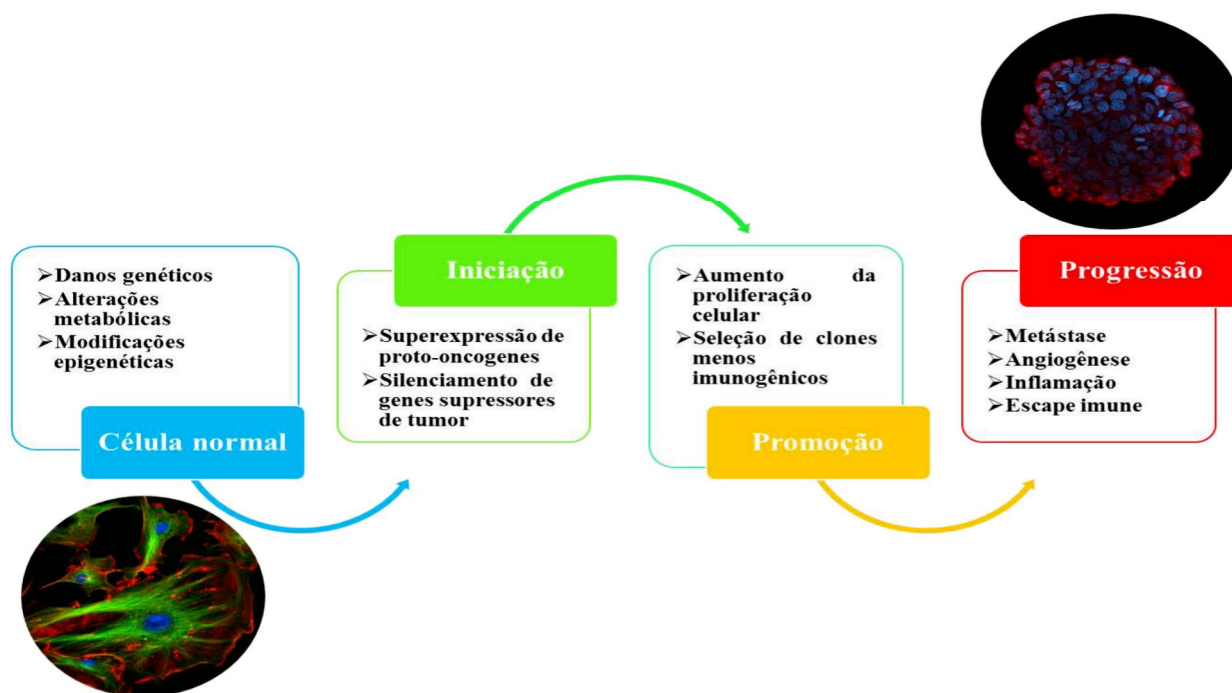


Figura 2. Descrição conceitual do processo de carcinogênese levando-se em conta o processo tripartido de iniciação, promoção e progressão. Figura inspirada no trabalho de Chahar et al., 2020. (KABIRAI et al., 2020). Figura do próprio autor.

Inicialmente, ocorrem danos irreversíveis ao material genético da célula, sendo este causado ou influenciado por vários tipos de eventos endógenos e exógenos como, por exemplo, exposição a mutagênicos de natureza diversa (WOGAN et al., 2004). Na fase de iniciação propriamente dita, o metabolismo celular passa a ser alterado, promovendo o acúmulo de mutações. Nesse contexto a superexpressão de proto-oncogenes, que estão diretamente relacionados ao desencadeamento do ciclo celular, tornando-os oncogenes. Isso propicia a célula a capacidade de se dividir de forma rápida e/ou constante (REDDEL, 2000).

Já o silenciamento de genes supressores de tumor, responsáveis pela parada do ciclo celular e incitar a expressão de genes pró-apoptóticos, torna a célula virtualmente imortal (VOGELSTEIN et al., 2013). Na fase de promoção, ocorre a expansão clonal das células mutadas de forma mais intensa, formando uma massa sólida ou líquida, parcialmente contida no órgão de origem. Na progressão, a transformação neoplásica se completa e o tecido tumoral pode adquirir a capacidade de invadir outros tecidos, promovendo o evento de metástase, característico do câncer (BAKER et al., 2017; NGUYEN; MASSAGUÉ, 2007).

Devido ao processo de progressão tumoral, regido pelas leis da seleção natural, as células tumorais acabam por produzir clones com capacidades crescentes de migração e invasão (RIDLEY et al., 2016).

Várias mutações estão relacionadas a alterações no citoesqueleto celular, uma estrutura complexa e dinâmica, cujos componentes principais são os microfilamentos de actina, os filamentos intermediários e os microtúbulos (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014). Os microfilamentos são formados por polímeros lineares da proteína G-actina, responsáveis pela geração de força mecânica (DELON; BROWN, 2007).

Os microtúbulos por sua vez, são formados por dímeros de alfa e beta tubulina. Essas estruturas têm um comportamento muito dinâmico, ligando-se a GTP para a sua polimerização sendo os responsáveis pela estruturas pelos cílios e flagelos (AKHMANOVA; STEINMETZ, 2015). Além disso, os microtúbulos estão diretamente envolvidos na manutenção da morfologia e mobilidade celular (KUEH; MITCHISON, 2009). Os filamentos intermediários, ao contrário dos outros componentes, é uma estrutura menos dinâmica e com composição mais variada, sendo eles específico de células e tecidos (CHUNG; ROTTY; COULOMBE, 2013).

Várias das proteínas que regulam a dinâmica do citoesqueleto celular estão expressas em grande quantidade em várias linhagens tumorais (SAHAI, 2005), especialmente naquelas que possuem um potencial invasivo acentuado (WANG et al., 2004). Isso torna esses componentes alvos para novas terapias oncológicas (STROUHALOVA et al., 2020).

A invasão de tecidos adjacentes, migração de células imunológicas e a liberação de substâncias biologicamente ativas ocasionam a formação de dano local e processos inflamatórios muitas vezes não resolutivos e prejudiciais à homeostase (TARVER, 2012). Esses eventos acabam por se relacionar aos sintomas característicos do desenvolvimento tumoral.

2.3 Câncer e o sistema imune

Um importante fator a ser considerado durante a carcinogênese é o sistema imune, um importante regulador da homeostase dos sistemas biológicos (SENOVILLA et al., 2013). Devido ao seu papel regulador, o sistema imunológico pode interferir em todas as

fases do desenvolvimento das células tumorais, da sua eliminação e até mesmo de sua progressão (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

A ativação de células da imunidade inata, como as células assassinas naturais (NK), por exemplo, é capaz de eliminar células com os primeiros sinais de mutação. Caso essas células mutadas não sejam eliminadas o acúmulo de danos genéticos podem levar a formação de células tumorais mais agressivas (KOCH et al., 2013). Mesmo em estados mais avançados do desenvolvimento oncológico, o sistema imune é capaz de montar defesas efetivas contra as células e o tecido tumoral em formação (PAPAIIOANNOU et al., 2016).

Em uma resposta imunológica antitumoral, células apresentadoras de antígenos (APCs) ativadas pela presença das células tumorais, primam linfócitos auxiliares (CD3) e linfócitos citotóxicos (CD8). Essas subpopulações de linfócitos ativados podem desencadear uma resposta citotóxica contra as células cancerígenas através da liberação de substâncias solúveis como perforinas e granzimas além de citocinas pró-apoptóticas (HINRICHS; ROSENBERG, 2014).

A ação efetiva frente ao tumor está relacionada a uma resposta imune celular denominada resposta ou padrão Th1 (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; KIDD, 2003). A produção de IL-12 e de INF- γ por APCs permitem a diferenciação celular de Th0 (células T *naïve*) que, por sua vez, começam a produzir citocinas do perfil Th1. A resposta imune mediada pela imunidade celular é particularmente favorável a eliminação de parasitas intracelulares e células tumorais. Isso ocorre principalmente pela ativação de macrófagos, células T CD8⁺ e células natural killer (CRAFT; EZRA; OCHOA, 2010; NISHIMURA et al., 2000).

Em contra partida, a produção de IL-2 e, particularmente, de IL-4 levariam a diferenciação da população Th0 em células Th2. Esse subtipo celular produz citocinas que ativam de forma mais robusta a imunidade mediada por anticorpos, sendo favorável a eliminação de patógenos extracelulares (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; MOWEN; GLIMCHER, 2004). Apesar de extremamente útil de um ponto de vista didático, o paradigma Th1/Th2 se mostra um pouco mais complexo do que se imaginava originalmente (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; MURAILLE; LEO; MOSER, 2014).

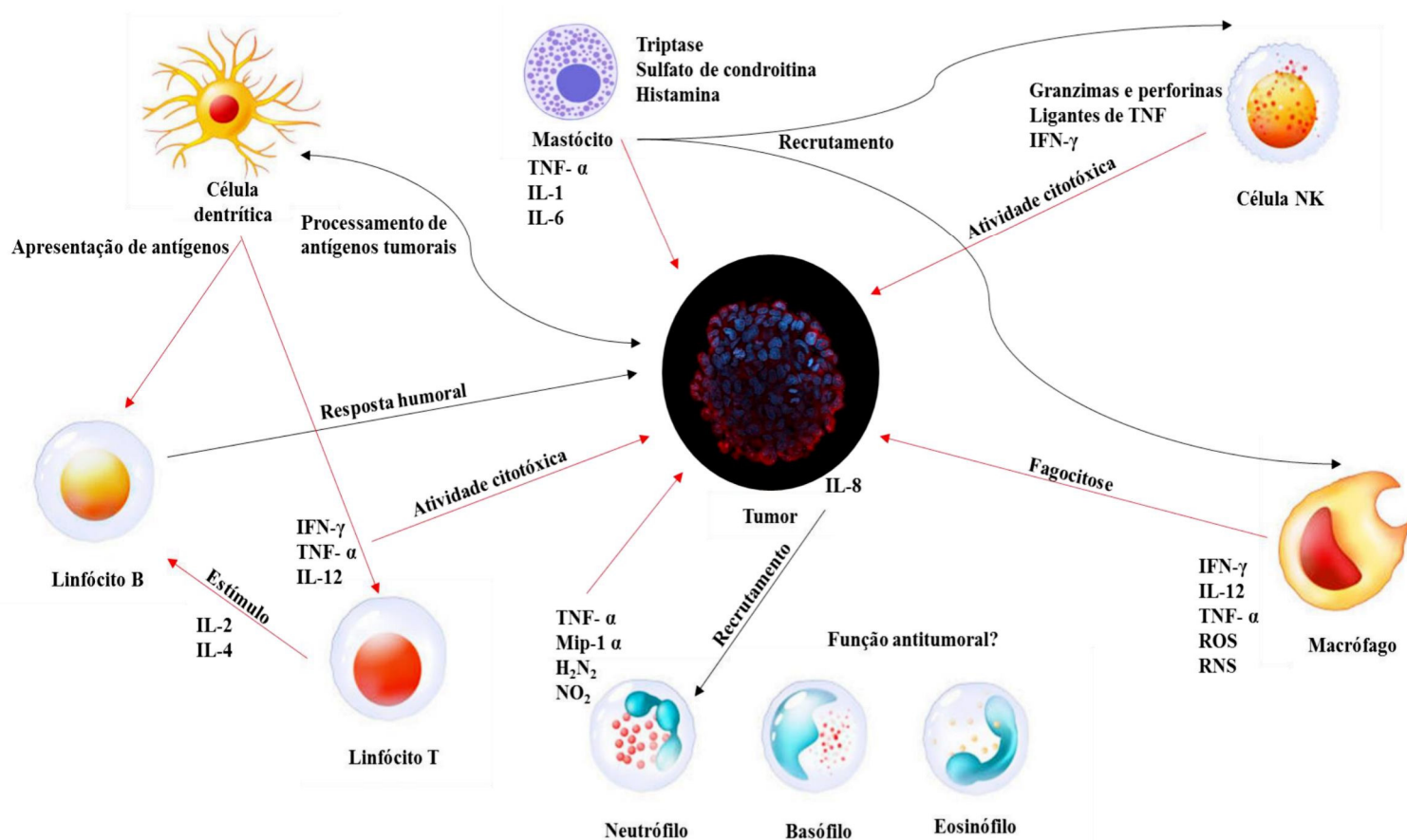


Figura 3. Mecanismos de eliminação das células tumorais pelo sistema imune do hospedeiro conforme previsto pela teoria da imunovigilância. Figura modificada de Chimal-Ramírez et al., 2013 (CHIMAL-RAMÍREZ; ESPINOZA-SÁNCHEZ; FUENTES-PANANÁ, 2013). Figura do próprio autor. Em tradução livre: Atividade de imunovigilância do câncer. Cada célula imunológica cumpre funções exclusivas e redundantes para permitir a eliminação das células tumorais. Entre as atividades antitumorais encontradas no microambiente tumoral estão a citotoxicidade mediada por células T CD8 + e NK, fagocitose por macrófagos M1, citólise induzida por mastócitos e respostas humorais por células B. As células dendríticas são ativadas por antígenos tumorais, que são então apresentados às células T e B. Essas atividades são coordenadas por uma variedade de moléculas secretadas pelas células imunes e tumorais diretamente para o ambiente do tumor ou para a circulação, onde serve para recrutar populações imunes adicionais para o local do tumor. As setas vermelhas tracejadas representam os efeitos antitumorais diretos, as setas azuis a tracejado, eliminação indireta de células tumorais. As setas pontilhadas representam o recrutamento de outras populações de células.

Alguns tumores são capazes de subverter o sistema imune a favor do seu próprio desenvolvimento. Essa possibilidade pode ser entendida quando levamos em conta a teoria da imunoeedição. A partir da instabilidade mutacional das células tumorais ocorre à formação de clones cada vez menos imunogênicos. Isso deve-se à seleção positiva

mediada pela força seletiva exercida pela própria resposta imunológica frente ao tumor (DUPAGE et al., 2012).

Além da seleção direta, as células tumorais e o ambiente na qual elas se desenvolvem, são conhecidos por serem capazes de modificar certos tipos de resposta imune. Isso se deve a diversos fatores secretados e/ou presentes nas células tumorais (FINN, 2012).

Entre esses fatores podemos citar: a capacidade de influenciar fibroblastos a secretar citocinas favoráveis a angiogênese e crescimento celular (TURNER; GROSE, 2010); produção de citocinas capazes de inativar a resposta efetora de células T CD8 e NK (BIERIE; MOSES, 2010); a capacidade de secretar substâncias solúveis capazes de causar apoptose em células efectoras (ABUSAMRA et al., 2005) e modificar a função normal de células inicialmente favoráveis a sua eliminação (BANIYASH, 2006).

Um exemplo clássico deste último mecanismo encontra-se nos macrófagos, que uma vez influenciados pelo tumor são reprogramados de um estado favorável a eliminação (M1) para um estágio propício ao crescimento do tumor (M2). A reprogramação celular é propiciada pela liberação de citocinas imunossupressoras como IL-4 e IL-10 (HANAHAHAN; COUSSENS, 2012; LIU et al., 2013).

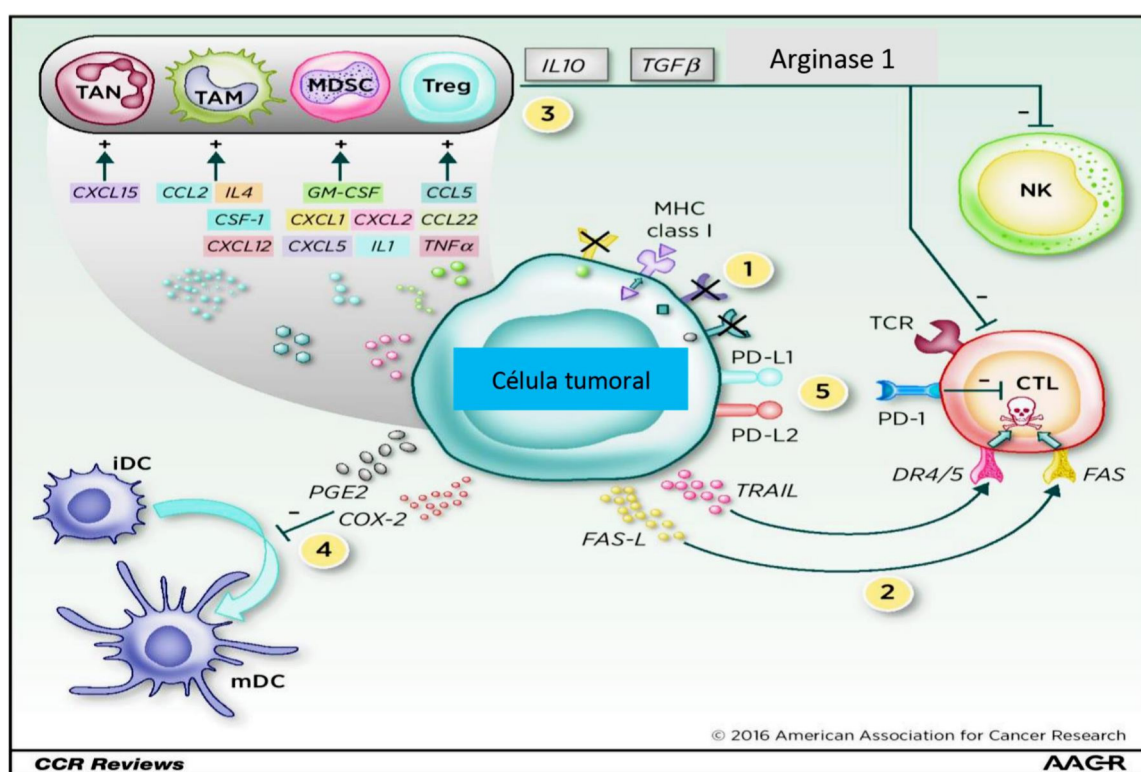


Figura 4. Mecanismos de escape empregados por células tumorais. Através da subversão do sistema imunológico os mecanismos normais da imunidade são cooptados pelo microambiente tumoral a favor do tumor em desenvolvimento. Figura modificada de Chabanon et al., 2016 (CHABANON et al., 2016). Em tradução livre: Mecanismos de

escape imunológico no microambiente tumoral. Vários mecanismos envolvendo componentes imunológicos contribuem para o escape do tumor. (1) O reconhecimento imunológico pode ser prejudicado após a expressão reduzida de moléculas MHC de classe I em células malignas, resultando na diminuição da apresentação do antígeno e, consequentemente, detecção reduzida por linfócitos T CD8 citotóxicos. (2) As células cancerígenas podem ativar mecanismos imunossupressores induzindo apoptose das células através da expressão de sinais de morte (incluindo ligantes FAS e TRAIL). (3) As células tumorais liberam no microambiente uma variedade de moléculas imunomoduladoras que inibem o sistema imunológico, como IL-6 e IL-10, por meio da indução de células Treg imunossupressoras e MDSC, enquanto a atividade de células T CD8 citotóxicas e células NK são inibidas. (4) Este desequilíbrio de citocinas, combinado com a secreção de TGFb, COX-2 e PGE2, inibe as células dendríticas de se diferenciarem e maturarem, afetando assim a apresentação dos antígenos tumorais e o reconhecimento pelas células T. A liberação de moduladores imunológicos adicionais ou metabólicos reguladores, como IDO e arginase, também favorecem o estabelecimento de um microambiente tumoral imunossupressor. (5) Expressão de ligantes de checkpoint por células cancerosas fornecem sinais co-inibidores para linfócitos T CD4 e CD8, impedindo-os de construir uma resposta antitumoral efetiva. CCL, ligando de quimiocina; COX-2, ciclooxygenase-2; CXCL, ligante de quimiocina (motivo C-X-C); FAS-L, ligando de FAS; GM-CSF, granulócito fator estimulador de colônias de macrófagos; iDC, célula dendrítica imatura; IDO, indoleamina-2,3-desoxigenase; mDC, célula dendrítica madura; MDSC, derivado de mieloide célula supressora; PD-1, morte celular programada 1; PD-L, ligante de morte celular programada; PGE2, prostaglandina E2; TAN, neutrófilo associado ao tumor; TCR, célula T receptor; Treg, células T regulatórias.

O padrão de resposta local exerce influência sobre células distantes do microambiente tumoral. Essa influência promove a formação de uma resposta favorável ao tumor, relacionada ao recrutamento e formação de células T e B reguladoras (Treg). Essas células são respostáveis pela manutenção de uma inflamação crônica incapaz de se tornar resolutive, muitas vezes protegendo o tumor de uma eliminação efetiva (REUTER et al., 2010; WHITESIDE, 2012).

Além das consequências imunológicas diretas, essa inflamação crônica desencadeia um processo de desgaste metabólico (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011). Isso é causado pela ativação do sistema imune e pela incessante necessidade de energia e de nutrientes demandadas pelo tumor. Esses dois fatores acabam por levar a perda de peso em pacientes oncológicos. Caso medidas não sejam tomadas este quadro pode evoluir para um processo de caquexia quando a perda de massa corpórea chega a ser maior que 5% (FEARON et al., 2011).

Um modelo experimental que une as características de inflamação crônica e desgaste metabólico e o tumor de Erlich. Trata-se de um carcinoma mamário murino sólido e transplantável descoberto por Paul Ehrlich em 1906 (KASTEN, 1996). A

inflamação gerada nesse modelo é acompanhada de uma grande produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-2 e IFN- γ e regulatórias como IL-10 (FERNANDES et al., 2015; HAMSA; KUTTAN, 2011). Esse padrão de citocinas está relacionada a reprogramação de macrófagos e produção de óxido nítrico (NO), relacionados a progressão tumoral (FERNANDES et al., 2015; KALISH et al., 2015). Esses mesmos fatores permitem que esse modelo reproduza o surgimento da caquexia induzida por eventos oncológicos (FRAJACOMO et al., 2016).

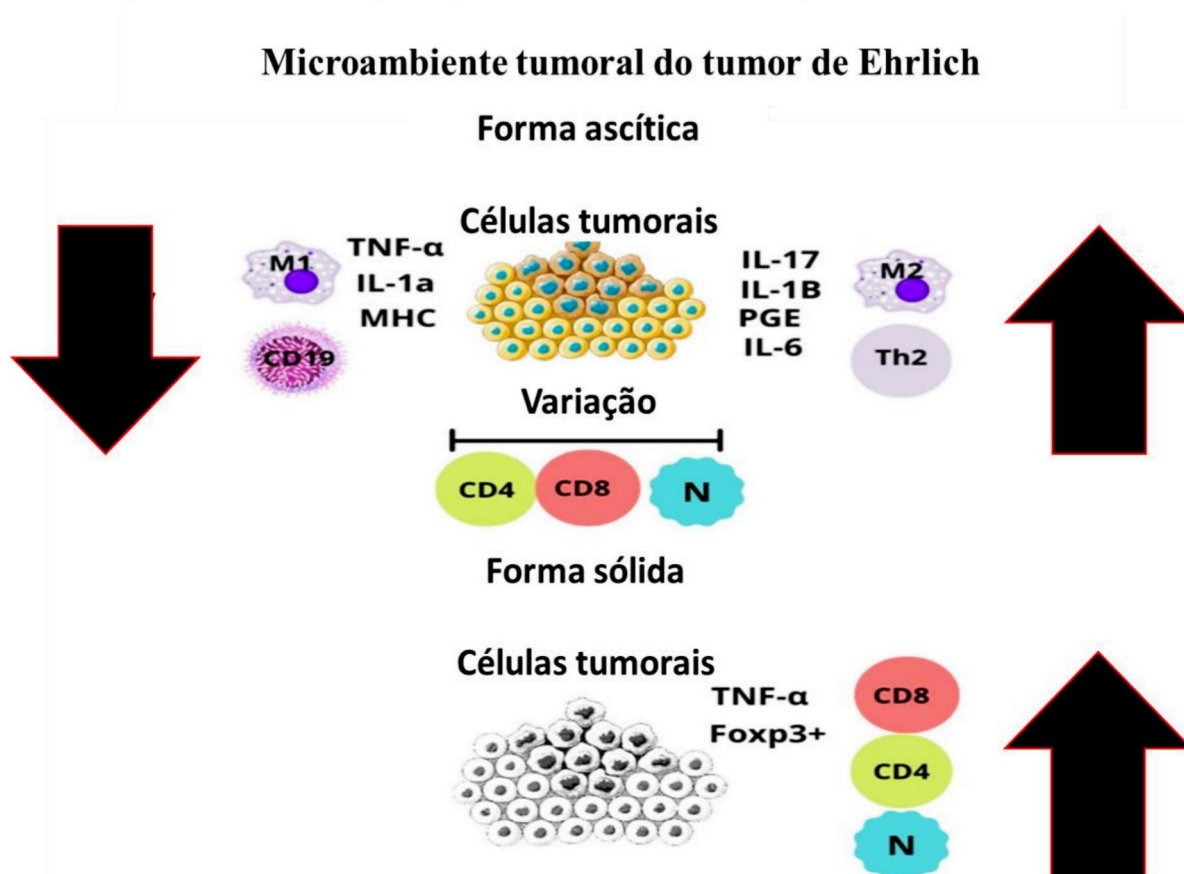


Figura 5. Descrição do microambiente tumoral do tumor de Erlich. Figura modificada de Feitosa et al., 2021 (FEITOSA et al., 2021). Em tradução livre modificada: Os estudos indicam que há aumento da expressão dos macrófagos M2 e T Helper (TH2) e das citocinas IL-17, IL-1 β , IL-6 e PGE na forma ascítica de Ehrlich. Essas expressões fenotípicas também são encontradas em neoplasias ascíticas em humanos. O tumor sólido de Ehrlich foi caracterizado por expressão aumentada de CD4, CD8, neutrófilos e TNF- α , Foxp3 + e Qa-2 +, e essas características são análogas aos cânceres de mama humanos.

2.5 Estratégias atuais para o combate ao câncer

Atualmente existem diversas estratégias para se eliminar ou, no pior dos casos, conter o avanço de células tumorais pelo organismo no qual o mesmo se desenvolve. Entre as principais estratégias utilizadas, temos três grandes linhagens de contenção:

cirurgia, radioterapia e quimioterapia (DESANTIS et al., 2014; HU; LI, 2020; MORGAN; FULLERTON; BEDI, 2021).

A cirurgia consiste na remoção do tumor de forma mecânica. É indicada nos casos em que se entende que o tumor é passível de ser completamente retirado, juntamente com as células cancerosas presente nas proximidades, sem causar danos irreparáveis para o paciente. Esta abordagem está entre uma das mais comuns utilizadas para a eliminação de vários tipos de tumores sólidos (COFFEY et al., 2003; MORGAN; FULLERTON; BEDI, 2021).

A radioterapia é indicada em casos de tumores localizados, e consiste na emissão de radiações ionizante com o objetivo de destruir ou danificar o material genético das células cancerosas, impedindo sua proliferação (KÖNIG et al., 2016). Sua utilização após a remoção cirúrgica de tumores está correlacionada a uma maior taxa de sobrevida, e uma menor taxa de recidiva ao longo do tempo, o que justifica sua utilização em conjunto a primeira abordagem (NARAYAN, 2021).

Em tumores sem uma localização bem definida, ou de difícil acesso, que impeça tanto a remoção cirúrgica ou então a radioterapia, geralmente necessitam ser contidos pela utilização da quimioterapia. Essa abordagem é todo tratamento de uso sistêmico que utiliza medicamentos para impedir a capacidade de proliferação das células, causando assim sua contenção, ou de forma preferencial, sua destruição (ZITVOGEL et al., 2013).

Devido à inespecificidade da maioria dos quimioterápicos sua utilização acaba por agir também em células não tumorais de crescimento rápido ou constante, como por exemplo, as células mieloides. Isso resulta em um dos principais efeitos adversos dessa abordagem, a mielossupressão (KUDERER et al., 2006).

Outra abordagem, bem mais recente, é a utilização dos processos imunológicos para combater de forma mais específica e direta as células tumorais. O uso da imunoterapia consiste em utilizar de forma farmacológica as células, seus produtos e/ou suas interações contra câncer. Nesse sentido, temos a utilização de anticorpos monoclonais, bloqueadores de vias específicas relacionadas ao crescimento tumoral e a utilização de células do próprio paciente, que são ativadas *ex vivo*, para combater o tumor. A imunoterapia está entre as abordagens mais efetivas, porém mais caras, no tratamento oncológico (ESFAHANI et al., 2020).



Figura 6. Possíveis tratamentos para a eliminação e ou controle de tumores malignos. Figura modificada de ebismedical 2021.

Um dos maiores exemplos de quimioterápico já produzidos é a ciclofosfamida, um agente nitrogênico do grupo das oxazoforinas. A origem de sua utilização reside na observação empírica que soldados envenenados por gás mostarda apresentavam aplasia medular (DEVITA; CHU, 2008).

Sua síntese química se deu com a substituição do anel oxazafosforina pelo grupo metil da mostarda de nitrogênio com o objetivo de se criar uma pró-droga. Inicialmente inativa, a nova substância é convertida apenas nas células alvo, ou seja, ricas em fosfamidase. Uma vez convertida ocorre a liberação da mostarda fosforamida, sua forma ativa, que possui propriedades alquilantes (IQUBAL et al., 2019).

Por se tratar de um agente alquilante, os metabólitos da ciclofosfamida causam ligações entre as fitas do DNA impedindo sua dinâmica de fechamento e abertura. Isso bloqueia os processos de transcrição e de replicação, o que culmina com a parada do ciclo celular, e em apoptose (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009). Esse efeito é tão mais acentuado quanto for a falta da enzima aldeído desidrogenase, responsável pela conversão da mostarda fosforamida em metabólitos não tóxicos. Tal propriedade explica o efeito tóxico dessa substância sobre as populações de linfócitos ativados (MAGNI et al., 1997).

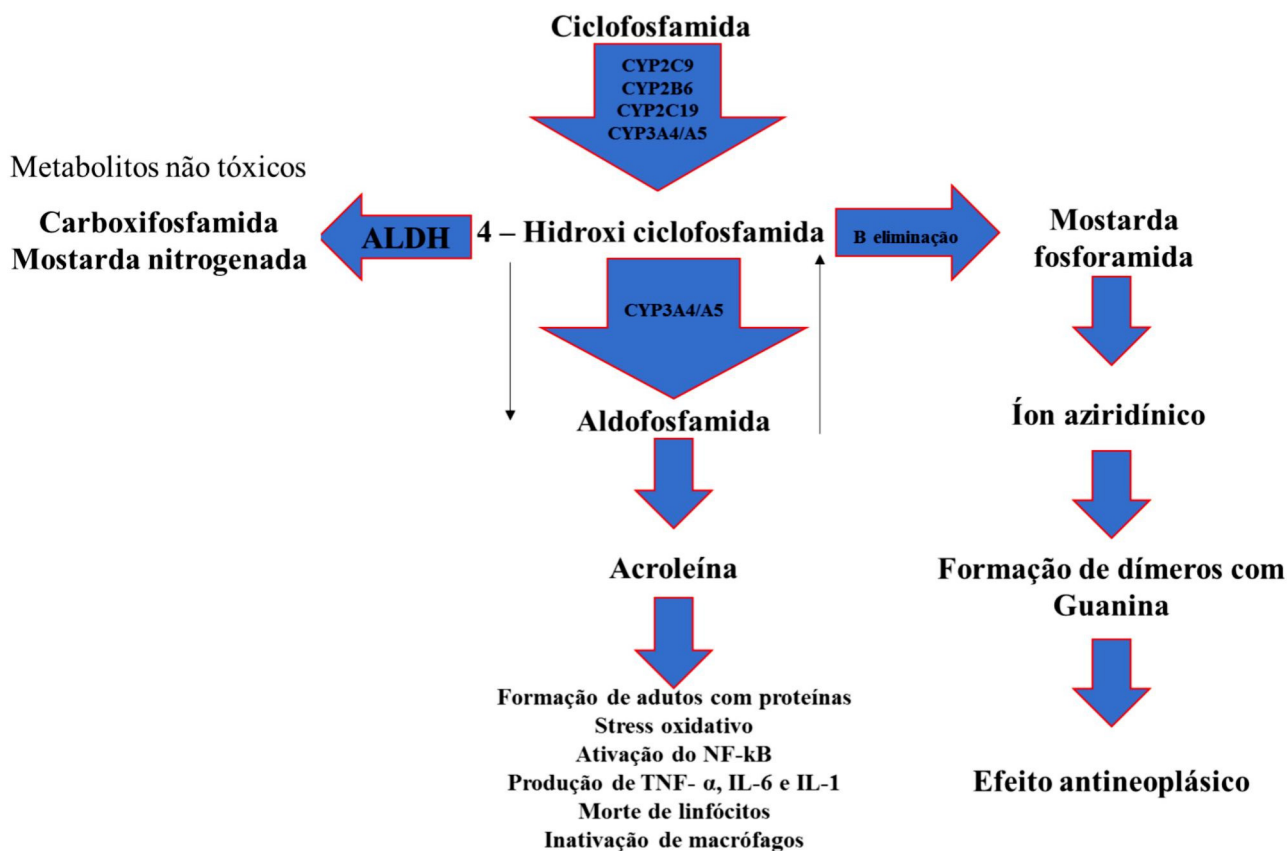


Figura 7. Mecanismos de ação da ciclofosfamida sobre o câncer e seus efeitos colaterais locais e sistêmicos. Figura modificada de Iqubal et al., 2018 (IQUBAL et al., 2019). Em tradução livre: Metabolismo da Ciclofosfamida (CP). A CP sofre metabolismo hepático e forma 4-hidroxíciclofosfamida (4-HCY), que posteriormente se metaboliza em aldofosfamida. A aldofosfamida produz mostarda fosforamida por eliminação β , que apresenta atividade anticancerígena. A aldofosfamida se metaboliza posteriormente em metabólitos não tóxicos, como carboxifosfamida e mostarda nitrogenada, juntamente com o composto tóxico acroleína, que é principalmente responsável pelas toxicidades induzidas pela PC.

Além dos seus usos clássicos como imunossupressor para transplantes e controle de tumores sensíveis, a ciclofosfamida tem sido utilizada como um tratamento alternativo para o controle de doenças autoimunes. Entre essas doenças estão lúpus eritematoso sistêmico (HOUSSIAU et al., 2010) e a artrite reumatoide (BRUMMAIER et al., 2013).

Apesar do seu largo uso e relativa seletividade, a ciclofosfamida possuiu efeitos sistêmicos graves, em especial quando usado de forma repetida. Entre esses efeitos são

predominantes a náusea profunda, supressão medular seguida de ressurgimento de infecções latentes e cistite hemorrágica causada pelo acúmulo de acroleína, um subproduto do metabolismo da ciclofosfamida (MEOTTI et al., 2013).

Outro efeito importante desse quimioterápico é a capacidade da ciclofosfamida em “reiniciar” a resposta imunológica frente a um tumor em desenvolvimento. Isso ocorre devido a sua alta toxicidade sobre linfócitos reguladores (CD4+CD25), induzidos pelo tumor e pela sua capacidade de aumentar a população de células dendríticas maturadas em detrimento das imaturas (WADA et al., 2009). Esses fenômenos permitem uma remontagem da resposta imunológica frente ao tumor, com a reativação de linfócitos e células da resposta inata permitindo o controle e até mesmo a eliminação do câncer (GHIRINGHELLI et al., 2004).

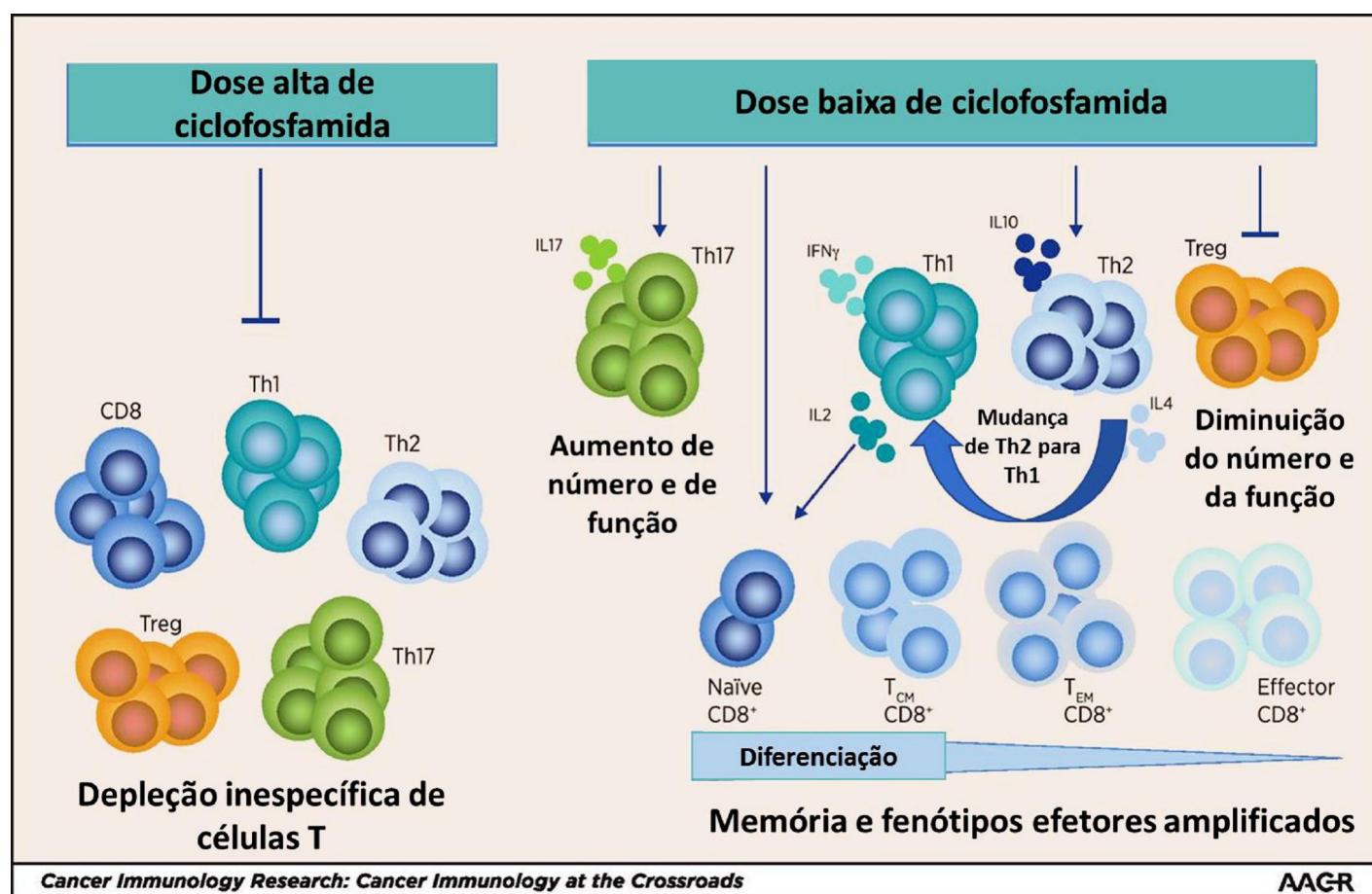


Figura 8. Efeito da ciclofosfamida sobre diferentes grupos de células imunes, com foco na diferenciação das respostas Th2 para Th1. Figura modificada de Abu Eid et al., 2016 (EID et al., 2016). Em tradução livre: O efeito imunomodulador da ciclofosfamida nas células T. Quando administrada em altas doses, a ciclofosfamida causa depleção inespecífica de células T. No entanto, em doses baixas, a ciclofosfamida exerce uma série

de efeitos em diferentes subconjuntos: Estes incluem depleção seletiva de Tregs e inibição de sua função supressora; mudança na secreção de citocinas de Th2 para Th1; e aumento de Th17, memória e fenótipos de células T CD8 efectoras.

2.7 Vitamina E: Efeitos sobre o câncer

Durante o tratamento oncológico é comum se fazer intervenções nutricionais, entre elas, melhorar o aporte de substâncias antioxidantes, com o intuito de promover uma melhora no quadro clínico (PRATHEESHKUMAR et al., 2012; VERNIERI et al., 2018). Entre as substâncias com essa propriedade podemos destacar a vitamina E, encontrada em vários tipos de vegetais, em especial em seus óleos (A. SHETTY, 2013).

Esta substância subdivide-se em dois grandes grupos, os tocoferóis (cadeia lateral saturada contendo 16 átomos de carbono) e os tocotrienóis (cadeia lateral insaturada contendo 16 átomos de carbono). Cada um desses tipos possui quatro “formas” identificadas pelos prefixos alfa, beta, gama e delta, sendo esta diferença causada pela quantidade e localidade de grupos metil que se encontram no anel aromático do tocol (COLOMBO, 2010).

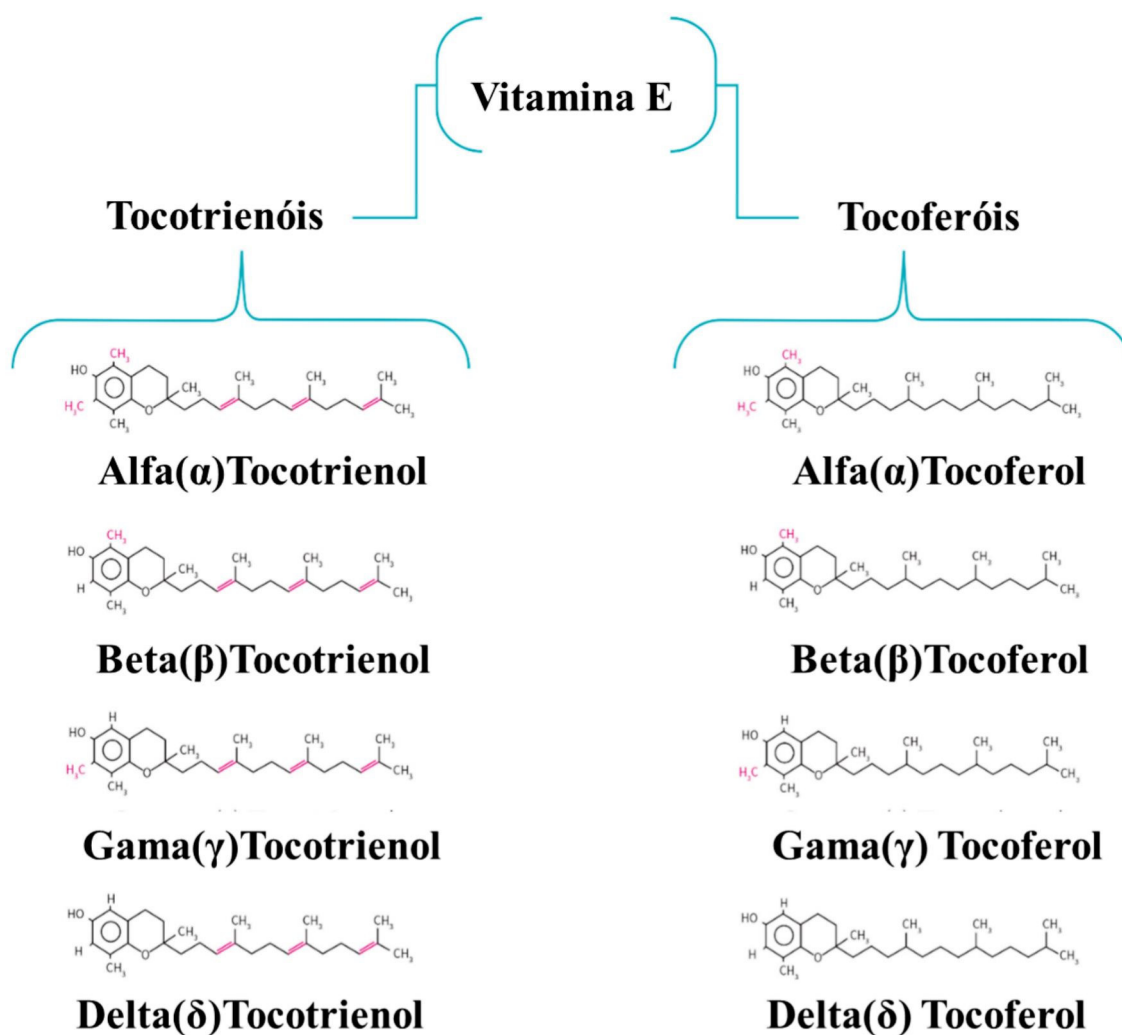


Figura 9. Divisão dos vitâmeros da vitamina E de acordo com a saturação da cauda lateral posição dos grupos metil no anel tocol. Figura modificada do site examine.com.

Sua forma mais comumente encontrada é o α -tocoferol seguida do γ -tocoferol, sendo a primeira a mais importante economicamente e a mais biodisponível (REBOUL et al., 2006). Independentemente de sua forma esta substância é conhecida por suas propriedades antioxidantes, sendo uma das principais reguladoras de radicais livres lipossolúveis encontradas na dieta humana (NIKI, 2014).

Os vitâmeros da vitamina E também já demonstraram a capacidade de modular o processo inflamatório através de mecanismos não relacionados ao processo oxidativo. Entre eles, a capacidade de inibir a ação enzimática da ciclo-oxigenase-2 (Cox-2), e por sua vez, a produção da prostaglandina E2. Isso leva a interrupção da oxidação do ácido araquidônico. Ocorre assim, a supressão do fator nuclear kappa B (NF- κ B), e dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) 6 e 3 (JIANG, 2014).

A inativação desses fatores e enzimas leva a menor produção de citocinas pro inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), TNF- α e IL-1 pelas células imunológicas. Esse processo pode estar relacionado à proteção contra doenças crônicas e até mesmo a desregularização imunológica causada pelo processo carcinogênico (AZZI et al., 2004; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; HIRANO, 2021).

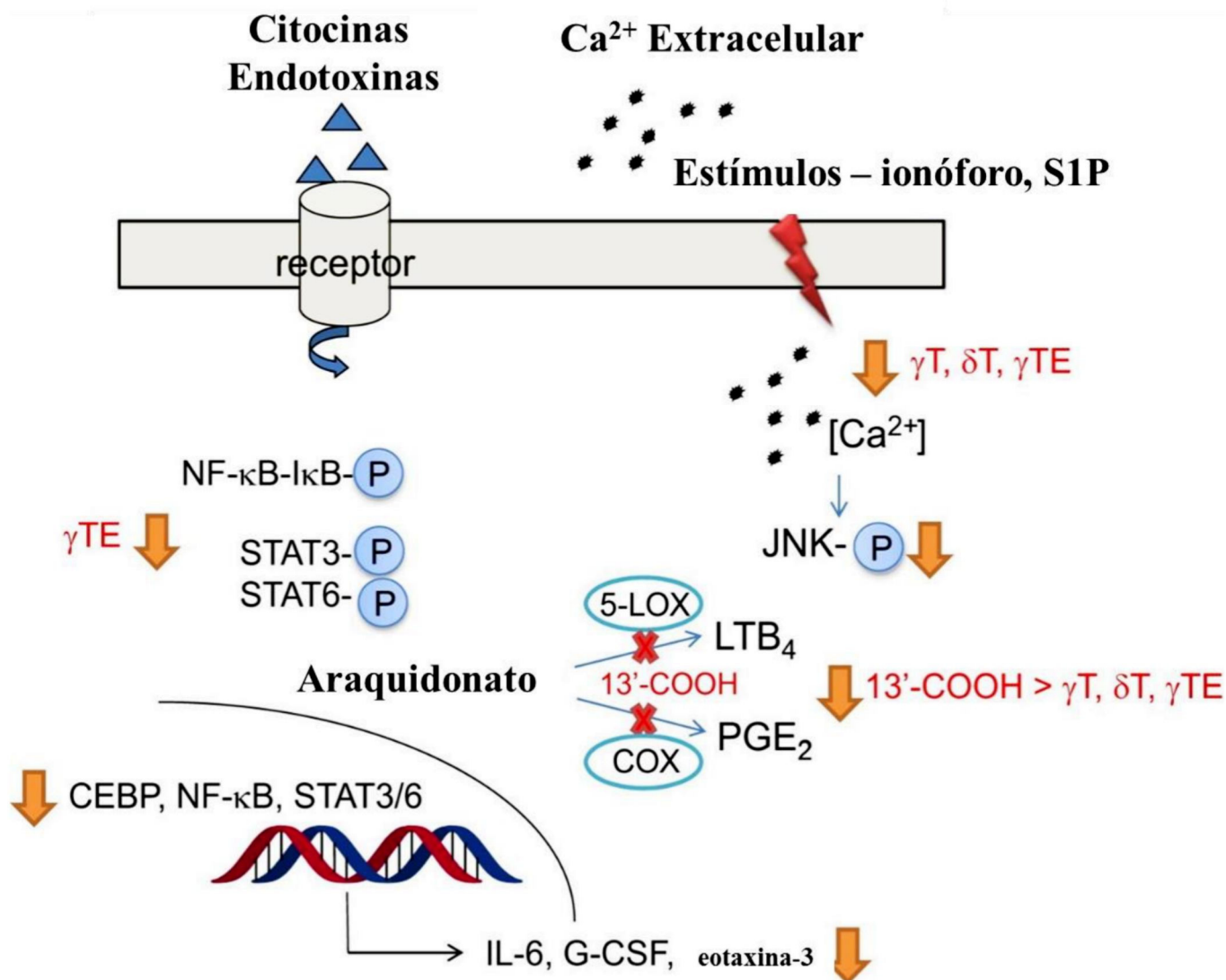


Figura 10. Mecanismos de ação da vitamina E sobre processos imunológicos. Figura modificada de Jiang 2014 (JIANG, 2014). Em tradução livre: Atividades anti-inflamatórias e mecanismos de ação das formas de vitamina E e carboxicromanois de cadeia longa. Em células epiteliais, macrófagos e neutrófilos, γ T, δ T e γ TE inibem modestamente PGE₂ e LTB₄ sem inibir a atividade de COX e 5-LOX. 13'-COOHs inibem potentemente a atividade das enzimas COX-1 / COX-2 e 5-LOX (cruzes vermelhas). Nos neutrófilos, as formas de vitamina E suprimem o influxo de cálcio estimulado por ionóforo ou S1P (esfingosina 1-fosfato) e sua sinalização a jusante. Em células epiteliais pulmonares, macrófagos e algumas células cancerosas, γ TE inibe a ativação de NF- κ B e STAT6 / 3, bem como seus genes regulados, incluindo citocinas e quimiocinas.

Além dessas propriedades, também é notório o papel da vitamina E na manutenção da resposta imune normal. Sua presença na membrana das células imunes é essencial para a proteção das mesmas durante o processo de stress oxidativo (NIKI, 2014). Estudos em modelos animais também demonstram que sua ausência é capaz de levar a depressão da proliferação de linfócitos em ratos (PEKMEZCI, 2011). Em camundongos idosos, uma dieta rica em vitamina E é capaz de aumentar a proliferação de linfócitos T e a sua produção de IL-2, quando comparada com uma dieta controle (MORIGUCHI, 1997).

Um resultado semelhante foi achado em estudos de suplementação em humanos idosos. Nele a vitamina E foi capaz de aumentar a proliferação de linfócitos estimulados com mitógenos, a quimiotaxia de neutrófilos e a produção de IL-2 (WU; MEYDANI, 2014). Outro estudo encontrou o aumento da produção de anticorpos contra hepatite B e tétano quando estimulados com vacinas na presença de uma dieta suplementada com vitamina E, sendo esta atividade associada ao aumento da expressão e atividade de linfócitos B (MEYDANI et al., 1997).

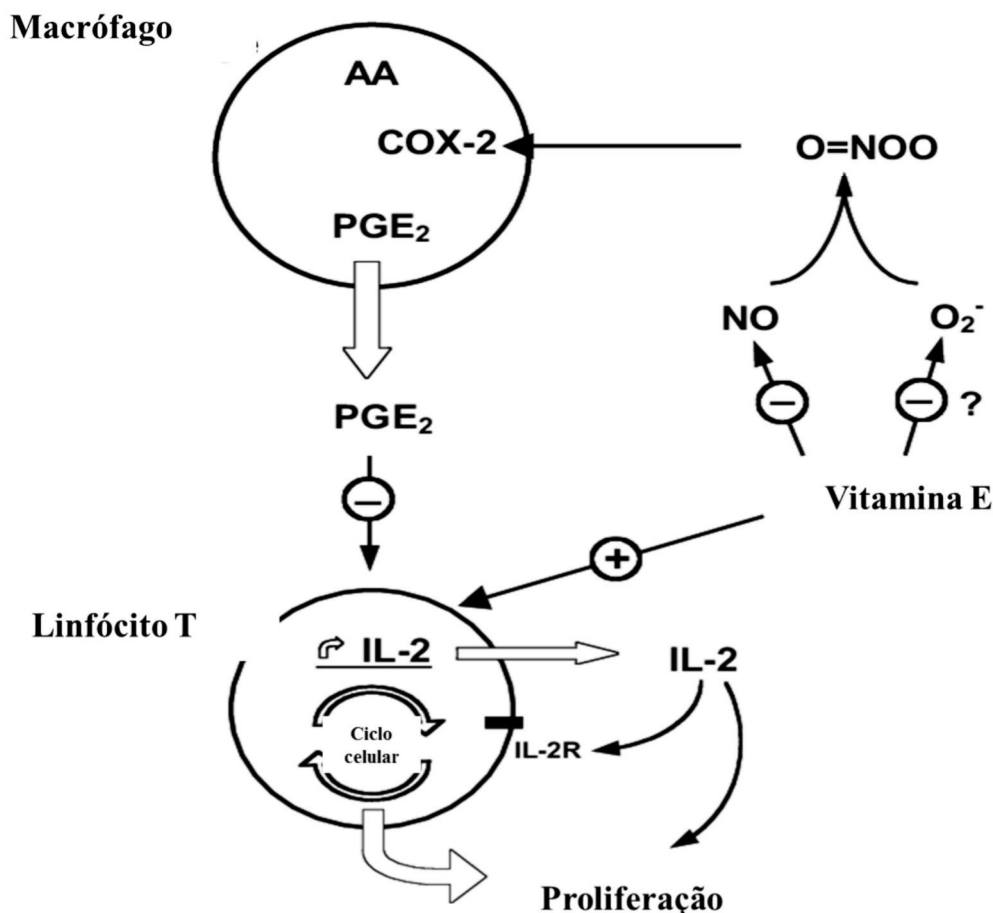


Figura 11. Mecanismo de ação da vitamina E sobre a imunidade inata regulando a produção de IL-2 que culmina na expansão clonal de linfócitos. Figura modificada de LEWIS et al., 2019 (LEWIS; MEYDANI; WU, 2019). Em tradução livre: Mecanismos da influência da vitamina E nas respostas imunológicas. A vitamina E reduz a atividade da ciclooxygenase (COX) em macrófagos velhos ao diminuir a produção de óxido nítrico, o que resulta em menor produção de peroxinitrito. O peroxinitrito demonstrou aumentar a atividade da COX. A diminuição da atividade COX pela vitamina E resulta na diminuição da produção de prostaglandina E 2 supressoras de células T (PGE 2) pelos macrófagos, levando ao aumento das funções das células T. A vitamina E também pode diretamente (independentemente de seu efeito de PGE 2) aumentar a proliferação de células T e a produção de IL-2, aumentando a capacidade de divisão celular, o número de células T e a quantidade de IL-2 produzida por essas células. A vitamina E também pode afetar a proliferação celular, afetando a expressão de moléculas relacionadas ao ciclo celular. AA, ácido araquidônico; COX, ciclooxygenase; PGE 2, prostaglandina E 2; ONOO, peroxinitrito; NO, óxido nítrico.

Essas propriedades imunoestimulantes são por vezes relacionadas à capacidade da vitamina E de melhorar a “sinapse imunológica”, ou seja, a ligação e posterior ativação, entre linfócitos T naïve e células apresentadoras de antígenos. Essa interação feita de forma mais robusta está associada à melhora da ativação e proliferação destas células

frente a estímulos diversos tanto *in vitro* quanto *in vivo* em camundongos idosos (MARKO et al., 2009; MOLANO; MEYDANI, 2012).

A suplementação com vitamina E foi associada a uma maior resistência a infecções virais em humanos, devido ao aumento da atividade citotóxica de linfócitos T e células NK. Além disso, amplificou-se a atividade fagocítica de macrófagos alveolares correspondendo assim a uma resposta Th1 (MEYDANI et al., 1997). Frente a infecções virais, a suplementação com vitamina E em camundongos idosos foi capaz de aumentar a produção de IL-2 e IFN- γ , amplificando assim uma resposta celular relacionada à diminuição da carga viral (HAN et al., 2000).

Outra propriedade interessante demonstrada por esse micronutriente é sua capacidade de diminuir a resposta inflamatória exacerbada. Essa propriedade é evidenciada, principalmente pelo vitâmero gama-tocoferol, em modelos de inflamação e alergia. Ele age através da redução do stress oxidativo, diminuição dos picos de citocinas inflamatórias e migração intensa de células para o foco ativo de inflamação (CHUNG et al., 2010; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Além das propriedades citadas acima, estudos também têm demonstrado propriedades enzimáticas e até mesmo regulação de funções neurológicas desempenhadas pelos vitâmeros da vitamina E (MOCCHIGIANI et al., 2014).

Devido às propriedades apresentadas pela vitamina E, sua utilização como forma de conter o processo de carcinogênese foi muito pesquisada em diversos estudos de coorte. Um dos principais mecanismos de ação que possivelmente explicaria seus efeitos protetores seria a capacidade desta substância de proteger o DNA das células de processos mutacionais causados pelo dano exercido pelos radicais livres (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010).

Porém, assim como em muitos outros estudos com padrões alimentares e micronutrientes, as correlações achadas não foram tão significativas quanto esperado. A ingestão da vitamina E, em suas várias formas, não foram capazes de diminuir a incidência de câncer de pulmão e mama (SLATORE et al., 2008), próstata (FLESHNER et al., 2011; LIPPMAN et al., 2009) ou colón (GAZIANO et al., 2012). O conjunto destes trabalhos, focados particularmente no vitâmero alfa tocoferol, parecem demonstrar uma capacidade quimioprotetora limitada ou então específica, cujos parâmetros de efetividade ainda não forem bem compreendidos.

Esses dados entram em conflito com as pesquisas que desencadearam os grandes estudos de prevenção, cuja suplementação com vitamina E em diversos

modelos, estava associada a um efeito protetor contra o câncer, particularmente as formas gama e delta (SMOLAREK; SUH, 2011). Além disso, a vitamina E também estava associada a um melhor prognóstico em sistemas cuja integridade já estava comprometida pela presença de um tumor em desenvolvimento e cujo tratamento oncológico já estavam em curso (NECHUTA et al., 2011). Essas características parecem apontar para um efeito adjuvante no tratamento oncológico mais constante que seu efeito quimioprotetor.

Apesar desses conflitos, a capacidade desta substância de interferir no processo de carcinogênese mantém-se, sendo pesquisas *in vitro* e *in vivo* as principais fontes dos possíveis mecanismos pelos quais estas propriedades podem estar sendo desempenhadas (YUEN; TSAO, 2021).

Um dos mecanismos mais estudados dos vitâmeros da vitamina E são sua ação apoptótica/necrótica sobre linhagens tumorais. Esses estudos foram objetos de particular interesse na comunidade científica, pois demonstraram baixa citotoxicidade em células normais ao mesmo tempo em que causavam a morte seletiva de células cancerígenas (NEUZIL et al., 2001). Essa propriedade parece estar ligada a expressão genética de supressores de tumor e oncogenes, entre eles Bax/Bcl-2 (REAGAN-SHAW et al., 2008).

Outro mecanismo estudado foi a modificação do processamento de resíduos metabólicos e produtos da resposta imunológica, entre eles radicais livres, causado pela diminuição da atividade da glutathione redutase em células tratadas (STANKOV et al., 2007).

O mecanismo redox também está diretamente relacionado à capacidade da vitamina E de causar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio dentro de células em divisão, através da interferência direta na cadeia respiratória das mitocôndrias. Essa propriedade leva tanto a morte direta das células tumorais, quanto à diminuição do processo de angiogênese devido à morte das células endoteliais presentes no microambiente tumoral (DONG et al., 2007).

Além desses mecanismos diretos ou estritamente relacionados ao microambiente tumoral, a vitamina E também possui a capacidade de aumentar a efetividade da resposta imune frente ao tumor. Este efeito é decorrente da quantidade e qualidade das células imunes recrutadas para o local de desenvolvimento tumoral. Isso desencadeia um efeito positivo sobre o processo de imunovigilância,

desempenhado pelo sistema imune frente ao tumor em desenvolvimento (SHKLAR et al., 1990).

Essa resposta imune diferenciada parece estar ligada à capacidade do micronutriente de regular o balanço das citocinas produzidas pelas células imunológicas em relação ao tumor. Estudos tem demonstrado que a suplementação com vitamina E é capaz de promover uma maior produção de citocinas correlacionadas a reposta Th1 frente a diversos tipos de tumor (HANSON et al., 2007).

Essa modificação provoca a ativação de células imunológicas mais propensas a conter e/ou destruir o tumor em desenvolvimento. Entre as células ativadas estão os linfócitos T citotóxicos, células natural killers (NK) e alguns constituintes da imunidade inata como macrófagos e neutrófilos (HANSON et al., 2007; WU; MEYDANI, 2014).

Todos esses mecanismos são correlacionados a capacidade protetora ou potencializadora da vitamina E de conter ou promover a destruição de células cancerígenas em modelos laboratoriais ou estudos em pequena escala em humanos. O motivo pelo qual tais efeitos não são observados em experimentos em larga escala ainda são largamente debatidos.

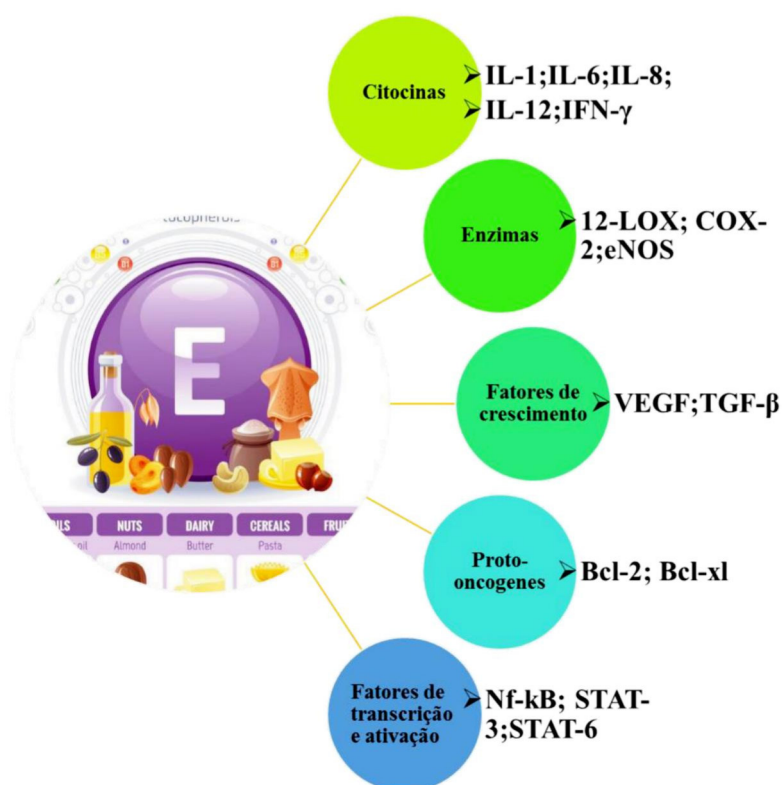


Figura 12. Mecanismos de ação geral dos tocoferóis. Figura inspirada no diagrama de Kannappan et al., 2012 (KANNAPPAN et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de um mix de tocoferóis ricos nos vitâmeros δ e γ no processo no desenvolvimento tumoral em modelos *in vitro e in vivo*, com particular interesse em possíveis efeitos adjuvantes no tratamento quimioterápico com a ciclofosfamida. Sendo o enfoque principal nos processos de imunomodulação e ativação celular.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Objetivos específicos do capítulo 2

- ✓ Avaliar o efeito da suplementação com tocoferóis nos parâmetros nutricionais e hematológicos de camundongos submetidos ao tumor de Ehrlich;
- ✓ Verificar a influência do tempo de suplementação sobre a resposta imune desencadeada pela suplementação com tocoferóis;
- ✓ Quantificar a produção de óxido nítrico pelas células do microambiente tumoral e pelas células do sistema imune;
- ✓ Comparar os padrões de citocinas produzidos pelos diferentes grupos;
- ✓ Analisar o perfil de ativação das células imunes presentes no baço dos animais.

3.2.1 Objetivos específicos do capítulo 3

- ✓ Avaliar a influência do mix de tocoferóis sobre a viabilidade e capacidade proliferativa de células Hs578T;
- ✓ Analisar a capacidade dessas substâncias de interferir no processo de migração e invasão;
- ✓ Caracterizar o efeito do tratamento experimental sobre as principais proteínas do citoesqueleto, actina e tubulina;
- ✓ Compreender a interação entre o tratamento com ciclofosfamida e a suplementação com o mix de tocoferóis nos camundongos submetidos ao tumor de Ehrlich;
- ✓ Medir o efeito da suplementação nos parâmetros nutricionais e hematológicos de camundongos submetidos ao tratamento combinado;
- ✓ Comparar os padrões de citocinas produzidos pelos diferentes grupos;
- ✓ Analisar o perfil de ativação das células imunes presentes no baço dos animais.

4. Capítulo dois

Título: Suplementação com tocoferóis modula células imunes em modelo de tumor sólido de Ehrlich sem apresentar atividade antineoplásica.

Resumo

A Vitamina E, em especial os tocoferóis, são substâncias lipossolúveis com importante papel no stress oxidativo e regulação da resposta imune. No contexto oncológico, suas atividades ainda são debatidas, sendo possíveis usos feitas com cautela devido às incertezas sobre o seu desfecho. Assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos imunomoduladores de um mix de tocoferóis sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Erlich (ET). Para isso um estudo experimental em modelo animal utilizando camundongos swiss inoculados com ET (1×10^7 células / mL) no coxim plantar direito. Os grupos experimentais ($n=7$ grupo) foram: Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC), 25 mg/kg intraperitoneal (i.p.); Grupo suplementação pré e pós-tumor (CS), tratado com tocoferóis na dose de 100mg/Kg/dia, v.o. por 14 dias antes do inóculo, e por mais 16 dias após o inóculo; Grupo suplementação pós-tumor (TS), tratados com tocoferóis na dose de 100mg/Kg/dia, v.o., após 2 dias do inóculo do tumor, durante 15 dias. Foram analisados durante o experimento os Dados nutricionais (peso, consumo alimentar e perda de massa corporal) e o volume do tumor, para avaliação do crescimento tumoral. Após a eutanásia foram obtidos os dados hematológicos, com quantificação da série vermelha e branca, a fenotipagem das células imunes, em especial as populações de linfócitos, macrófagos e células NK, a produção de citocinas (MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL12 e IL10) e Produção de óxido nítrico (NO) pelas células do baço e do microambiente tumoral. Os dados nutricionais demonstraram que o grupo TS obteve a menor perda de massa corporal, especialmente em relação ao grupo PC ($p<0,001$). O hemograma relevou que, independentemente do tempo de tratamento, os tocoferóis foram capazes de aumentar o número de leucócitos e eritrócitos ($p<0,05$). Em relação ao volume do tumor, o grupo CS obteve o maior crescimento, divergindo dos outros grupos já no 14º dia de tratamento ($p<0,05$). A produção de citocinas inflamatórias, com exceção do TNF- α diminuiu apenas relação ao tratamento com ciclofosfamida ($p<0,05$). Apesar disso, os grupos TS e CS demonstraram uma tendenciar a diminuição da produção de IL-12, IFN- γ e MCP-1 e aumento de IL-10, em relação ao grupo NC. A produção de NO foi aumentada apenas no grupo CS em relação ao grupo NC ($p<0,05$). A fenotipagem das células do baço não demonstrou alterações no padrão de ativação das células imunes. Os dados demonstram que os efeitos proliferativos e imunoestimulantes dos tocoferóis são mantidos no contexto oncológico, porém, esse fenômeno não se traduziu na contenção do tumor. O maior desenvolvimento tumoral encontrado no grupo CS parece refletir que em alguns casos a ação dos tocoferóis podem ser danosas. Esses achados denotam que a utilização dos tocoferóis como antineoplásicos é limitada ou então inexistente no modelo estudado. Apesar disso, a melhora nos parâmetros hematológicos poderia sugerir o uso dessas substâncias em pacientes com tumores controlados por tratamentos farmacológicos, como quimioterapia, que tenham anemia e leucopenia como efeitos adversos intenso

Palavras chaves: Vitamina E, imunoproliferação, Modulação imunológica; metabolismo

1.Introdução

O câncer é uma doença prevalente no cenário mundial, atingindo países desenvolvidos e em desenvolvimento (MIRANDA-FILHO et al., 2020; MUELLER, 2019). Mesmo sendo a segunda maior causa de morte no mundo, é uma das doenças mais temida pela população em geral (BOBEVSKI et al., 2021; COSTA et al., 2016). Dentre as diversas ações que visam prevenir ou melhorar o tratamento do câncer, a busca por uma alimentação que atenda este propósito, gira em torno de nutrientes funcionais com propriedades antineoplásicas (RAVASCO, 2019; SOLDATI et al., 2018).

Neste contexto, o estudo sobre as vitaminas ao longo dos anos vem crescendo com o objetivo de triar e estabelecer os melhores nutrientes para suplementação da dieta com o impacto na redução do câncer na população (ABIRI; VAFA, 2020; MOKBEL; MOKBEL, 2019; VAUGHAN-SHAW et al., 2019; YANG et al., 2020). Vitaminas com propriedades antioxidantes são apontadas como boas candidatas por controlarem as espécies reativas de oxigênio (EROS) envolvidas no processo de iniciação e progressão das células tumorais (GEORGE; ABRAHAMSE, 2020; KHURANA et al., 2018).

Muitos estudos demonstram que EROS podem ter um papel fundamental no estabelecimento e progressão de tumores malignos, através do aumento da instabilidade genética, ruptura da resposta imune antitumoral, ativação de vias de inflamação e crescimento celular, promoção da angiogênese e estabelecimento de resposta reguladora pró tumor (OHL; TENBROCK, 2018; REUTER et al., 2010; SARMIENTO-SALINAS et al., 2021). Além disso, trabalhos demonstram que o controle do stress oxidativo e inflamação pode impedir ou diminuir o desenvolvimento tumoral, tendo este controle um papel favorável até mesmo nos tratamentos antitumorais (HELFINGER; SCHRÖDER, 2018; JIANG et al., 2022; KHURANA et al., 2018).

Dentro deste contexto, destacamos a vitamina E, uma importante substância lipossolúvel com propriedades antioxidantes (AZZI, 2019). Parte da versatilidade dessa vitamina encontra-se no fato da mesma se tratar, na verdade, de 8 diferentes vitâmeros. Entre eles encontram-se os tocoferóis, compostos pelas formas alfa, beta, gama e delta (JIANG, 2014). Apesar da forma alfa ser extensivamente estudada e mais comum, óleos vegetais ricos nas formas gama e delta, como os encontrados em nozes,

pistache, gergelim e soja tem despertado o interesse da comunidade científica por suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (JIANG, 2014; JIANG et al., 2022; REITER; JIANG; CHRISTEN, 2007).

Os tocoferóis, assim como todos os outros vitâmeros, são capazes neutralizar EROS, sendo as formas gama e delta capazes de neutralizarem espécies reativas de nitrogênio (ZHENG et al., 2020). Suas propriedades imunológicas se concentram na regulação de citocinas inflamatórias, modulação de células imunes e amplificação da ativação de linfócitos (DAS GUPTA; SUH, 2016; LEWIS; MEYDANI; WU, 2019). No câncer a ação dos tocoferóis ainda é paradoxal. Alguns estudos mostram efeitos benéficos e outros que sugerem efeitos inertes ou maléficos (JIANG et al., 2022; THOMPSON; COONEY, 2020; YANG et al., 2020).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo estudar se a suplementação com um mix de tocoferóis, tem algum tipo de desfecho positivo no contexto oncológico e quais as possíveis mecanismos imunológicos para esse fenômeno.

2. Matérias e métodos

2.1 Reagentes e soluções

Os tocoferóis utilizados no experimento foram disponibilizados pela empresa Sigma-Aldrich (EUA). A mistura oleosa contém uma proporção de alfa (10.71%), beta (1.53%), gama (64.4%) e delta tocoferol (23.36%) na concentração de 719 mg/g, composição que se assemelha ao encontrado em castanhas e oleaginosas (LI et al., 2011). O enriquecimento da dieta dos animais com os tocoferóis foi realizado através da diluição do mix em óleo de triglicérides de cadeia média (MCT 3 Gliceril M, Athletica Clinical Series, Brasil) para potencializar sua absorção (MOURÃO et al., 2005).

A administração da solução final foi realizada através de gavagens diárias no volume de 100 µL correspondendo a uma dose de 100 mg/kg/dia, que demonstrou efeitos protetores contra ciclofosfamida em outro modelo (MAHABADY; VARZI, 2011).

2.2 Animais e desenho experimental

Camundongos da linhagem Swiss (n=28), machos, com idade aproximada de 3 meses, pesando em média $46,7 \pm 3,3$ g foram utilizados neste experimento. Os animais foram fornecidos pelo do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. O alojamento dos camundongos contava com temperatura entre 22 a 25°C, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e os animais tiveram acesso livre a ração e água, sendo o consumo mensurado a cada 4 dias.

Os camundongos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais (n=7) sendo estes: Grupo controle (NC) que recebeu por via oral (v.o.) apenas veículo, constituído de triglicérides de cadeia média por 15 dias; Grupo suplementação pós-tumor (TS), tratado com mix de tocoferóis na dose de 100mg/Kg, v.o., após 2 dias do inoculo do tumor, durante 15 dias; Grupo suplementação pré e pós-tumor (CS), tratado com tocoferóis na dose de 100mg/Kg, v.o. por 14 dias antes do inoculo do tumor e por mais 16 dias após o inoculo e Grupo ciclofosfamida (PC), que recebeu doses de 25 mg/kg intraperitoneal (i.p.) após 2 dias do inoculo do tumor por 15 dias (MOTOYOSHI et al., 2006).

Para acompanhamento dos dados nutricionais parâmetros como demanda alimentar, perda de peso e porcentagem de peso perdido foram utilizados. O aproveitamento alimentar foi obtido através da média do consumo de ração do dia dividida pela média do peso do grupo ($\text{Média de consumo de ração} / \text{Média do peso do grupo} = \text{aproveitamento alimentar}$). A perda de peso pela diferença entre o peso inicial versus o peso final ($\text{Peso inicial} - \text{Peso final} = \text{Perda de peso}$). Já a quantificação em porcentagem da massa corporal perdida foi calculada usando a seguinte formula: $(\text{Perda de peso} / \text{Peso inicial}) * 100$.

O tumor de Ehrlich usado neste experimento foi mantido em camundongos swiss machos através da inoculação via i.p. de 2×10^6 células tumores. Para obtenção das células para o experimento, animais contendo a forma ascítica do tumor foram eutanasiados com dose letal de anestésico (cloridrato de quetamina [ceva] e cloridrato de xilazina [Agener união] 300/30 mg/Kg) por via intramuscular. Após eutanásia, uma agulha de 18G (1,20 x 40 mm) foi introduzida no peritônio do animal contendo o tumor e o líquido aspirado.

A ascite obtida foi centrifugada a 200g por 10 minutos a 4°C para separação das células. O botão celular foi ressuspensão com PBS e as células obtidas coradas com

azul de tripan (0.04%) e contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Após a contagem as células foram ajustadas para a concentração de 1×10^7 células/mL. Foram administrados 50 μ L da suspensão no coxim plantar da pata traseira direita dos animais para promover a forma sólida do tumor (Dagli et al., 1992).

A evolução do crescimento tumoral foi medida através do acompanhamento do volume da pata com o tumor de Ehrlich. Isso foi feito pela mensuração direta do volume através de um pletismômetro (Digital Plethysmometer Le 7500, Panlab), sendo a medida realizada a cada 3 dias (GAUTAM et al., 2009). O dado final utilizado foi a diferença do volume das patas (Delta), obtido pela subtração do volume da pata sem tumor de cada animal pelo volume obtido no 17º dia do experimento.

Para obtenção do sangue, os animais foram submetidos a anestesia profunda como descrito anteriormente, e a sangria realizada pelo plexo retro-orbital. O sangue obtido foi separado em microtubos sem anticoagulante para obtenção do soro e com 5 μ L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para aferição dos parâmetros hematológicos.

Os tubos com anticoagulante foram incubados por 1 hora e posteriormente centrifugação a 900g por 10 minutos a 20°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). O sangue fresco foi analisado por um analisador hematológico automatizado veterinário sysmex poch-100iv Diff (Sysmex, USA) para obtenção dos parâmetros hematológicos conforme previamente descrito (RODRIGUES et al., 2013). As variáveis analisadas foram: contagem de leucócitos; neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e plasma.

O baço, o linfonodo poplíteo direito, fêmur esquerdo e pata direita dos animais foram retirados e analisados. O tumor retirado da pata traseira direita foi pesado em balança analítica (M214Ai 210g x 0,0001g, BEL Engineering). O baço, macerado e hemolisado (10 mM de Tris HCl pH 7,6, 5mM de $MgCl_2$ e 10 mM de NaCl) em ambiente estéril. As células obtidas deste processo foram centrifugadas a 200g por 10 minutos a 4°C e ressuspensos em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

A viabilidade e concentração celular dessa mistura foi mensurada com Azul de Tripan (0.04%). O linfonodo poplíteo foi desagregado e suas células coradas com cristal violeta (0,1%). A medula óssea presente no fêmur esquerdo foi lavada com 1 mL de PBS gelado para remoção das células, e estas foram coradas com cristal violeta

(0,1%). A mensuração da concentração celular de todos os órgãos foi realizada em câmara de Neubauer.

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão (parecer 23115.012986/2015-63).

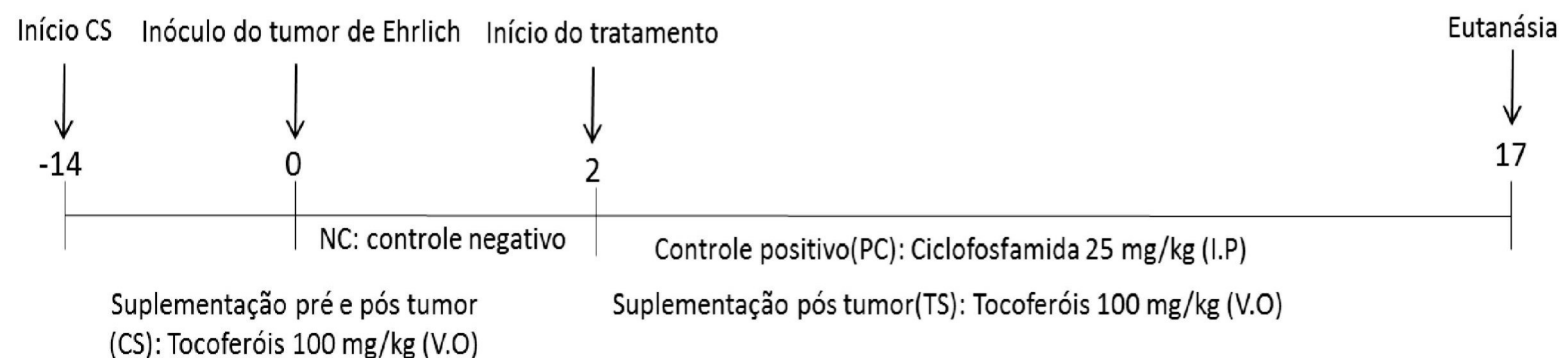


Figura 13. Ilustração do desenho experimental. Suplementação terapêutica e continua com mix de tocoferóis (dose 100 mg/kg) e tratamento com ciclofosfamida (25mg/kg) em modelo murino de tumor sólido de Ehrlich. A suplementação do grupo terapêutico só foi iniciada

2.3 Obtenção das células do microambiente tumoral

As patas contendo o tumor sólido foram processadas em fluxo laminar e esterilizadas brevemente em álcool 70% por 1 segundo. A massa tumoral foi desagregada em pedaços menores e seus fragmentos transferidos para um tubo cônico contendo 3 mL de meio RPMI1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,5 mg/mL de colagenase tipo I (Sigma-Aldrich). Esses tubos foram submetidos a aquecimento em banho-maria (314-3DN, Nova ética) a 37°C por 120 minutos (GRANGE et al., 2011).

As células obtidas desse processo foram centrifugadas a 290g por 10 minutos. O botão celular foi ressuspensão por meio RPMI suplementado com 10% SFB (Cultilab). A viabilidade e concentração das células foram obtidas pela marcação com azul de tripan (0.04%) e contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A celularidade foi ajustada conforme a necessidade dos experimentos subsequentes.

2.4 Cultura de células, dosagem de óxido nítrico e citocinas

As citocinas e o NO produzidos pelas células foram analisadas pelo plaqueamento na concentração de 2×10^6 células/mL de células do baço e 1×10^6 células/mL de células obtidas do tumor, em 200 μ L de meio RPMI em placas de 96 poços. Para realizar o estímulo da produção de NO pelas células foi utilizado lipopolissacarídeos (LPS) na concentração de 1mg/mL. Essas culturas foram incubadas por 48 horas em estufa de CO₂ a 5% (Thermo Scientific, USA).

Parte dos sobrenadantes foram utilizados para a mensuração da produção de óxido nítrico (NO) através da reação do reagente de Griess (sulfanilamida à 1% e N-(1-naftil) etilenodiaminadihidrocloridrato à 0,1% em ácido fosfórico à 2,5%) que oxida o NO em nitrito. Esse produto é passível de ser quantificado por modificações colorimétricas por espectrofotometria. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 50 μ L das amostras e posteriormente 50 μ L do reagente de Griess.

Para a quantificação em micromolar (μ M) de nitrito, uma curva padrão foi produzida utilizando nitrito de sódio nas concentrações de 5, 10, 30 e 60 μ M. Estas concentrações serviram como base para a produção de uma curva de calibração que permitiu inferir a quantidade de NO produzido através da conversão da absorbância de cada poço. Após 10 minutos de incubação ao abrigo da luz os poços foram lidos em um espectrofotômetro (Spectramax Plus 384, Molecular Devices) no comprimento de onda de 540 nm (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001).

O restante dos sobrenadantes das culturas foi utilizada para mensuração das citocinas através de citometria de fluxo, com o uso do CBA mouse inflammation Cytokine Kit (BD Cytometric Bead Array, San Jose, CA, USA) conforme as recomendações do fabricante. Neste kit são analisadas as seguintes substâncias: Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP-1), Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12p70 (IL-12) e interleucina 10 (IL-10).

De forma resumida, foi utilizado 25 μ L da solução de beads foram plaqueadas em uma placa de 96 poços juntamente com 25 μ L das amostras e 25 μ L do anticorpo de detecção conjugado com ficoeritrina (PE). A reação foi encubada em temperatura ambiente 2 horas. Após este tempo os poços foram lavados com wash buffer e as beads ressuspendidas no mesmo tampão. A leitura das amostras foi feita no FACSCalibu (BD, USA). Todos os dados obtidos foram quantificados no software FCAP ARRAY

Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina. A razão entre IL-12 e IFN- γ foi feita através da divisão dos valores obtidos de cada citocina individualmente por camundongo de forma pareada.

2.5 Fenotipagem

Para a realização da imunofenotipagem das diferentes populações celulares de interesse foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo U 1×10^5 células do baço. Estas foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas por 5 min, a 200g e 4°C. As células foram marcadas com anticorpos específicos para os marcadores de interesse na proporção de 1 μ L de anticorpo para 1×10^6 células em 100 μ L de tampão de citometria (PBS suplementado com 0,5% de soro albumina bovina e 0,02% de azida sódica).

A placa foi incubada por 20 min a 4°C ao abrigo da luz. As células foram lavadas 2 vezes (5 min, 200g, 4°C) com 200 μ L de tampão para citometria e ressuspensas em 200 μ L de tampão para citometria e analisadas no citômetro Guava easyCyte HT system (Merck, Alemanha). Como estratégia de análise, as populações principais foram inicialmente discriminadas por parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) seguidas da delimitação das populações alvo pela utilização de um marcador populacional comum, como CD3 para linfócitos e CD14 para macrófagos.

Posteriormente, subpopulações de linfócitos T helpers (CD3, CD4), linfócitos T helpers ativados (CD3, CD4, CD28), linfócitos T citotóxicos (CD3, CD8), linfócitos T citotóxicos ativados (CD3, CD8, CD28), macrófagos (CD14), macrófagos ativados (CD14, CD86) e células assassinas naturais ativadas (NK1.1, CD86) foram analisadas.

2.6 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi acessada através do teste de Shapiro-Wilk e posteriormente, dependendo do resultado obtido, através do emprego da análise de variância (ANOVA) one-way seguida do Teste Tukey-Kramer ou Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns e o Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Em todas as análises foram consideradas como significante $p < 0,05$. Para otimização dos resultados o teste de Grubbs foi utilizado para detectar valores com

potencial de perturbar a normalidade e distribuição dos dados. Os resultados encontrados foram reportados através da média $\pm$ desvio padrão.

3.Resultados

3.1 A suplementação com o mix de tocoferóis de forma terapêutica é capaz de melhorar os parâmetros nutricionais em camundongos com tumor solido de Erlich

O grupo TS apresentou o maior peso ao final do experimento ($48,8 \pm 2,2$ g), sendo este estatisticamente diferente do grupo PC ($44,33 \pm 1,633$ g), como demonstrado na figura 14. O consumo de ração ($217,7 \pm 33,5$ g) e aproveitamento alimentar ($4,5 \pm 0,6$ g) também foi estatisticamente mais elevado nesse grupo (Figura 14.A e B).

O grupo tratado com quimioterápico (PC) apresentou o menor peso ($44,3 \pm 1,6$ g) e a maior perda de massa corporal ($-8,387 \pm 3,214$ g), enquanto que o grupo TS apresentou um ganho de massa ($2,2 \pm 3,0$ g).

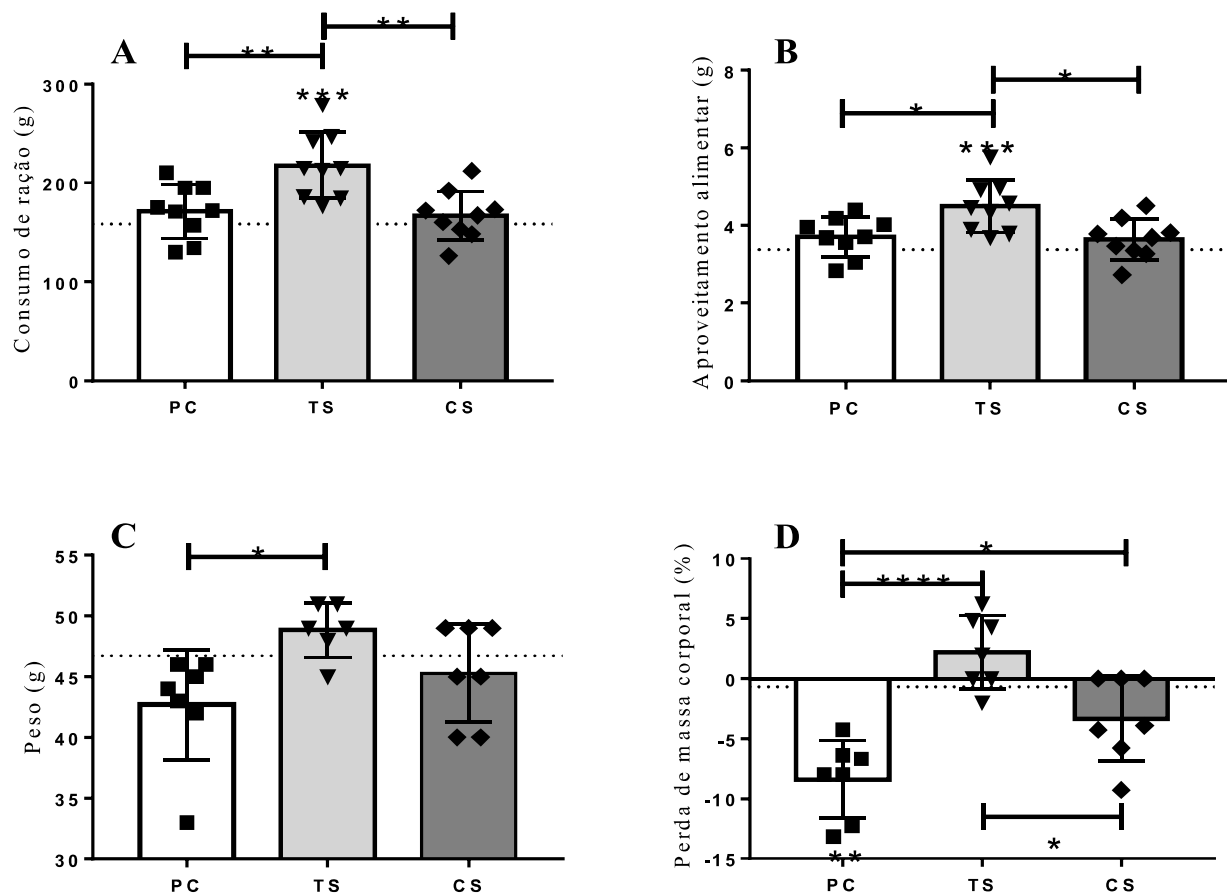


Figura 14. A suplementação com o mix de tocoferóis de forma terapêutica é capaz de melhorar os parâmetros nutricionais em camundongos com tumor sólido de Erlich. Os gráficos são representações do consumo de ração (A), ingestão de alimento (B) peso dos animais ao final do experimento (C) e perda de massa corporal ocorrida durante o tratamento em porcentagem (D). A mensuração dos parâmetros analisados foi feita de 4 em 4 dias, sendo os dados representados como média $\pm$ desvio padrão ($N^{\circ}=7$). Para a comparação dos grupos foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou Kruskal-Wallis test, seguido do pós-teste de Dunn's (distribuição fora da normalidade), sendo considerado um valor significativo de $p \leq 0.05$. * quando $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ e **** o $p \leq 0.0001$. A linha tracejada representa a média referente ao grupo controle negativo (NC). Quando o * não estiver associado a uma barra sua comparação se refere ao grupo NC. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pré e pós-tumor (CS).

3.2 A suplementação com tocoferóis melhora os parâmetros hematológicos de forma independentemente do tempo

A utilização do mix de tocoferóis nos grupos TS e TC foi capaz de aumentar os elementos figurados no sangue de camundongos com tumor sólido de Erlich (Tabela 1). Esse aumento ocorre tanto em relação ao grupo NC, quanto em relação ao grupo PC. Apesar de não apresentarem diferença estatística, é possível observar uma tendência de valores mais elevados no grupo TS.

No grupo TS pode-se destacar o aumento de leucócitos ($5383,3 \pm 1595,5$ células/mm³), linfócitos ($3399,1 \pm 921,9$ células/mm³) e eritrócitos ($10,1 \pm 0,3$ milhões/mm³). Como esperado, o grupo tratado com ciclofosfamida, um potente quimioterápico, demonstrou, em geral, os menores valores de elementos figurados, com exceção do número de plaquetas ($2556,0 \pm 614,2$ células/mm³).

Tabela 1. Modificações causadas pela suplementação com o mix de tocoferóis no padrão hematológico de camundongos com tumor sólido de Erlich.

Parâmetros	NC	PC	TS	CS	Unidade
Leucócitos	1671,4 $\pm$ 1286,7	685,7 $\pm$ 348,4	5383,3 $\pm$ 1595,5 ^{ab}	4171,4 $\pm$ 1081,3 ^{ab}	(Célula/mm ³)
Neutrófilos segmentados	517,0 $\pm$ 469,8	225,8 $\pm$ 135,2	1738,5 $\pm$ 715,5 ^{ab}	1246,1 $\pm$ 419,4 ^b	(Célula/mm ³)
Linfócitos	1077,5 $\pm$ 833,2	434,5 $\pm$ 206,3	3399,1 $\pm$ 921,9 ^{ab}	2889,8 $\pm$ 702,3 ^{ab}	(Célula/mm ³)
Monócitos	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	(Célula/mm ³)
Eosinófilos	76,8 $\pm$ 60,9	25,2 $\pm$ 16,4	245,6 $\pm$ 144,8 ^{ab}	210,2 $\pm$ 111,5 ^{ab}	(Célula/mm ³)
Eritrócitos	8,157 $\pm$ 1,913	7,5 $\pm$ 0,3	10,1 $\pm$ 0,3 ^{ab}	10,0 $\pm$ 0,4 ^{ab}	Milhões/mm ³
Hemoglobina	10,6 $\pm$ 2,3	9,6 $\pm$ 0,4	13,3 $\pm$ 0,3 ^{ab}	12,8 $\pm$ 0,6 ^{ab}	g/dL
Hematócrito	40,1 $\pm$ 9,0	36,1 $\pm$ 1,3	49,7 $\pm$ 1,6 ^{ab}	48,8 $\pm$ 2,1 ^b	%
Plaquetas	702,7 $\pm$ 721,8	2556,0 $\pm$ 614,2 ^a	1914,2 $\pm$ 194,8 ^a	1766,7 $\pm$ 218,7 ^a	Célula/mm ³
Proteínas do plasma	5,1 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,1	g/L

Nota: Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=7). Para a comparação dos grupos foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou Kruskal-Wallis test, seguido do pós-teste de Dunn's (distribuição fora da normalidade), sendo considerado um valor significativo de $p \leq 0.05$. O símbolo a foi usado quando houver diferença estatística em relação ao grupo NC, b em relação a PC, c em relação a TS e d em relação a CS. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pré e pós-tumor (CS).

3.3 A suplementação com o mix de tocoferóis pré e pós-tumoral favorece o desenvolvimento do tumor

O peso da pata com tumor ($0,6 \pm 0,1$ g) e o número de células obtidas do microambiente tumoral ($162,3 \pm 88,7 \times 10^4$ células) foram maiores no grupo CS, como pode ser visto na Figura 15 (A e B). O grupo PC apresentou o menor número de células presentes no tumor ($18,1 \pm 17,9 \times 10^4$ células).

A evolução do volume da pata ao longo do tempo demonstrou que o grupo CS começou a divergir dos outros ainda no 14º dia (Figura 15. C). Os fatores tempo (45,51%, $<0,0001$), tratamento (7,52%, $p=0,0012$) e a interação entre as duas variáveis (24,62, $p<0,0001$) foram responsáveis pela variação observada. O grupo com menor volume foi o CP ($0,2 \pm 0,02$ mL).

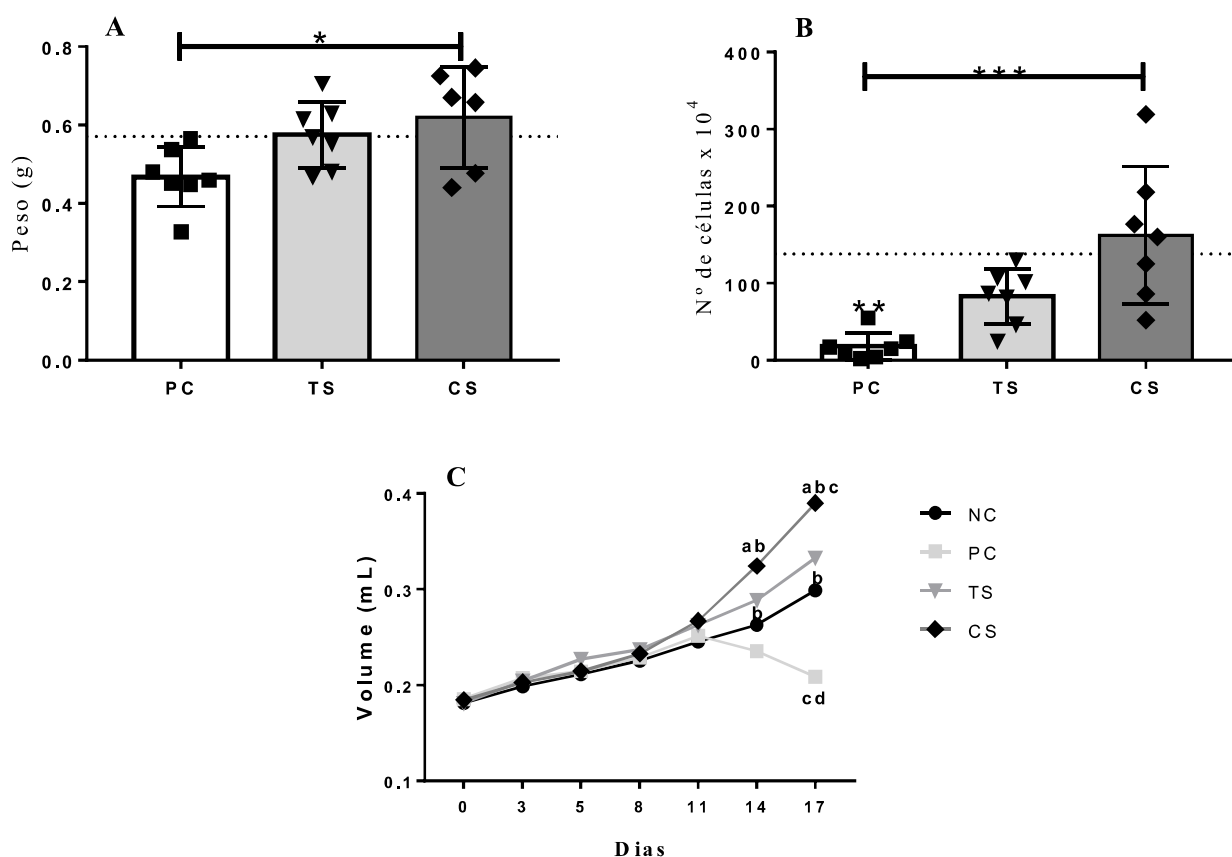


Figura 15. A suplementação com o mix de tocoferóis de forma continuada acelera o desenvolvimento do tumor sólido de Erlich. Os gráficos são representações do peso da pata contendo o tumor (A) número de células contidas na pata após a digestão enzimática (B) e aumento do volume da pata inoculada com o tumor ao longo do tempo (C). A mensuração dos parâmetros analisados foi feita de 4 em 4 dias, utilizando uma balança

(a), contador hematológico (b) ou Pletismômetro (c), sendo os dados representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=7$). Para a comparação dos grupos foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou Kruskal-Wallis test, seguido do pós-teste de Dunn's (distribuição fora da normalidade), sendo considerado um valor significativo de $p \leq 0.05$. * quando $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ e **** o $p \leq 0.0001$. A linha tracejada representa a média referente ao grupo controle negativo (NC). Quando o * não estiver associado a uma barra sua comparação se refere ao grupo NC. O símbolo a foi usado quando houver diferença estatística em relação ao grupo NC, b em relação a PC, c em relação a TS e d em relação a CS. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pos-tumor (TS) e Grupo suplementação pre e pos-tumor (CS).

3.4 A suplementação com o mix de tocoferóis tende a modificar o perfil de citocinas no microambiente tumoral

A produção de citocinas no microambiente tumoral foi influenciada pelo uso da ciclofosfamida, em particular na produção de IL-12 ($106,7 \pm 95,6$ vs $427,3 \pm 148,7$ pg/mL) e IFN- γ ($58,13 \pm 80,7$ vs $1005,0 \pm 363,9$ pg/mL) quando comparada com o grupo NC (Tabela 2). Apesar dos grupos tratados com tocoferóis não terem demonstrado diferença estatística ($p \geq 0,05$) é possível notar uma tendência no seu padrão.

Na maioria dos casos as duas posologias seguem o mesmo padrão de tendência da ciclofosfamida, diminuindo (IL-12, IFN- γ , MCP-1) ou aumentando (IL-10), as citocinas em relação ao controle. Porém, é notável que no caso das citocinas MCP-1 e IL-10 o tratamento pré e pós-tumor (CS) não foi capaz de exercer grande influência sobre sua produção, permanecendo muito próximo dos níveis achados no grupo NC ($7,3$ vs $7,2$ e $0,0$ vs $0,8$ pg/mL, respectivamente).

Tabela 2. Padrão de citocinas produzidas pelo microambiente tumoral

Grupo	IL-12	IFN- γ	MCP-1	TNF- α	IL-10	IL-12/IFN- γ	Unidade
NC	$427,3 \pm 148,7$	$1005,0 \pm 363,9$	$12,4 \pm 12,2$	$3,1 \pm 4,5$	$3,0 \pm 4,4$	$0,4 \pm 0,0$	pg/mL
PC	$106,7 \pm 95,6^a$	$58,13 \pm 80,7^a$	$0,0 \pm 0,0$	$25,7 \pm 38,1$	$35,8 \pm 49,4$	$0,4 \pm 0,6$	pg/mL
TS	$401,8 \pm 435,4$	$788,1 \pm 549,6$	$6,0 \pm 8,0$	$6,6 \pm 14,8$	$64,5 \pm 84,5$	$0,4 \pm 0,2$	pg/mL
CS	$264,3 \pm 154,1$	$12,7 \pm 28,5$	$7,6 \pm 4,3$	$12,7 \pm 28,5$	$39,2 \pm 58,6$	$0,3 \pm 0,1$	pg/mL

Nota: Os animais foram divididos em 4 grupos ($n = 5$). ANOVA de uma via foi usada para comparar os grupos, seguida do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou do teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn (distribuição não normal), onde foi considerado um valor significativo de $p \leq 0,05$. O símbolo a foi usado quando houver diferença estatística em relação ao grupo NC. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pré e pós-tumor (CS).

3.5 A suplementação com o mix de tocoferóis de forma pré e pós-tumor aumenta a celularidade dos órgãos linfoides e a produção de NO pelos esplenócitos

A suplementação com o mix de tocoferóis exerce um efeito proliferativo nos órgãos linfoides, sendo esse efeito, em geral, mais notório no grupo CS (Figura 16. A, B, C e F). De forma contrária, o grupo PC possui os níveis mais baixos de celularidade em todos os órgãos. O efeito proliferativo encontrado no grupo CS também se fez presente nas células do microambiente tumoral, sendo o maior valor encontrado, inclusive quando comparado com o grupo NC ($137,7 \pm 67,1$ vs $162,3 \pm 88,7 \times 10^4$ células).

A produção de NO pelos esplenócitos (Figura 16.D) demonstrou que o grupo CS possui uma maior capacidade de síntese espontânea e estimulada, quando comparado com o grupo NC ($p = 0,0043$). Apesar disso, o estímulo com LPS (segunda barra) não foi capaz de aumentar essa produção de forma relevante ($33,4 \pm 13,5$ vs $22,8 \pm 22,2 \mu\text{M}$). A produção de NO pelas células do microambiente tumoral não demonstram diferença entre si, aos tratamentos ou aos estímulos (Figura 16. F).

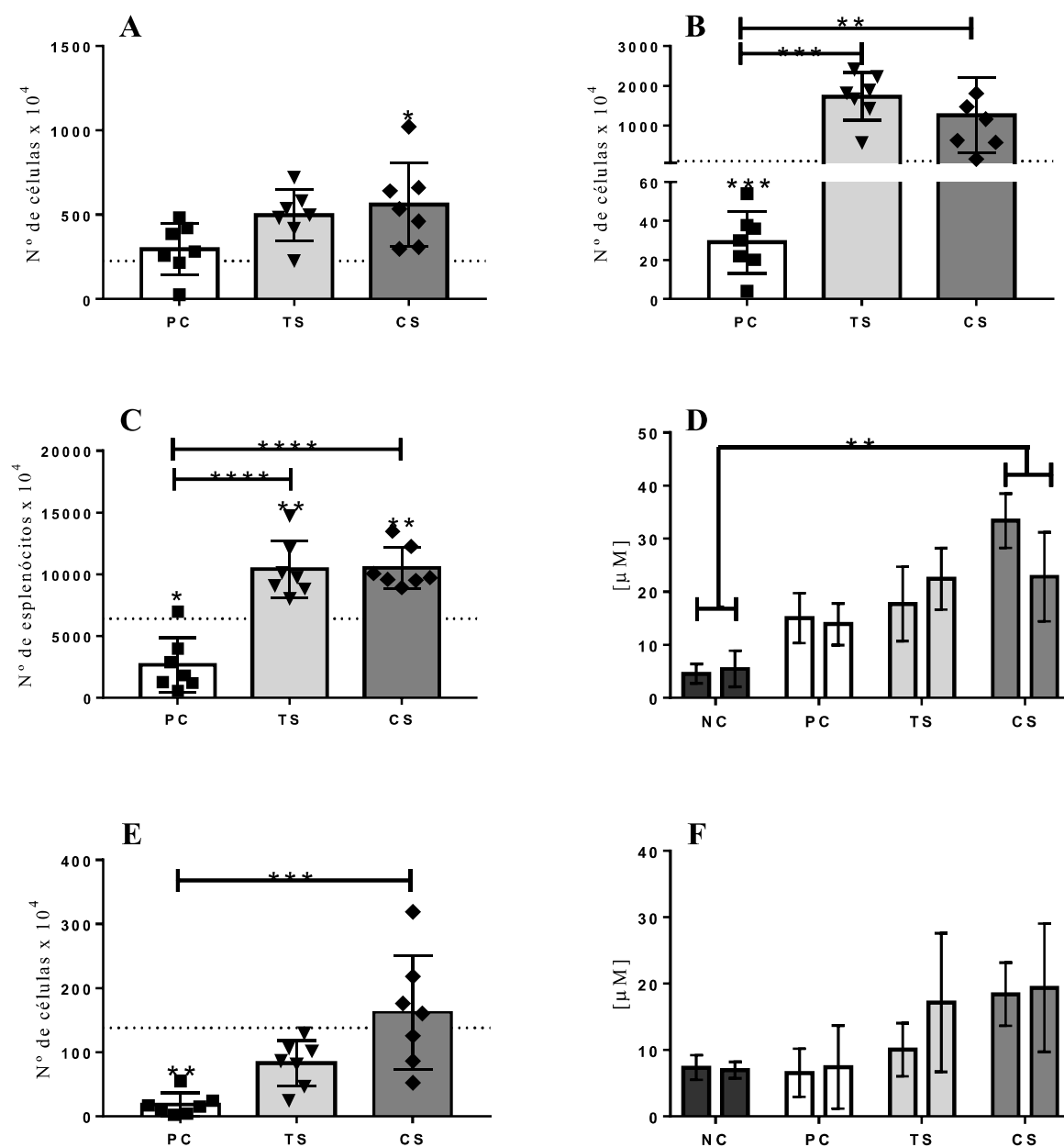


Figura 16. A suplementação com o mix de tocoferóis no grupo CS aumenta a quantidade de células presentes nos órgãos linfoides assim como a produção de óxido nítrico produzido pelos esplenócitos. Os gráficos são representações do número de células da medula (A), linfonodo poplíteo (B), baço (C), produção de óxido nítrico (NO) pelas células do baço estimuladas ou não com LPS (D), células da pata com tumor (E) e produção de NO pelas células presentes no microambiente tumoral estimuladas ou não com LPS (F). Para a comparação dos grupos (A, B, C e E) foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou Kruskal-Wallis test, seguido do pós-teste de Dunn's (distribuição fora da normalidade). Para comparação da produção de NO foi utilizado o two-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Em todos os casos foi considerado um valor significativo de $p \leq 0.05$. * quando $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ e **** $p \leq 0.0001$. A linha tracejada representa a média referente ao grupo controle negativo (NC). Quando o * não estiver associado a uma barra sua

comparação se refere ao grupo NC. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pré e pós-tumor (CS).

3.6 O padrão de ativação das células imunológicas no baço de animais com tumor sólido de Erlich não é alterado pelo uso do mix de tocoferóis

A utilização do mix de tocoferóis não alterou o padrão de ativação das células da imunidade adaptativa (Figura 17. A, B, C e D) ou inata (Figura 17. E, F, G e H). A utilização da ciclofosfamida foi capaz de aumentar a quantidade de linfócitos (CD3+) em relação ao grupo NC ($50,3 \pm 10,5$ vs $65,3 \pm 9,4$ %, dados não mostrados).

Além disso, no grupo do quimioterápico também é possível observar um aumento de linfócitos citotóxicos (CD3+CD8+) e macrófagos (CD14+) em relação aos grupos tratados com os tocoferóis. Apesar desse aumento, é importante notar que a maior parte dessas células, tanto da imunidade inata (Figura 17. F e H) quanto adaptativa (Figura 17. B e D) encontram-se negativas para os marcadores de ativação utilizados (CD28 e CD69). Essa ausência nos permite induzir que essas células tem pouco ou nenhum papel relevante no processo de eliminação do tumor.

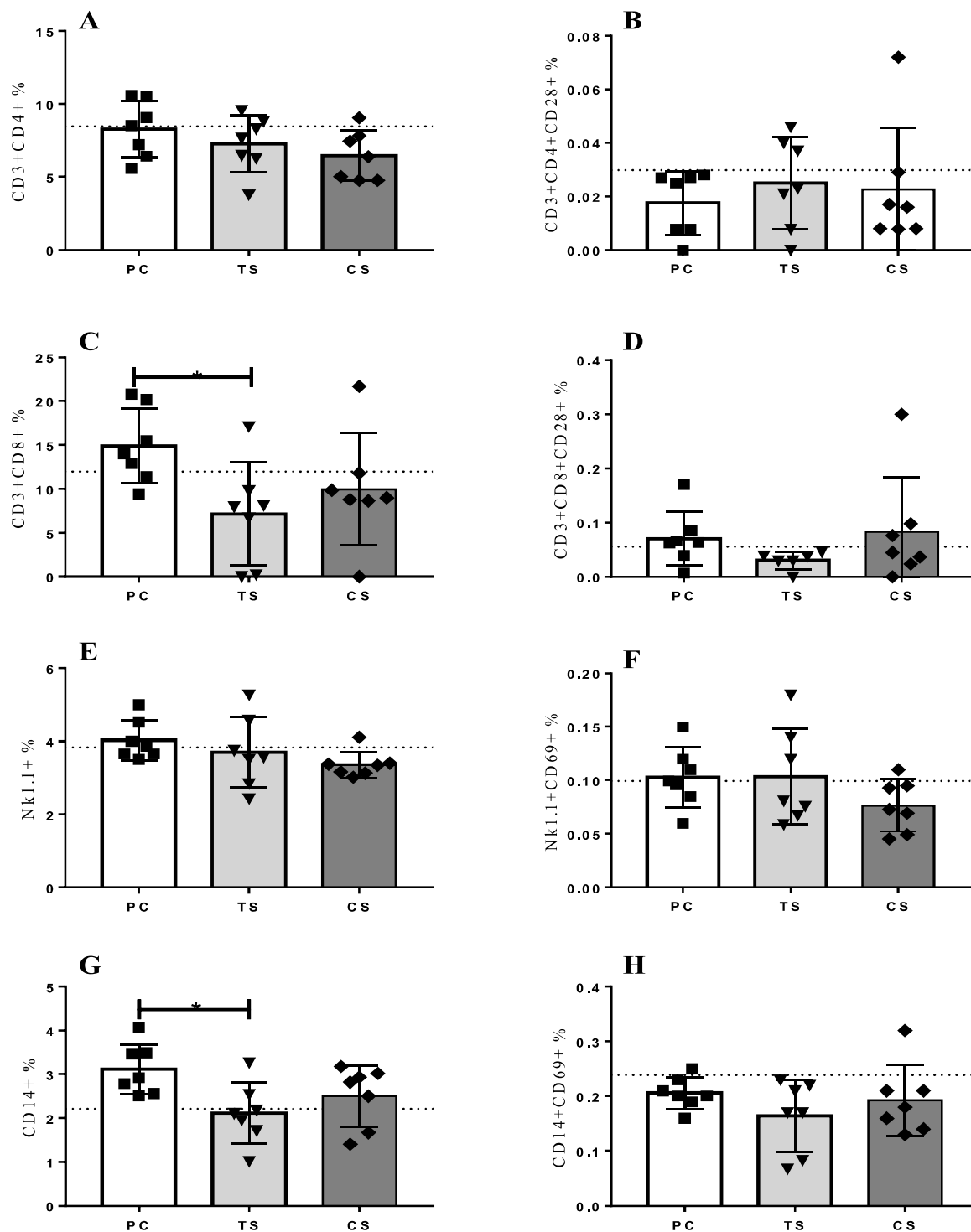


Figura 17. A suplementação com o mix de tocoferóis não altera de forma significativa o padrão de ativação das células do baço de camundongos com tumor solido de Erlich. Os gráficos são representações da frequências (%) de marcadores em populações de linfócitos auxiliares (A), linfócitos auxiliares ativados (B), linfócitos citotóxicos (C), linfócitos citotóxicos ativados (D), células assassinas naturais (E), células assassinas naturais ativadas (F), macrófagos (G) e macrófagos ativados (H). Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 7$). Para a comparação dos grupos foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey- Kramer (distribuição

normal) ou Kruskal-Wallis test, seguido do pós-teste de Dunn's (distribuição fora da normalidade), sendo considerado um valor significativo de $p \leq 0.05$. * quando $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ e **** $p \leq 0.0001$. A linha tracejada representa a média referente ao grupo controle negativo (NC). Quando o * não estiver associado a uma barra sua comparação se refere ao grupo NC. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pré e pós-tumor (CS).

4. Discussão

Nosso trabalho teve como objetivo entender como a suplementação com um mix de tocoferóis rico nos vitâmeros gama e delta afetaria os parâmetros nutricionais e imunológicos de organismos portadores de um tumor agressivo. Para isso, foi utilizado o modelo do tumor sólido de Erlich (FERNANDES et al., 2015; FRAJACOMO et al., 2016).

A suplementação com o mix de tocoferóis pós inoculação do tumor, mas não antes, foi capaz de aumentar a ingestão de alimento e a capacidade de aproveitamento do alimento ingerido. Esses fatores parecem ter contribuído para a manutenção do peso final e para menor perda de massa corporal no grupo TS. Esse fenômeno é vantajoso na medida em que um dos principais sintomas do avanço do crescimento tumoral é a ocorrência da caquexia (BARAJAS GALINDO et al., 2017).

Em um modelo de caquexia oncológica em ratos cuja dieta foi enriquecida com antioxidantes, entre eles vitamina E, a dieta foi capaz de proteger os animais da anorexia e manter o aproveitamento alimentar, sem alterar o peso final. Esse fenômeno foi atribuído a menor produção de IL-1 e peróxido de hidrogênio no sangue (MOLFINO et al., 2013). Em humanos com câncer grave, a suplementação com vitamina E e ômega 3 foi capaz de restabelecer a imunidade (razão entre linfócitos auxiliares e reguladores) e aumentar o tempo de vida dos pacientes, sem necessariamente modificar a produção de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF) no sangue (GOGOS et al., 1998).

Outro estudo em humanos com caquexia associado ao câncer com uma dieta rica em antioxidantes (entre eles vitamina E) mostrou resultados semelhantes, porém, com uma diminuição significativa de IL-6 e TNF- α , assim como ROS (MANTOVANI et al., 2004). Dessa forma especula-se que a melhora nos parâmetros nutricionais esteja relacionada ao controle do processo inflamatório nos camundongos tratados com os tocoferóis.

No grupo tratado com ciclofosfamida ocorre um agravamento da caquexia, no qual mesmo com o consumo de alimento, esse parece não ser processado de forma correta. As disfunções metabólicas no processamento da glicose pelas células tumorais, o processo inflamatório intenso e o estresse oxidativo nas células musculares são muitas vezes elencados como os principais proponentes neste processo (DA FONSECA et al., 2020).

Somado a esses fatores o tratamento quimioterápico pode levar a disrupção das células e tecidos do trato gastrointestinal, levando ou piorando a má absorção de nutrientes (ANDREYEV et al., 2014; WANG; GEIER; HOWARTH, 2016). O surgimento ou agravamento da caquexia pode ser um fator limitante para o prosseguimento da terapia oncológica, sendo este um indicativo de prognóstico desfavorável (BARAJAS GALINDO et al., 2017; DEVITA; CHU, 2008; JIMÉNEZ et al., 2011).

O efeito dos tocoferóis também foi notório no aumento da quantidade de células presentes tanto no sangue quanto nos órgãos linfoides como medula, linfonodo e baço. O uso da vitamina E como um agente amplificador da resposta imune em animais é bem descrito. Entre os principais mecanismos relacionados a essa ação estão a sua capacidade antioxidante, controle de citocinas inflamatórias, como IL-1, e aumento da contagem total de linfócitos através da produção de IL-2 (PATIL; GENDLEY; PATIL, 2021).

Experimentos *in vitro* com linfócitos humanos demonstram que a vitamina E protege os linfócitos de danos genotóxicos causados pela cisplatina (AL-EITAN et al., 2019). Além disso, estudos em camundongos tratados com ciclofosfamida apontam a capacidade da vitamina E de proteger a medula óssea de aberrações cromossômicas, os eritrócitos de danos e aumentar a divisão de células progenitoras hematopoiéticas (CHOUDHURY; JAGDALE, 2002).

Em outro modelo, o uso da vitamina E permite o aumento de unidades formadoras de precursores eritróides e acelerar a eritropoiese (FITCH; DRAKE, 1980; JILANI; IQBA, 2011). O mecanismo proposto para esse efeito é a ação estimulante deste composto e capacidade de proteger as células vermelhas de danos oxidativos e/ou outras injúrias decorrentes do processo inflamatório (GALLO, 2021; JILANI; IQBA, 2011).

Esses achados sugerem que o uso de tocoferóis possa ser vantajoso em pacientes oncológicos que sofram de distúrbios hematológicos, como a anemia

multifatorial, talvez diminuindo ou até mesmo tornam desnecessário o uso de transfusões de sangue ou uso de eritropoetina (DEBELJAK; SOLÁR; SYTKOWSKI, 2014; DICATO; PLAWNY, 2010).

Embora o efeito protetor e/ou estimulador da vitamina E sobre a série vermelha seja benéfico no quadro oncológico, a leucocitose observada deve ser tratada com cautela (QIU et al., 2010). Muitas vezes o excesso de leucócitos no sangue está associado a um prognóstico desfavorável (MABUCHI et al., 2011; MOGHADAMYEGHANEH et al., 2015).

O aumento de leucócitos pode ser um possível indicador da subversão da resposta imune pelo tumor. Muitas das células imunológicas encontradas nesse contexto estão desativadas ou apresentam comportamento biológico favorável ao crescimento tumoral (WILCOX, 2010).

Sendo assim, as células presentes no microambiente tumoral foram cultivadas e o seu perfil de citocinas analisado no intuito de identificar a possível resposta imunológica desencadeada pelos tocoferóis. Notoriamente o tratamento quimioterápico diminuiu a produção de IL-12 e IFN- γ quando comparado com o grupo NC. Além disso uma pequena produção de IL-10 também pode ser notada, embora sem diferença estatística.

A suplementação com os tocoferóis não foi capaz de diminuir de forma significativa a produção das citocinas pro-inflamatórias quando comprado com o grupo NC. Porém, é possível notar que nos grupos tratados, especialmente no grupo TS, que existe uma tendência na diminuição de IL-12, IFN- γ e MCP-1 e um aumento de IL-10. Notoriamente, no grupo CS, a produção de IL-10 é quase nula.

Especula-se que esse padrão de citocinas possa está vinculado as propriedades imunomoduladoras dos tocoferóis. Nesse contexto poderia ocorrer a ativação de leucócitos pela forma alfa e a menor produção de citocinas inflamatórias, particularmente as ligadas a resposta Th2, pelas forma game e delta (ABRAHAM et al., 2019; JIANG et al., 2022).

Para que a ativação da resposta Th1 não seja danosa ao organismo a produção de citocinas e outros mecanismos reguladores deve ocorrer. A IL-10 é uma das mais potentes reguladoras da reposta inflamatória, tendo papel imunossupressor principalmente sobre linfócitos Th1 e macrófagos, impedindo sua ativação e produção de moléculas ativas (SABAT, 2010). No contexto do câncer, a presença de IL-10, em

linhas gerais é associado a um prognóstico desfavorável devido ao seu efeito sobre o padrão Th1 (STANILOV et al., 2010; ZHAO et al., 2015).

Apesar disso, a IL-10 é produzida pelas próprias células Th1 como uma forma de autorregulação, impedindo eventos autoimunes e imunopatologias associados a produção excessiva de citocinas como IFN- γ e IL-12 (COPE et al., 2011). No contexto do câncer a ausência de IL-10 bloqueia processos fundamentais da vigilância imunológica, impedindo a resposta efetiva contra o tumor (MUMM et al., 2011).

Dessa forma o padrão de citocinas encontrados no grupo NC parecem denotar uma resposta imune descontrolada, devido aos altos níveis de IL-12, IFN- γ e MCP-1 além da quase ausência de IL-10. Sendo isso favorável ao tumor de Erlich, uma vez que seu crescimento é dependente da inflamação (FERNANDES et al., 2015).

O processo inflamatório pode ter contribuído para o crescimento tumoral observado no grupo CS. Nele a produção de IL-10 não ocorreu como no grupo TS. Essa ausência da citocina reguladora parece está diretamente ligado a produção espontânea de NO neste grupo, uma importante molécula da resposta inflamatória (TRIPATHI et al., 2007).

Sabe-se que em tumores sólidos o microambiente tumoral pode produzir níveis significativos de NO, cujo efeito a longo prazo é o aumento da vascularidade. Isso propicia um aumento de nutrientes para o tumor além de diminuir a efetividade do sistema imune em destruir as células tumorais (DOI et al., 1996; MAEDA et al., 2003; MIJATOVIĆ et al., 2020).

A incapacidade das células de produzirem mais NO quando estimuladas é a não produção desta molécula pelas células do microambiente tumoral parecem denotar um processo de exaustão imunológica. Esse padrão assemelha-se ao encontrado em células senescentes (PAWELEC et al., 2020). Mesmo ocorrendo uma produção substancial de citocinas inflamatórias nesses grupos, o padrão de resposta parece ter sido perdido, levando a uma ativação não resolutive, semelhante a encontrada em processos crônicos (PHILIP; SCHIETINGER, 2019).

Essa resposta imune desregulada parece repercutir na ativação das células imunes presentes no baço destes animais, que não foram marcadamente diferentes. Esse fenômeno talvez seja uma indicação que as propriedades imunoestimulantes e proliferativas dos tocoferóis não foram capazes de alterar, com a intensidade necessária, os efeitos moduladores causados pelo desenvolvimento do tumor (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

No grupo CP, podemos notar uma modificação tanto das citocinas, quanto da resposta celular. Sendo esta última denotada pelo maior percentual de células CD3, CD8 e CD14. Isso pode ter ocorrido devido a capacidade da ciclofosfamida de eliminar as células tumorais e de desconstruir a resposta imune enviesada pelo tumor através da eliminação de células imunes (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; WADA et al., 2009).

O aumento de TNF- α e IL-10 no grupo PC parecem ser indicadores desse processo. Apesar disso, a falta de moléculas de ativação em todas essas populações celulares parece denotar uma resposta pós tumor pouco efetiva ou a destruição de uma memória imunológica.

De forma geral a suplementação com os tocoferóis pós o estabelecimento do tumor teve um efeito positivo nos índices hematológicos e padrões nutricionais. Esses efeitos poderiam contornar dois dos sintomas do câncer; a anemia e a anorexia/caquexia. Apesar disso, a suplementação não foi capaz de mudar de forma consistente o padrão de citocinas e a ativação celular nos grupos tratados.

Especula-se que um maior número amostral permitiria um melhor entendimento do padrão imunológico ou sua confirmação estatística, uma vez que a variação na produção de citocinas foi alta. Além disso, o estudo do padrão de resposta no microambiente tumoral talvez permitisse uma melhor compressão da resposta celular desencadeada pelos tratamentos.

5. Conclusão

A partir desses dados é possível concluir que, apesar dos efeitos sobre as células imunes e os padrões de citocinas produzidos pelo tumor, os tocoferóis não foram capazes de modificar o padrão imunológico desencadeado pelo desenvolvimento tumoral ou o seu crescimento. Isso denota que a utilização dessas substâncias como antineoplásicos é limitada ou então inexistente no modelo estudado.

Apesar disso, a suplementação terapêutica foi capaz de melhorar parâmetros nutricionais e hematológicos, tendo talvez uma possível utilização em pacientes com tumores controlados por tratamentos farmacológicos, como quimioterapia, que tenham anemia e leucopenia como efeitos adversos intenso.

5. Capítulo três

Título: Suplementação adjuvante de tocoferóis na quimioterapia da ciclofosfamida induz à imunomodulação Th1

Resumo

Apesar do câncer ser uma das doenças mais prevalentes e com grande mortalidade associada na população humana, os tratamentos oncológicos ainda possuem uma efetividade baixa. Além disso, os efeitos colaterais de sua aplicação podem ser um obstáculo a continuação do tratamento antitumoral. Desta forma este estudo teve como objetivo analisar os efeitos da suplementação de tocoferóis na quimioterapia com ciclofosfamida. Para isso, foi realizado ensaios *in vitro* de viabilidade celular, teste de formação de colônias e a migração celular, e *in vivo* em modelo animal com camundongos Swiss, induzidos ao tumor sólido de Erlich. Os grupos experimentais (n=7/grupo) foram: Grupo controle (NC), que recebeu por via oral (v.o.) o veículo de triglicérides de cadeia média por 15 dias; Grupo ciclofosfamida (PC), que recebeu a dose de 25 mg/kg intraperitoneal (i.p.) após 2 dias do inoculo do tumor por 15 dias; Grupo suplementado com tocoferóis e tratado ciclofosfamida (TSC), recebeu o mix de tocoferóis (100mg/Kg, v.o.) e tratado ciclofosfamida (25 mg/kg, i.p.) ambos administrados após 2 dias do inoculo do tumor, durante 15 dias; e Grupo suplementado sem quimioterápico (TS), tratado com mix de tocoferóis na dose de 100mg/Kg, v.o., após 2 dias do inoculo do tumor, durante 15 dias. Os parâmetros analisados ao longo e ao fim do experimento foram: Dados nutricionais (peso, consumo alimentar e perda de massa corporal); volume do tumor, para avaliação do crescimento tumoral; dados hematológicos (quantificação da série vermelha e branca); fenotipagem das células imunes para populações de linfócitos, macrófagos e células NK e produção de citocinas (MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL12 e IL10). No ensaio *in vitro* com células tumorais o tratamento com os tocoferóis não afetou a viabilidade, proliferação e migração. Entretanto, houve pequena redução da capacidade de invasão e a caracterização do citoesqueleto, sugerindo uma interação com componentes da membrana, em particular a actina e a tubulina. No ensaio *in vivo*, o tratamento com ciclofosfamida isolada (CP) levou a caquexia, redução dos parâmetros hematológicos e aumento sistêmico da IL-6. Todos esses efeitos adversos da quimioterapia são parcialmente revertidos pela suplementação adjuvante com tocoferóis. Além disso, os grupos PC e TSC não divergiram em relação à controle do crescimento tumoral ($0,2086 \pm 0,0234$ mL vs $0,2129 \pm 0,03861$ mL), sugerindo que o uso adjuvante dos tocoferóis não interfere na ação do quimioterápico. Por outro lado, o padrão de resposta imune apresentado pelo grupo TSC é único, demonstrando uma melhora significativa na ativação de linfócitos citotóxicos (CD3; CD8; CD69), macrófagos (CD14; CD69) e células natural killer (NK 1.1; CD86) no baço dos animais, quando comparado aos outros grupos. Essa resposta parece ser parcialmente explicada pelo balanço de citocinas no microambiente tumoral, entre elas IL-12, IFN- γ e IL-10. Esses achados sugerem que os efeitos diretos dos tocoferóis nas células cancerígenas são pequenos, mas quando no contexto orgânico, sua presença dos tocoferóis pode modular a reiniciação imunológica causada pela ciclofosfamida induzindo uma resposta Th1, sendo favorável ao hospedeiro e proporcionando menos resistência do tumor a quimioterapia.

Palavras-chave: Tumor de Erlich; Vitamina E; Qualidade de vida; Imunoedição

1.Introdução

Câncer é um padrão biológico determinado por uma variedade de processos complexos e interativos. Apesar dessa grande diversidade, as diferentes patologias que resultam no seu desencadeamento estão relacionadas ao descontrole do ciclo celular (WHO, 2021). Essa heterogeneidade é responsável pela grande incidência e mortalidade relacionada a esse processo biológico, cujos números chegaram a 19 milhões e 10 milhões, respectivamente, em 2020 (IARC, 2020).

Para lidar com um processo tão dinâmico e variável, os tratamentos para o câncer também precisam ser igualmente diversos. Em tumores agressivos, processos cirúrgicos para remoção das células malignas se faz necessário juntamente com uso de quimioterápicos para garantir a eliminação de possíveis remanentes celulares (MORGAN; FULLERTON; BEDI, 2021). Apesar do grande avanço na área oncológica, a maioria dos agentes antineoplásicos ainda apresentam efeitos adversos importantes, como por exemplo anorexia e leucopenia (DICKENS; AHMED, 2018). Dessa forma, terapias que possa reduzir estes efeitos parecem ter uso promissor na incorporação aos tratamentos atuais (HU; LI, 2020; LIN et al., 2020; SERNATHOME et al., 2018).

Um dos maiores exemplos de quimioterápico já produzidos é a ciclofosfamida, um agente nitrogênico do grupo das oxazoforinas (POVIRK; SHUKER, 1994). Sua síntese química se deu com a substituição do anel oxazafosforina pelo grupo metil da mostrada de nitrogênio com o objetivo de se criar uma pró-droga com propriedades alquilantes (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010). Por se tratar de um agente alquilante, os metabolitos da ciclofosfamida causam ligações entre as fitas do DNA impedindo sua dinâmica de fechamento e abertura, o que culmina com a parada do ciclo celular, e em apoptose (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009).

Apesar do seu largo uso, preço acessível e relativa seletividade, o uso da ciclofosfamida apresenta um série de efeitos colaterais, incluindo náusea profunda, supressão medular seguida de ressurgimento de infecções latentes (DROZ et al., 2013) e cistite hemorrágica causada pelo acúmulo de acroleína, um subproduto do metabolismo da ciclofosfamida (MEOTTI et al., 2013). Apesar disso, estudos recentes têm demonstrado uma interessante capacidade imunomoduladora dessa droga devido a sua ação sobre células e processos de relacionados ao escape tumoral, em particular

supressão de células reguladoras como células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas de mieloide (AHLMANN; HEMPEL, 2016).

Para que ocorra uma modulação efetiva frente ao tumor, uma resposta celular resolutive deve ocorrer, seja pela ativação ótima da imunidade adaptativa seja pela restauração da função das células inatas (KOCH et al., 2013; SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Nesse contexto resposta relacionado com um subtipo específico de linfócitos helps, denominada resposta Th1 capaz de destruir as células cancerígenas restabelecendo a homeostase é fundamental (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

A estratégia mais robusta proposta nos últimos anos vem justamente da utilização do conhecimento dos processos de imunoedição e imunomodulação propiciados durante o tratamento oncológico para favorecer não só a eliminação do tumor, como também a manutenção de uma resposta favorável frente a ele (DESAI; COXON; DUNN, 2021b).

Um possível agente imunomodulador da resposta imune é a vitamina E, que possui propriedades biológicas importantes, sendo encontrada em vários tipos de vegetais, em especial em seus óleos (A. SHETTY, 2013), sendo uma das principais reguladoras de radicais livres lipossolúveis encontradas na dieta humana (NIKI, 2014).

Esta substância subdivide-se em 02 grandes grupos, os tocoferóis (cadeia lateral saturada contendo 16 átomos de carbono) e os tocotrienóis (cadeia lateral insaturada contendo 16 átomos de carbono), cada um desses possuindo 04 (quatro) isomorfos identificadas pelos prefixos alfa, beta, gama e delta, sendo esta diferença causada pela quantidade e localidade de grupos metil que se encontram no anel aromático do tocol (JIANG, 2014).

Sua forma mais comumente encontrada é o α -tocoferol seguida do γ -tocoferol, sendo a primeira a mais economicamente importante e biodisponível (REBOUL et al., 2006). Apesar disso, óleos ricos nas formas δ e γ , como os encontrados nas nozes, gergelim e óleo de soja parecem possuir propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras mais intensas do que os óleos ricos na forma α -tocoferol (DREHER, 2012; JIANG et al., 2022; LI et al., 2011).

A ação imunomoduladora dos tocoferóis se dá de várias formas, entre elas a capacidade de inibir a ação enzimática da ciclo-oxigenase-2 (Cox-2), e por sua vez, a produção da prostaglandina E2 através da interrupção da oxidação do ácido araquidônico e através da supressão do fator nuclear kappa B (NF- κ B), e dos

transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) 6 e 3 (JIANG, 2014; REITER; JIANG; CHRISTEN, 2007).

A inativação desses fatores e enzimas leva a menor produção de citocinas pro inflamatórias, como IL-6 e IL-1 pelas células imunológicas o que pode estar relacionado à proteção contra doenças crônicas e até mesmo a desregularização imunológica causada pelo processo carcinogênico (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Em camundongos idosos uma dieta rica em vitamina E é capaz de aumentar a proliferação de linfócitos T e a sua produção de IL-2 quando comparada com uma dieta controle (MORIGUCHI, 1997). Um resultado semelhante foi achado em estudos de suplementação em humanos idosos, onde sua presença foi capaz de aumentar a proliferação de linfócitos estimulados com mitógenos, a quimiotaxia de neutrófilos e a produção de IL-2 (WU; MEYDANI, 2014).

Outro estudo encontrou o aumento da produção de anticorpos contra hepatite B e tétano estimulados com vacinas quando na presença de uma dieta suplementada com essa vitamina E, sendo esta atividade associada ao aumento da expressão e atividade de linfócitos B (MEYDANI et al., 1997).

Evidências de estudos diversos têm demonstrado que estas atividades são por vezes relacionadas a capacidade da vitamina E (em especial o vitâmero alfa tocoferol) de melhorar a chamada sinapse imunológica entre linfócitos T naive e células apresentadoras de antígenos. Essa interação feita de forma mais robusta está associada à melhora ativação e proliferação destas células frente a estímulos diversos tanto in vitro quanto in vivo em camundongos idosos (MARKO et al., 2007).

A suplementação desta molécula também foi relacionada com a maior resistência a infecções virais em humanos, correlacionada com o aumento a atividade citotóxica de linfócitos T e células NK, além da atividade fagocítica de macrófagos alveolares correspondendo assim a uma resposta Th1 (MEYDANI et al., 1997). Frente a infecções virais, a suplementação com vitamina E em camundongos idosos foi capaz de aumentar a produção de IL-2 e IFN- γ , amplificando assim uma resposta Th1 relacionada a diminuição da carga viral (HAN et al., 2000).

Dessa forma, o presente trabalho pretende estudar a associação de um mix incomum de tocoferóis com a ciclofosfamida no intuito de criar um tratamento imunomodular capaz de eliminar o tumor e que possua efeitos adversos menores.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais e reagentes

O mix de tocoferóis utilizadas no experimento foi obtida na empresa Sigma-Aldrich (EUA). Sua composição consiste de uma mistura oleosa de alfa (10.71%), beta (1.53%), gama (64.4%) e delta tocoferol (23.36%) na concentração de 719 mg/g. Essas proporções simulam as encontradas nos óleos de castanhas, gergelim e óleo de soja (DREHER, 2012; LI et al., 2011).

Para os ensaios *in vitro* a diluição do mix de tocoferóis foi feita através da adição de 10 µL da solução mãe em 990 µL de meio DMEM morno (37°C) contendo 10% de DMSO (concentração final de 950 µg/mL). As alíquotas obtidas foram armazenadas a 4 °C, protegidas da luz em frasco âmbar, conforme as orientações do fornecedor, e utilizadas ao longo dos experimentos. Diluições subsequentes foram feitas conforme a necessidade para cada ensaio, sendo a concentração de veículo ajustada conforme o necessário. Para a escolha das doses utilizamos as concentrações plasmáticas de vitamina E encontradas em humanos (6,19-12,3 µg/mL) assim como a possível concentração (36.9 µg/mL) alcançada através de uma suplementação intensa (CHAN, 1989).

A suplementação da dieta dos animais para os experimentos *in vivo* com os tocoferóis foi feita através da sua diluição em óleo de triglicérides de cadeia média (MCT 3 Gliceril M, Athletica Clinical Series, Brasil) para a obtenção de uma solução contendo os tocoferóis totais que pudesse melhorar sua absorção (MOURÃO et al., 2005). Esta solução foi administrada através de gavagens diárias no volume de 100 µL, correspondendo a uma dose de 100 mg/kg/dia (MAHABADY et al., 2011).

2.2 Cultivo celular *in vitro*

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem celular Hs578T (Carcinoma basal de mama triplo negativo, ATCC® HTB-126™). Esta célula foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (penicilina/estreptomicina) e antifúngico (anfotericina B) em uma incubadora com atmosfera contendo 5% de CO₂ e uma temperatura de 37°C.

Após a formação da monocamada com 70% de confluência foi feita a dissociação enzimática com uma solução de tripsina 0,2% + EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,02% (Sigma-Aldrich). A suspensão celular foi centrifugada a 200g por 10 minutos a 4°C. As células foram suspensas em meio de cultura livre de tripsina e corada com azul de tripan (0.04%) para contagem em câmara de Neubauer ao microscópio óptico (LEE; MOON, 2016). Subsequente a contagem, as células eram ajustadas de acordo com o experimento a ser executado.

2.3 Teste de viabilidade celular pela redução do MTT

Para avaliar a toxicidade direta do mix de tocoferóis sobre a linhagem celular Hs578T foi realizado o ensaio do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]). Para sua realização, as células Hs578T foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 3×10^4 células/mL em 100 µl de meio DMEM suplementados com 10% de SFB.

As placas foram incubadas durante 24 horas em incubadora com atmosfera contendo 5% de CO₂ e uma temperatura constante de 37°C. Após este período, o meio contido nos poços foi removido e substituído por meio de cultura suplementado com mix de tocoferóis nas doses de 3.6, 6.15, 12.3, 36.9 e 110.7 µg/mL. Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% foi utilizado como controle positivo. Após 48 horas de tratamento foi adicionado 10 µl de MTT (5 mg/ml). Após 3 horas de incubação, a reação foi finalizada com a adição de 100 µl de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS 10%) para solubilização dos cristais de formazan.

Posteriormente, a placa teve a absorbância dos poços mensuradas por um espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nanômetros (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). O índice de citotoxicidade foi obtido pela subtração do valor total (1) pela razão entre a absorbância do controle negativo (Abs controle) sobre a absorbância de cada amostra (Abs teste) multiplicada por 100 (Porcentagem de citotoxicidade = $[1 - (\text{Abs teste} / \text{Abs controle})] * 100$).

2.4 Ensaio de invasão celular com Matrigel

Para o ensaio de invasão foi usando placa transwell (Costar; Corning Life Sciences) de 12 poços com poros de 8 µm cujos insertos foram recobertos com 50 µL de Matrigel diluído em 1:1 em DMEM sem soro (cerca de 4,3 mg/ml) e incubados por

2 horas em estufa de CO₂, a 37° C. Em seguida, foram plaqueadas sobre a membrana 2x10⁴ células de Hs578T em 100 µL de DMEM sem soro e no poço inferior, foram adicionados 600 µL de meio com 10% de soro. Realizou-se o tratamento com diferentes concentrações do mix de tocoferóis (6,19 e 36,9 µg/mL) que foram adicionados junto às células. Como controle positivo (PC), foi utilizado o DMEM com 10% de SFB na câmara inferior, e como controle negativo (NC), DMEM sem soro.

Após 24 horas, o meio de cultura da câmara inferior foi aspirado e as células não invasivas na superfície superior da membrana foram removidas com uma haste flexível com ponta de algodão, e as células invasivas no lado inferior foram fixadas em formaldeído 4% em PBS por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas com PBS e corado com 0,2% de cristal violeta por 5 min (JUSTUS et al., 2014). As células foram contadas manualmente usando um microscópio (Nikon Eclipse80i; Nikon Corporation) sob ampliação de 20 × com cinco campos por amostra

2.5 Migração celular com kit Oris através de time lapse

A análise da migração na linhagem celular Hs578T foi avaliada usando o kit Oris Universal Cell Migration Assembly (Platypus Technologies, Madison, WI). Para sua realização, as células Hs578T foram semeadas em placas de 96 poços contendo o tampão Ori na concentração de 3x10⁴ células em 100 µl de meio DMEM suplementados com 10% de SFB.

Seguido o plaqueamento, as células foram incubadas durante 24 horas em incubadora com atmosfera contendo 5% de CO₂ e uma temperatura de 37°C. Após este período, o tampão foi retirado com uma haste de metal (OH; SANTY, 2010). O meio contido nos poços foi removido e substituído por meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do mix de tocoferóis (6,19 e 36,9 µg/mL).

A migração celular foi determinada pelo deslocamento das células em 50 frames de vídeos feitos com microscópio de fluorescência confocal Zeiss Lsm 700 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) em campo claro com objetiva de 20x (JOY et al., 2014). Para a mensuração dos parâmetros de migração individual, 10 células por poço tiveram sua trajetória quantificada através do plugin manual tracking contido no ImageJ (Bethesda, MD).

Com os dados obtidos, foram calculados os parâmetros de distância total (obtido pela somatória da distância percorrida), velocidade (velocidade média), distância em linha reta (calculada pelo teorema de Pitágoras, $\sqrt{(x_b - x_a)^2 + (y_b - y_a)^2}$)

e direcionalidade (calculada pela razão entre distância em linha reta e a distância total) de células individuais (PIJUAN et al., 2019).

2.6 Ensaio de formação de colônias independente de ancoragem através de soft agar

O teste de formação de colônias independente de ancoragem foi feito através da técnica de soft-agar (Sigma-Aldrich, EUA). Para a formação da camada de sustentação foi utilizado ágar 0,5% contendo DMEM sem SFB. Em uma placa de 12 poços, 1 mL da solução foi colocada em cada poço e incubadas para polimerização por 30 min em fluxo laminar. A segunda camada, contendo as células Hs578T com concentração final de 5×10^3 células em 1mL de DMEM com 10% de SFB foi suplementada com 0,3% de agar para a produção do meio independente de ancoragem.

Após 24 h de incubação em estufa de CO₂, a 37° C., foi adicionado os poços 100 µL de meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do mix de tocoferóis (6,19 e 36,9 µg/mL), diariamente, durante 10 dias. Após esse período, foram adicionados aos poços 200 µL de MTT (1 mg/mL) e incubados por 3 horas (BOROWICZ et al., 2014). Após a formação dos cristais de formazan as placas foram escaneadas e as colônias viáveis foram quantificadas de forma semiautomática através do software ImageJ (Bethesda, MD), utilizando a ferramenta análise de partículas (GRISHAGIN, 2015).

2.7 Caracterização do citoesqueleto através de Imunofluorescência

Para a realização dos ensaios de imunofluorescência, as células Hs578T foram cultivadas em placas de 24 poços, sobre lamínulas de vidro. As células foram plaqueadas na concentração de 3×10^4 células em 500uL de meio DMEM por poço e suplementado com 10% SFB. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa de CO₂, a 37° C. O meio de cultura dos poços foi substituído por 500 uL de DMEM suplementado com mix de tocoferóis na concentração de 36,9 µg/mL e a placa encubada por 48 horas. Transcorrido a incubação, as células foram lavadas e fixadas com formaldeído 4% em PBS por 30 minutos.

Em seguida foi feito o bloqueio seguido de permeabilização adicionando 500 µL de solução contendo albumina de soro bovino (BSA) 2% e saponina 0,002 em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se à incubação com o

Actina-phalloidin (Texas Red) diluição 1/100 e alfa Tubulina (FITC) diluição 1/200, diluídos na solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente. As lamínulas contendo as células coradas foram protegidas da luz para secarem durante 12 horas. A marcação do DNA foi realizada utilizando 10 µl de Vectashield (Vector, EUA) com DAPI (1 µg/mL). As lamínulas foram seladas em lâmina de microscopia com esmalte transparente de secagem instantânea (NOURREDDINE et al., 2020).

As imagens de fluorescência foram adquiridas com microscópio de fluorescência confocal Zeiss Lsm 700 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), utilizando o software Zen Black (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), com uma resolução de imagem x/y: 1024 e aumento de 100X. Para análise da intensidade de fluorescência dos três marcadores foi utilizado o software ImageJ (Bethesda, MD), utilizando a ferramenta histograma de cores para avaliar a intensidade de fluorescência média de cada célula analisada (HARTIG, 2013). Foram avaliadas 20 células por lamínula.

2.8 Animais para experimentação

Foram utilizados 28 camundongos Swiss, machos, com idade aproximada de 3 meses, pesando $46,7 \pm 3,3$ g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram mantidos em temperatura entre 22 a 25°C, fotoperíodo alternado entre claro/escuro a cada de 12 horas e tiveram acesso livre a ração e água, sendo o consumo mensurado a cada 4 dias.

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=7) sendo estes: Grupo controle (NC), que recebeu por via oral (v.o.) o veículo de triglicérides de cadeia média por 15 dias; Grupo suplementação pós-tumor (TS), tratado com mix de tocoferóis na dose de 100mg/Kg, v.o., após 2 dias do inóculo do tumor, durante 15 dias; Grupo suplementação pós tumor com ciclofosfamida (TSC), tratado com tocoferóis na dose de 100mg/Kg, v.o. e ciclofosfamida na dose de 25 mg/kg (i.p.) ambos administrados após 2 dias do inóculo do tumor, durante 15 dias e Grupo ciclofosfamida (PC), que recebeu a dose de 25 mg/kg intraperitoneal (i.p.) após 2 dias do inóculo do tumor por 15 dias (MOTOYOSHI et al., 2006).

Parâmetros nutricionais foram coletados durante toda a extensão do experimento. A perda de peso foi obtida através da diferença entre o peso no dia do inóculo do tumor versus o peso final (Peso dia 0–Peso final = Perda de peso). Para a

quantificação em porcentagem da massa corporal perdida foi utilizada a seguinte fórmula: $(\text{Perda de peso/Peso inicial}) \times 100$. A demanda alimentar foi calculada através da média do consumo de ração do dia dividida pela média do peso do grupo (Média de consumo de ração/Média do peso do grupo = aproveitamento alimentar).

O tumor de Ehrlich foi mantido em camundongos swiss machos através da inoculação via i.p. de 2×10^6 células. Após sete dias do inóculo, os animais foram eutanásias com dose letal de anestésico (cloridrato de quetamina [ceva] e cloridrato de xilazina [Agener união] 300/30 mg/Kg) por via intramuscular. Para a remoção da ascite tumoral, uma agulha de 18G (1,20 x 40 mm) foi introduzida no peritônio do animal e o líquido contido na cavidade espirado. A ascite obtida foi centrifugada a 200g por 10 minutos a 4°C para separação das células e ressuspensas em PBS.

Alíquotas da suspensão foram coradas com azul de tripan (0.04%) e contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Subsequente a contagem, as células obtidas foram ajustadas para a concentração de 1×10^7 células/mL. O inóculo do tumor sólido foi feito com 50µL da suspensão em PBS no coxim plantar da pata traseira direita dos animais (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992).

O crescimento tumoral foi mensurado através do acompanhamento do volume da pata inoculada com o tumor de Ehrlich. Para isso, o volume da pata direita foi mensurado por meio de um pletismômetro (Digital Plethysmometer Le 7500, Panlab) a cada 3 dias (GAUTAM et al., 2009). Para obtenção da diferença do volume das patas (Delta) o volume da pata sem tumor de cada animal foi descontado do volume obtido no 17º dia do experimento.

Ao fim do experimento os animais foram inoculados, de forma intramuscular, com uma dose letal de anestésico (cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina, 300/30 mg/Kg). Uma vez sobre anestesia profunda, foi realizada a coleta de sangue terminal pelo plexo retro-orbital. O sangue obtido foi dividido em microtubos sem anticoagulante, utilizado para obtenção do soro, e microtubos com 5µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para avaliação dos parâmetros hematológicos (RODRIGUES et al., 2013).

O soro foi obtido pela coagulação do sangue total por 1 hora e posterior centrifugação a 900g por 10 minutos a 20°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Os índices hematológicos foram obtidos pela aquisição de 500 microlitros de sangue pelo analisador hematológico automatizado veterinário sysmex poch-100iv Diff (Sysmex,

USA) e a dosagem de proteínas séricas pelo uso de um refratômetro veterinário (RZ CONTEC).

Após a abertura do peritônio, foi retirado o baço, o linfonodo poplíteo direito, fêmur esquerdo e pata direita dos animais. As patas foram pesadas em balança analítica (M214Ai 210g x 0,0001g, BEL Engineering) para mensuração do peso do tumor sólido. Em um fluxo laminar, o baço foi macerado e hemolisado (10 mM de Tris HCl pH 7,6, 5mM de $MgCl_2$ e 10 mM de NaCl). A suspensão celular foi centrifuga a 200g por 10 minutos a 4°C e ressuspensa em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sendo alíquotas coradas com Azul de Tripán (0.04%) para avaliação da viabilidade. O linfonodo poplíteo foi macerado e corado com cristal violeta (0,1%).

As células da medula óssea presentes no fêmur esquerdo de cada animal foi perfundido com 1 mL de PBS gelado para remoção das células, e estas foram coradas com cristal violeta (0,1%). Todas as células foram contadas em câmara de Neubauer.

Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética animal da UFMA sobre o número de protocolo: 23115.012986/2015-63.

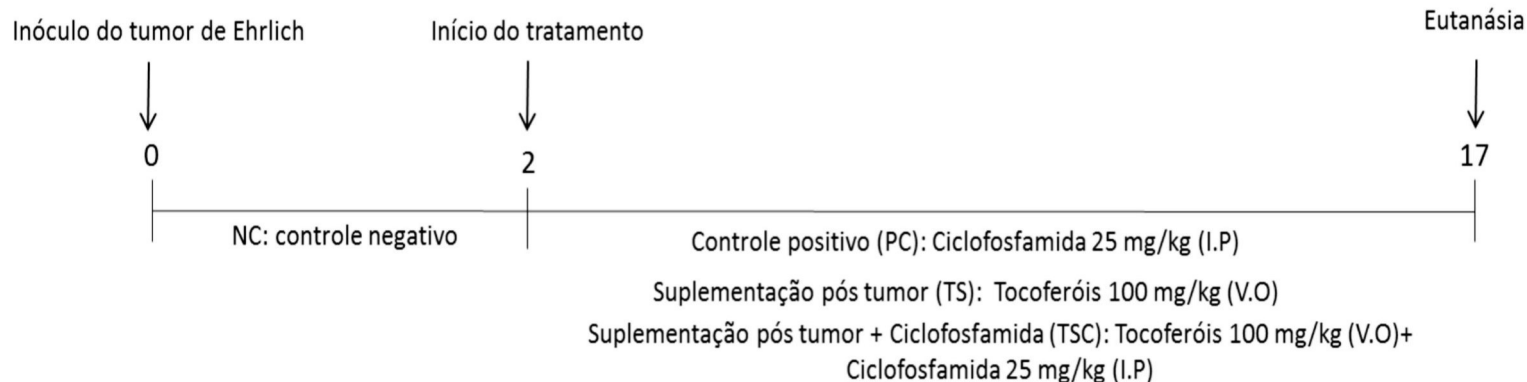


Figura 18. Ilustração do desenho experimental. Suplementação terapêutica com mix de tocoferóis (dose 100 mg/kg) e tratamento com ciclofosfamida (25mg/kg) em modelo murino de tumor sólido de Ehrlich. A suplementação do grupo terapêutico só foi iniciada no 2º dia de experimento juntamente com o tratamento com a ciclofosfamida. O controle de água e comida foi feito a cada quatro dias, assim como a pesagem dos animais. A aferição do volume da pata foi realizada a cada três dias.

2.9 Obtenção das células do microambiente tumoral

Para obtenção das células contidas no microambiente tumoral a pata direita de 5 animais por grupo foi amputada após a eutanásia. As patas foram transferidas para um fluxo laminar e mergulhada brevemente em álcool 70% por 1 segundo. Uma vez seca, as patas foram seccionadas com bisturi em pedaços pequenos sobre uma placa de petri estéril. Os fragmentos foram então transferidos para um tubo cônico com 3 mL de meio RPMI1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,5 mg/mL de collagenase tipo I (Sigma-Aldrich) e incubadas em banho-maria (314-3DN, Nova ética) a 37°C por 120 minutos para a digestão do tecido (GRANGE et al., 2011).

A suspensão celular foi centrifugada a 290g por 10 minutos. As células foram ressuspendas meio RPMI suplementado com 10% SFB (Cultilab). Alíquotas da suspensão foram coradas com cristal violeta (0,1%) e contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico para obtenção da celularidade e posterior ajustes para experimentos subsequentes.

2.10 Cultura de células do microambiente tumoral, baço e dosagem de citocinas

A suspensão de células do tecido tumoral digerido e do baço macerado foram obtidas como descrito anteriormente. Para a avaliação do perfil de citocinas produzidas pelas células do microambiente tumoral, foram plaqueadas na concentração de 2×10^6 células/mL para as células do baço e 1×10^6 células/mL para as células do tumor, em 200 μ L de meio RPMI em placas de 96 poços. As placas foram então incubadas por 48 horas em estufa de CO₂ a 5% (Thermo Scientific, USA) e os sobrenadantes retirados e congelados a -20°C para posterior análise de citocinas.

A dosagem das citocinas Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP-1), Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12p70 (IL-12) e interleucina 10 (IL-10) foram feitas através do CBA mouse inflammation Cytokine Kit (BD Cytometric Bead Array, San Jose, CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. De forma resumida, 25 μ L da mistura de beads contendo anticorpos de detecção para as citocinas citadas foram plaqueadas em uma placa de 96 poços de fundo em U juntamente com 25 μ L das amostras e 25 μ L do anticorpo de detecção conjugado com ficoeritrina (PE).

A placa foi mantida em temperatura ambiente e protegida da luz por 2 horas e posteriormente lavada com wash buffer 2 vezes e posteriormente ressuspensa no mesmo tampão para realização da aquisição. Após a leitura, realizada no FACSCalibu (BD, USA), dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

Os níveis séricos de IL-6, TNF- α , sFasL e MIP-1 α foram determinados pela técnica Luminex/MAGpix. Para tanto, o plasma foi adicionado a placas de 96 poços contendo esferas magnéticas analisadas em painéis de alta sensibilidade RCYTOMAG-80K (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de citocinas plasmáticas também foram expressos em pg/mL para cada citocina. A razão entre IL-12 e IFN- γ foi feita através da divisão dos valores obtidos de cada citocina individualmente por camundongo de forma pareada.

2.11 Fenotipagem

Aliquotas de 1×10^5 células do baço foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo U e centrifugadas por 5 min, a 200g e 4°C. Foram adicionados anticorpos específicos para os marcadores de interesse na proporção de 1 μ L de anticorpo para 1×10^6 células em 100 μ L de tampão de citometria (PBS suplementado com 0,5% de soro albumina bovina e 0,02% de azida sódica). As células foram incubadas por 20 min a 4°C ao abrigo da luz. Após este período, o material foi lavado 2 vezes (5 min, 200g, 4°C) com 200 μ L de tampão para citometria. Após as lavagens, as células marcadas foram ressuspensas em 200 μ L de tampão para citometria e analisadas no citômetro Guava easy Cyte HT system (Merck, Alemanha).

Os painéis elaborados foram utilizados para a detecção de linfócitos T helpers (CD3, CD4), linfócitos T helpers ativados (CD3, CD4, CD28), linfócitos T citotóxicos (CD3, CD8), linfócitos T citotóxicos ativados (CD3, CD8, CD28), macrófagos (CD14), macrófagos ativados (CD14, CD86) e células assassinas naturais ativadas (NK1.1, CD86). A estratégia de análise consistiu inicialmente na detecção das populações de interesse pelos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) seguidas da delimitação das populações alvo pela utilização de um marcador populacional comum, como CD3 para linfócitos e CD14 para macrófagos. Após essa

divisão, as subpopulações foram estudadas pela combinação das florescências dos marcadores subjacentes.

2.12 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e posteriormente, dependendo do resultado obtido, através do emprego da análise de variância (ANOVA) one-way seguida do Teste Tukey- Kramer ou Kruskal-Wallis seguido de Dunns e o Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Em todas as análises foi considerado como significativo $p < 0,05$. Para otimização dos resultados o teste de Grubbs foi utilizado para detectar valores com potencial de perturbar a normalidade e distribuição dos dados. Os resultados encontrados foram reportados através da média $\pm$ desvio padrão.

3.Resultados

3.1 O mix de tocoferóis não afeta a viabilidade, proliferação e motilidade das células Hs578T

A viabilidade das células Hs578T em diferentes concentrações do mix de tocoferóis (3.6, 6.15, 12.3, 36.9, 110.7 $\mu\text{g/mL}$) não foi afetada de forma significativa durante o período de 48 horas ($p= 0,9255$), permanecendo com uma média de viabilidade de 97,61 na dose mais alta (Figura 19.A). De forma semelhante a capacidade de clonicidade independente de ancoragem dessa linhagem (Figura 19.B) também não foi alterada ($p= 0,3373$). Em relação aos parâmetros de deslocamento individuais (Tabela 3), não foi possível observar nenhuma modificação nos parâmetros analisados ($p\geq 0,05$), demonstrando que os tocoferóis em estudo não são capazes de promover a morte celular, impedir a formação de colônias ou modificar os parâmetros de deslocamento estudados na linhagem Hs578T.

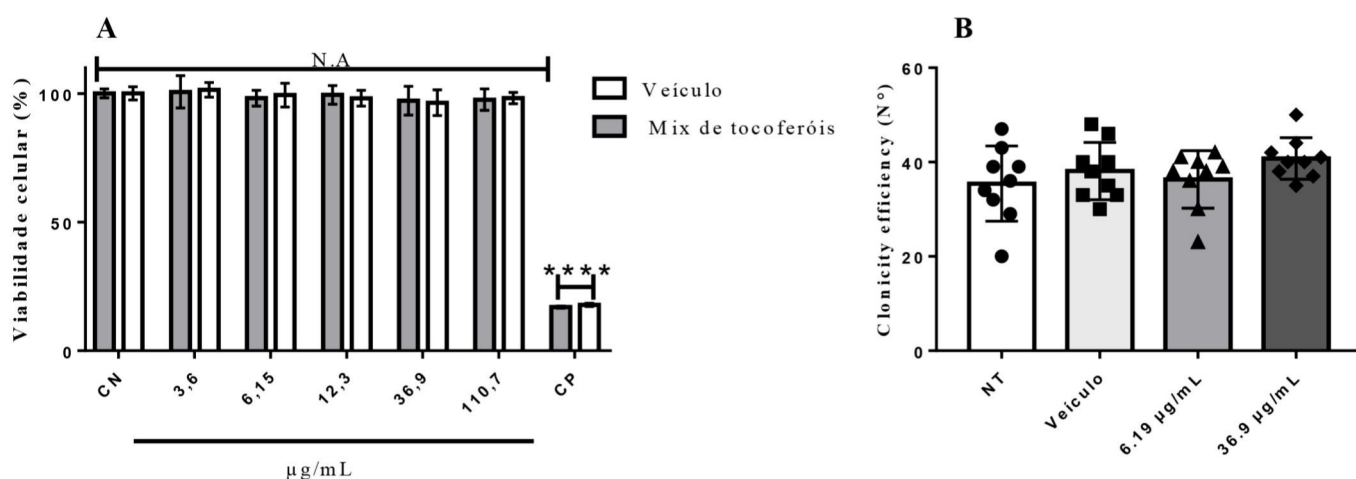


Figura 19. Índice de viabilidade e capacidade de clonicidade independente de ancoragem das células Hs578T tratadas com mix de tocoferóis. Os dados representam a média em porcentagem de viabilidade (%) e o coeficiente de clonogenicidade ($N^\circ \pm$ o desvio padrão (SD)). (A) Índice de viabilidade celular da linhagem Hs578T após 48 horas. Grupo controle contendo apenas meio (CN). Grupo controle positivo (CP) feito com 10 % de DMSO. (B) Doses de 6.19 e 36.9 $\mu\text{g/mL}$ do mix de tocoferóis foram utilizados como grupo experimental e no grupo veículo foi adicionado DMSO na concentração da dose mais alta do grupo experimental. As colônias foram acompanhadas por 10 dias, sendo tratadas diariamente. Para comparação dos grupos foi utilizado em A o Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni sendo considerado um valor significativo de $p\leq 0.05$. Em B foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer sendo considerado um valor significativo de $p\leq 0.05$. **** quando $p\leq 0.0001$. Os dados são provenientes de pelo menos 3 replicatas por experimento, com 3 repetições.

Tabela 3. Dados de parâmetros de deslocamento individuais de células Hs578T.

Parâmetro	NT	Vehicle	6.19 µg/mL	36.9 µg/mL	Unidade
Distância total	719,8±118,5	733,8±165,1	756,5±138,7	738,4±141,2	µm
Velocidade	0,8±0,1	0,8±0,2	0,9±0,1	0,9±0,1	µm per Min
Direcionalidade	0,8±0,0	0,7±0,0	0,8±0,0	0,7±0,1	AU
Linha reta	575,9±114,10	566,8±152,2	618,7±113,0	576,2±135,4	µm

Nota: ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer (paramétrico) ou Kruskal-Wallis seguido de Dunns (não paramétrico) foram utilizados para avaliar a diferença entre os grupos, sendo considerado um valor significativo de $p \leq 0,05$. Grupo não tratado (NT); Grupo veículo com DMSO (Veículo); Grupo contendo 6.19 µg/mL do mix de tocoferóis (6.19 µg/mL) e Grupo contendo 36.9 µg/mL do mix de tocoferóis (36.9 µg/mL). Os resultados encontrados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP). Os dados são provenientes de pelo menos 3 experimentos independentes.

3.2 Mix de Tocoferóis modifica de forma dose dependente a capacidade de invasão de células Hs578T

A capacidade de invasão das células Hs578T através da placa transwell cujos insertos foram recobertos com Matrigel diluído é mostrada na figura 20. É possível observar que os grupos tratados com o mix de tocoferóis apresentaram capacidade de invasão mais baixa.

Apesar da taxa de invasão ter sido praticamente a mesma ($\approx 16\%$), é possível observar pelo valor de p que a concentração mais alta teve uma capacidade melhor de inibição ($p \leq 0.01$ vs $p \leq 0,001$), sugerindo um possível efeito dose dependente do efeito observado.

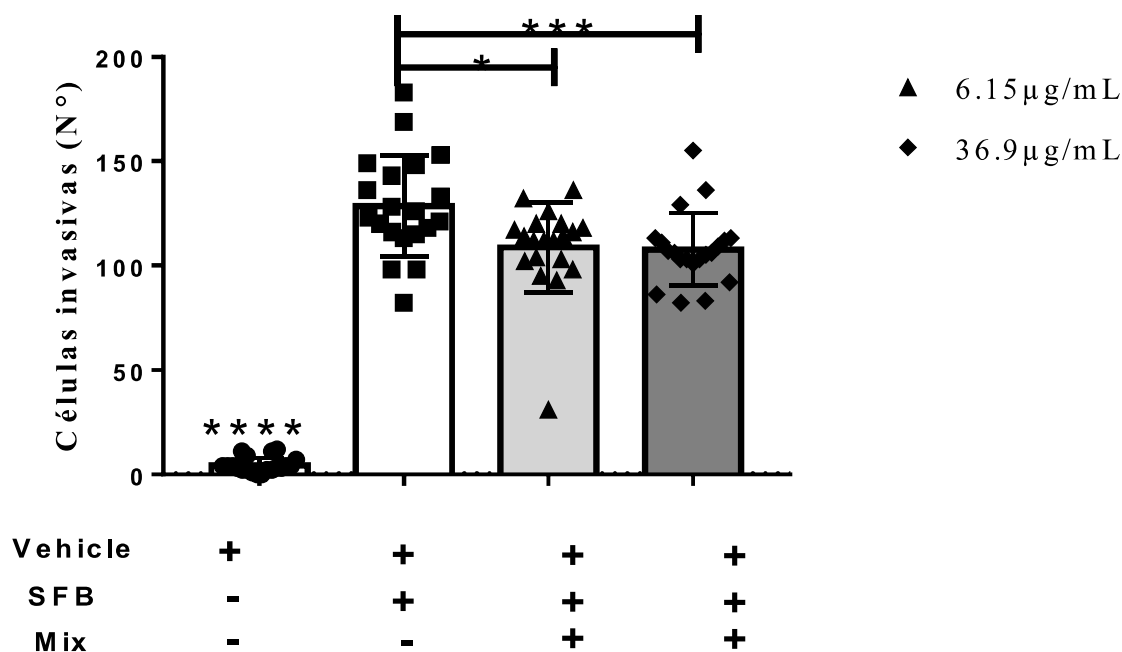


Figura 20. Capacidade de invasão das células da linhagem Hs578T através da matriz extracelular feita com Matrigel após 24 horas. Os dados representam a média do número de células capazes de invadir a matriz de Matrigel $\pm$ o desvio padrão (SD). Doses de 6.15 e 36.9 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina E foram utilizados como grupo experimental, cuja redução da invasão foi em torno de 16%. Como controle positivo, foi utilizado DMEM com 10% de SFB (+SFB) na câmara inferior, e como controle negativo, DMEM sem soro (-SFB). No grupo + SFB foi adicionado o veículo na concentração da dose mais alta de vitamina E. Para a análise da diferença do número de células foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey- Kramer sendo considerado um valor significativo de $p \leq 0.05$. * $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0,001$. Micrografias das células invasoras (20x). Os dados são provenientes de 1 amostra por experimento, com 4 repetições, cada uma contendo cinco campos independentes.

3.3 A quantidade de actina e miosina no citoesqueleto de células Hs578T é diminuído pela presença de mix de tocoferóis

A caracterização do citoesqueleto através do conteúdo de actina e tubulina de células Hs578T foi realizado no intuito de observar possíveis influências do tratamento com o mix de tocoferóis sobre o citoesqueleto das células em estudo.

Como pode ser visto na figura 21, o tratamento com a dose de 36.9 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de diminuir de forma significativa ($p \leq 0,001$) a intensidade de fluorescência da tubulina (B) e actina (C), sendo estes parâmetros diretamente relacionados com a

quantidade dessas proteínas no citoesqueleto das células. Além disso, foi possível observar uma diminuição do marcador de núcleo (A) sugerindo um possível efeito sobre o material genético das células Hs578T.

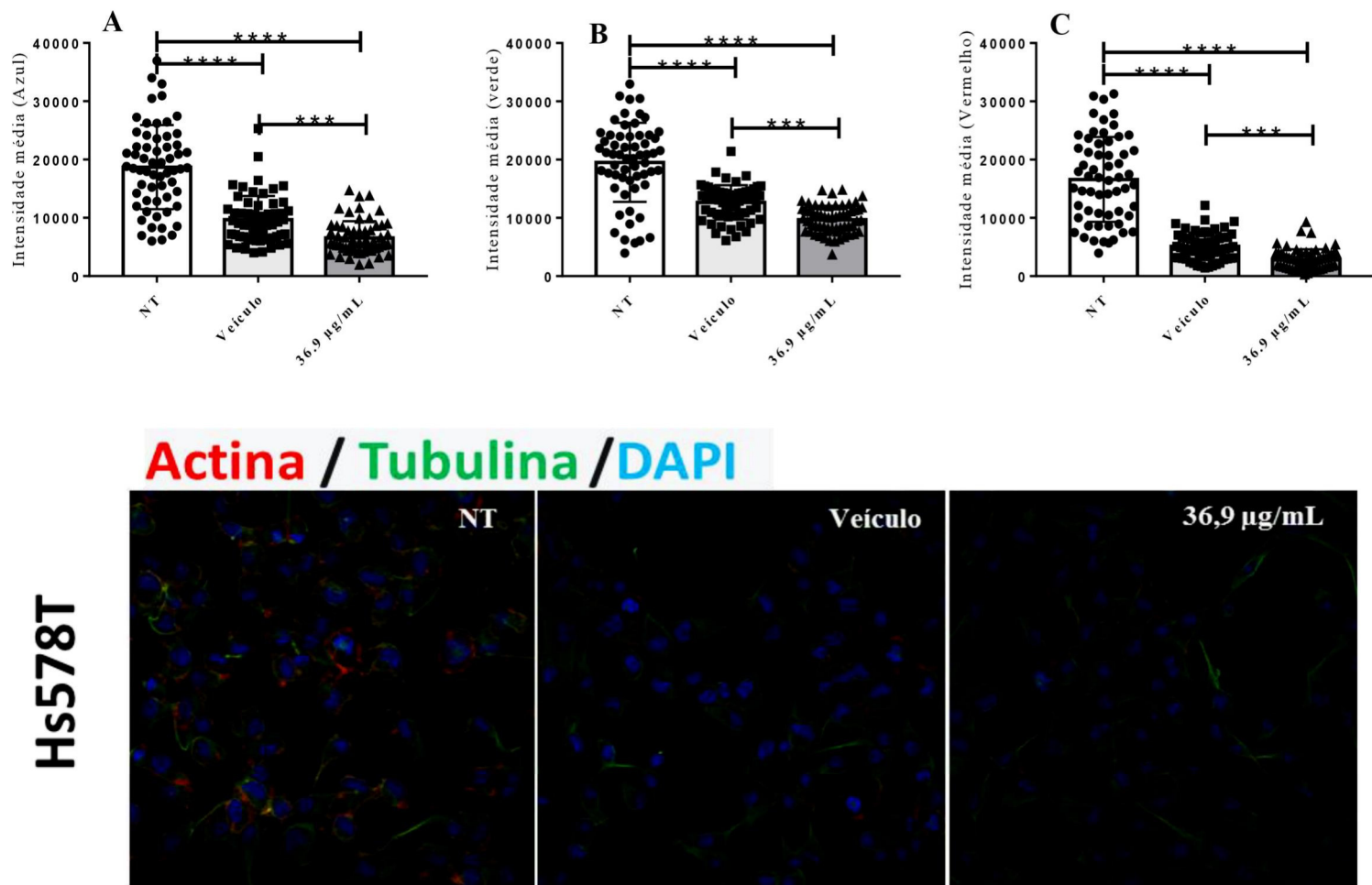


Figura 21. Caracterização do citoesqueleto através do conteúdo de actina e tubulina de células Hs578T tratadas com diferentes concentrações de vitamina E. Para a realização da imunofluorescência foram utilizados os marcadores Actina-phalloidin (Vermelho), alfa Tubulina (Verde) e DAPI (Azul) para a marcação dos núcleos. A avaliação da intensidade de fluorescência média de cada marcador por célula foi expressa pela média $\pm$ o desvio padrão (DP) de cada grupo. A dose de 36.9 µg/mL de vitamina E foi utilizado como grupo experimental e no grupo veículo foi adicionado DMSO na concentração da dose mais alta de vitamina E. Para a análise da diferença entre os grupos foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer sendo considerado um valor significativo de $p \leq 0.05$. *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$. Micrografias das imunofluorescências (100x). Os dados são provenientes de triplicatas por experimento, com 2 repetições, com quantificação de 20 células por lâmina.

3.4 O mix de tocoferóis melhora os parâmetros nutricionais na caquexia induzida pelo tumor e amplificados pela ciclofosfamida

O peso dos animais ao fim do tratamento (Figura 22.A) demonstrou uma diminuição da massa corpórea no grupo PC em relação ao TS. Em relação ao consumo de ração (Figura 22.B) o grupo TSC divergiu do grupo NC. Já a índice de aproveitamento alimentar foi maior no grupo TSC, tanto em relação ao grupo NC quanto no PC (Figura 22.C)

A porcentagem de perda da massa corporal (Figura 22.D) foi mais acentuada no grupo tratado com ciclofosfamida, sendo essa perda menos intensa no grupo TSC ($p \leq 0.0001$ vs $p \leq 0.05$).

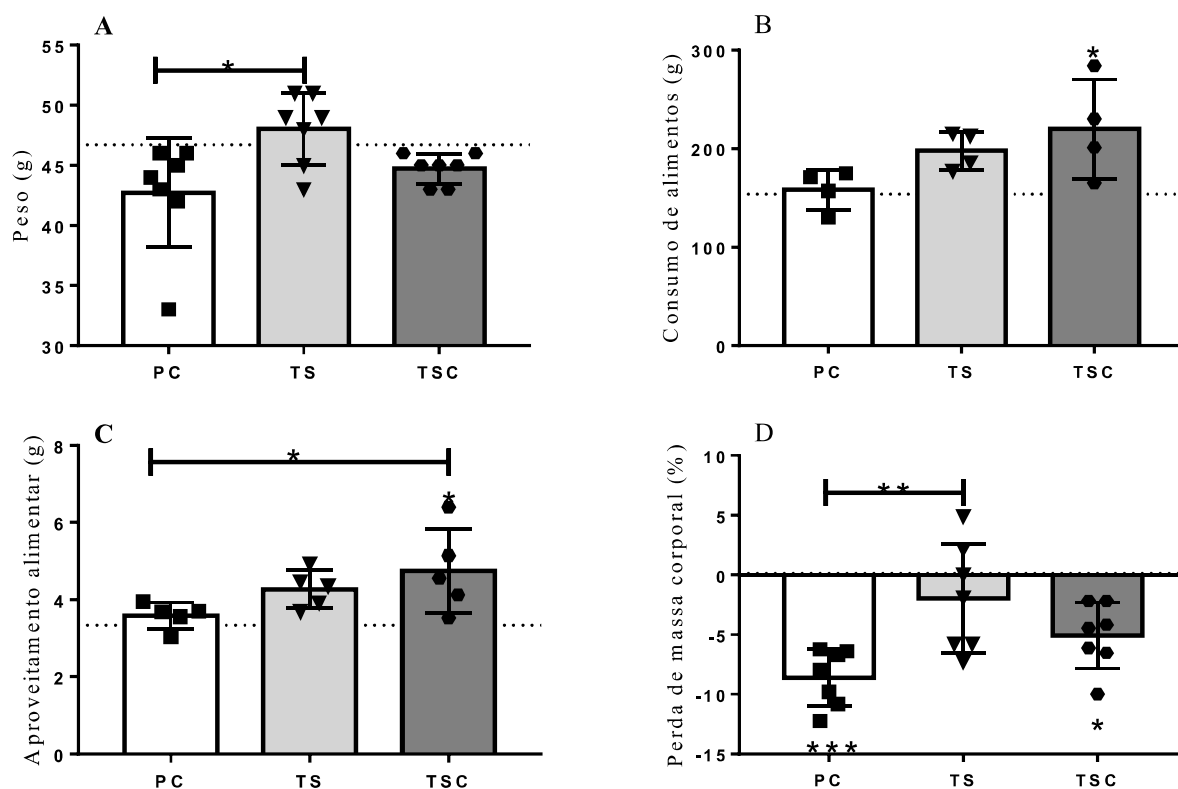


Figura 22. Utilização do mix de tocoferóis junto ao tratamento quimioterápico com ciclofosfamida e capaz de reverter parcialmente a caquexia em camundongos com tumor sólido de Erlich. Os gráficos são representações do peso dos animais ao final do experimento (A), consumo de ração (B), aproveitamento alimentar (C) e perda de massa corporal ocorrida durante o tratamento (D). A mensuração dos parâmetros analisados foi feita de 4 em 4 dias, sendo os dados representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=7$). Para a comparação dos grupos foi utilizado o One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou do teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn (distribuição não normal), onde foi considerado um valor significativo de $p \leq 0,05$. * quando $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,0001$ e **** $p \leq 0,0001$. A linha tracejada

representa a média referente ao grupo controle negativo (NC). Quando o * não estiver associado a uma barra sua comparação se refere ao grupo NC. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pós-tumor e tratado com ciclofosfamida (TCS).

3.5 O mix de tocoferóis melhora os parâmetros hematológicos dos camundongos submetidos ao tratamento com ciclofosfamida

A utilização do mix de tocoferóis no contexto do tumor foi capaz de aumentar de forma significativa vários parâmetros hematológicos comparados ao controle (Tabela 4). O tratamento quimioterápico tende a reduzir vários desses parâmetros, embora não de forma significativa na maioria dos casos ($p \leq 0,05$). Quando combinados, os tocoferóis perdem parte do seu efeito, notadamente em relação ao número de leucócitos ($5383,3 \pm 1595,5$ vs $920 \pm 1138,8$ células/mm³) e de eritrócitos ($10,1 \pm 0,3$ vs $6,3 \pm 1,2$ milhões/mm³). Apesar disso, a quantidade de células no grupo TSC tende a ser superior do que aqueles encontrados no grupo PC, embora tal tendência não possua diferença estatística.

Tabela 4. Alterações hematológicas causadas pelo tratamento com a ciclofosfamida não são alteradas pelo uso do mix de tocoferóis.

Parâmetro	NC	PC	TS	TSC	Unidade
Leucócitos	1671,4 $\pm$ 1286,7	685,7 $\pm$ 348,4	5383,3 $\pm$ 1595,5 ^{abd}	920,0 $\pm$ 1138,8	(Célula/mm ³)
Neutrófilos	517,0 $\pm$ 469,8	225,8 $\pm$ 135,2 ^a	1738,5 $\pm$ 715,5 ^{bd}	243,4 $\pm$ 253,7	(Célula/mm ³)
Linfócitos	1077,5 $\pm$ 833,2	434,5 $\pm$ 206,3	3399,1 $\pm$ 921,9 ^{abd}	608,2 $\pm$ 797,6	(Célula/mm ³)
Monócitos	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	5,6 $\pm$ 12,5	(Célula/mm ³)
Eosinófilos	76,8 $\pm$ 60,9	25,2 $\pm$ 16,4	245,6 $\pm$ 144,8 ^{ab}	62,8 $\pm$ 83,9	(Célula/mm ³)
Eritrócitos	8,157 $\pm$ 1,913	7,5 $\pm$ 0,3	10,1 $\pm$ 0,3 ^{abd}	6,3 $\pm$ 1,2	Milhões/mm ³
Hemoglobina	10,6 $\pm$ 2,3	9,6 $\pm$ 0,4	13,3 $\pm$ 0,3 ^{abd}	7,8 $\pm$ 1,7 ^a	g/dL
Hematócrito	40,1 $\pm$ 9,0	36,1 $\pm$ 1,3	49,7 $\pm$ 1,6 ^{abd}	29,6 $\pm$ 6,5 ^a	%
Plaquetas	702,7 $\pm$ 721,8	2556,0 $\pm$ 614,2 ^a	1914,2 $\pm$ 194,8 ^a	1893,2 $\pm$ 517,3 ^a	Célula/mm ³
Proteínas do plasma	5,1 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,1 ^c	g/L

Nota: Os animais foram divididos em 4 grupos (n = 7). ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer (paramétrico) ou Kruskal-Wallis seguido de Dunns (não paramétrico) foram utilizados para avaliar a diferença entre os grupos, sendo considerado um valor significativo de $p \leq 0,05$. Os resultados encontrados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). O símbolo a representa diferença quando comparado ao grupo NC, b quando comparado ao PC, c com TS e d quando comparado ao TSC. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pós-tumor e tratado com ciclofosfamida (TCS).

3.6 A utilização do mix de tocoferóis não impedi a ação da ciclofosfamida na eliminação das células tumorais

O desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich foi evidenciado pelo aumento progressivo do volume e do peso da pata inoculada com tumor (Figura 23.A e B). Notadamente, o uso isolado do mix de tocoferóis levou a um aumento do volume do tumor quando comparado com grupo NC no último dia de experimento ($0,2986 \pm 0,03848$ vs $0,3329 \pm 0,06157$ mL).

Além disso, é possível observar que o grupo PC e TSC não divergiram em relação ao crescimento tumoral ($0,2086 \pm 0,0234$ vs $0,2129 \pm 0,03861$ mL), demonstrando que a suplementação não interferiu com o efeito antineoplásico do quimioterápico. Em relação ao número de células oriundas do tumor (Figura 23.C), o grupo TSC diminuiu em um nível de significância a quantidade de células encontradas em relação ao grupo PC ($p \leq 0,0001$ vs $p \leq 0,001$), sugerindo uma maior quantidade de células nesse grupo.

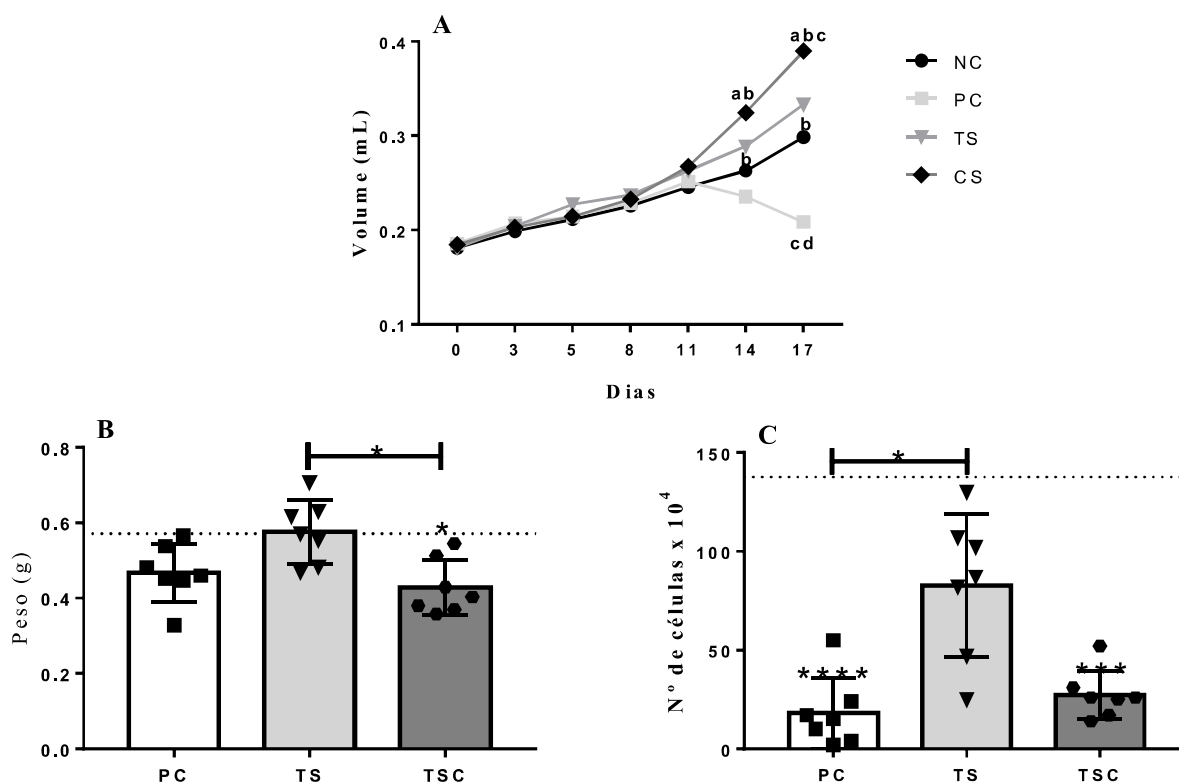


Figura 23. O mix de tocoferóis não altera a ação da ciclofosfamida no desenvolvimento tumoral. Os gráficos são representações do aumento do volume da pata inoculada com o tumor ao longo do tempo (A), peso da pata contendo o tumor (B) e número de células contidas na pata após a digestão enzimática (C). A mensuração dos parâmetros analisados

foi feita de 4 em 4 dias, utilizando Pletismômetro (a) balança (c) ou contador hematológico, sendo os dados representados como média $\pm$ desvio padrão (n=7). Para a comparação dos grupos foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou Kruskal-Wallis test, seguido do pós-teste de Dunn's (distribuição fora da normalidade), sendo considerado um valor significativo de $p \leq 0.05$. * quando $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ e **** $p \leq 0.0001$. A linha tracejada representa a média referente ao grupo controle negativo (NC). Quando o * não estiver associado a uma barra sua comparação se refere ao grupo NC. O símbolo a foi usado quando houver diferença estatística em relação ao grupo NC, b em relação a PC, c em relação a TS e d em relação a TSC. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pós-tumor e tratado com ciclofosfamida (TCS).

3.7 O mix de tocoferóis não modifica o padrão de citocinas no microambiente tumoral, mas reduz a produção sistêmica de IL-6

Na tabela 5 e 6 estão representados os dados referentes as citocinas e quimiocinas encontradas no microambiente tumoral e no soro dos diferentes grupos. No sobrenadante das culturas do microambiente tumoral (Tabela 5) foi possível observar que o tratamento com a ciclofosfamida tende a diminuir a produção das citocinas IL-12, IFN- γ e MCP-1, e aumentar a produção de TNF- α e IL-10 quando comparado com o grupo NC.

Já o grupo TS tende a manter os níveis das citocinas encontradas, demonstrando, porém, uma tendência na produção de IL-10. O grupo TSC tende a aumentar a produção de IL-12, IFN- γ , MCP-1 e IL-10, e uma diminuição de TNF- α , quando comparado com o grupo PC. O grupo TSC também é aquele que demonstra a maior relação IL-12/ IFN- γ entre todos os grupos ($1,2 \pm 0,7$ AU)

Na tabela 6, é possível observar o padrão de citocinas encontrados no soro dos animais. Não foi possível encontrar grandes diferenças nos níveis das citocinas analisadas, com a única exceção dos níveis de IL-6 encontrados no grupo PC, que porem, são normalizados no grupo TSC de forma significativa.

Tabela 5. Citocinas e quimosinas provenientes do microambiente tumoral dos diferentes grupos experimentais.

Grupo	IL-12	IFN- γ	MCP-1	TNF- α	IL-10	IL-12/IFN- γ	Unidade
NC	427,3 $\pm$ 148,7	1005,0 $\pm$ 363,9	12,4 $\pm$ 12,2	3,1 $\pm$ 4,5	3,0 $\pm$ 4,4	0,4 $\pm$ 0,0	pg/mL
PC	106,7 $\pm$ 95,6 ^a	58,13 $\pm$ 80,7 ^a	0,0 $\pm$ 0,0	25,7 $\pm$ 38,1	35,8 $\pm$ 49,4	0,4 $\pm$ 0,6	pg/mL
TS	401,8 $\pm$ 435,4	788,1 $\pm$ 549,6	6,0 $\pm$ 8,0	6,6 $\pm$ 14,8	64,5 $\pm$ 84,5	0,4 $\pm$ 0,2	pg/mL
TSC	318,1 $\pm$ 281,1	222,9 $\pm$ 183,2	0,1 $\pm$ 0,3	51,6 $\pm$ 73,2	62,8 $\pm$ 48,6	1,2 $\pm$ 0,7	pg/mL

Nota: Os animais foram divididos em 4 grupos (n = 5). A ANOVA one-way foi usada para comparar os grupos, seguida do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou do teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn (distribuição não normal), em ambos os casos foi considerado um valor significativo de $p \leq 0,05$. O símbolo a foi usado quando houver diferença estatística em relação ao grupo NC, b em relação a PC, c em relação a TS e d em relação a TSC. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pós-tumor e tratado com ciclofosfamida (TCS).

Tabela 6. Citocinas e quimiocinas provenientes do soro dos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Endotelina-1	IL-6	MIP-1a	sFasL	TNF- α	Unidade
NC	7,0 $\pm$ 3,2	4,5 $\pm$ 0,7	42,2 $\pm$ 4,7	70 $\pm$ 17,2	10,4 $\pm$ 3,2	pg/mL
PC	11,4 $\pm$ 3,1	7,5 $\pm$ 1,9*	44,8 $\pm$ 7,7	60,9 $\pm$ 8,3	11,7 $\pm$ 2,9	pg/mL
TSC	10 $\pm$ 1,6	5,9 $\pm$ 1,5	45,6 $\pm$ 0,0	55,3 $\pm$ 7,2	11,2 $\pm$ 0,0	pg/mL

Nota: Os animais foram divididos em 3 grupos (n = 7). A ANOVA one-way foi usada para comparar os grupos, seguida do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou do teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn (distribuição não normal), em ambos os casos foi considerado valor significativo de $p \leq 0,05$. * quando $p \leq 0,05$ em comparação ao grupo controle. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC) e Grupo suplementação pós-tumor e tratado com ciclofosfamida (TCS).

3.8 O mix de tocoferóis é capaz de aumentar o estado de ativação das células imunes no baço dos animais tratados com ciclofosfamida

Na figura 24 representa o perfil de células imunológicas e o seu grau de ativação encontrados no baço dos diferentes grupos. Em linhas gerais, os diferentes tratamentos possuíram efeitos diversos dos diferentes parâmetros analisados, por vezes aumentando ou diminuindo o número de células das diferentes populações estudadas.

O grupo TSC parece ter um comportamento independente, apresentando a maior taxa de células ativadas, sejam elas referentes a imunidade adaptativa (Figura 24. B e D) seja em relação a imunidade inata (G e H). Esses dados demonstram que foi a interação entre o quimioterápico e o mix de tocoferóis que permitiu o surgimento desse

padrão, uma vez que nem a ciclofosfamida nem o mix sozinhos apresentaram o fenômeno observado no tratamento combinado.

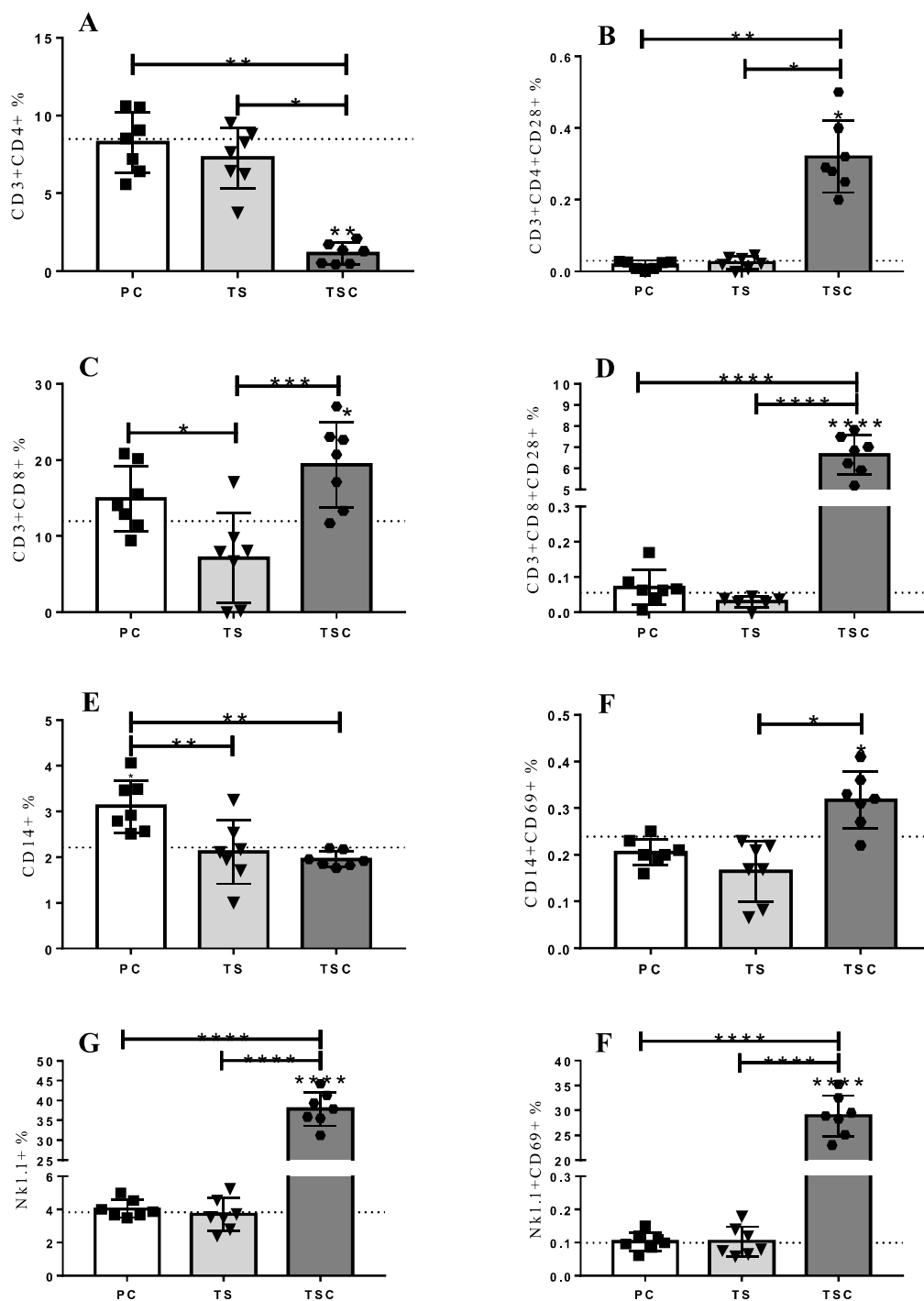


Figura 24. O efeito adjuvante do mix de tocoferóis no tratamento com ciclofosfamida é capaz de ativar células da imunidade inata e adaptativa no baço de camundongos com tumor de Erlich. Os gráficos são representações das frequências (%) de marcadores em populações de linfócitos auxiliares (A), linfócitos auxiliares ativados (B), linfócitos citotóxicos (C), linfócitos citotóxicos ativados (D), macrófagos (E), macrófagos ativados (F), células natural killer (G) e células natural killer ativadas (H). Os dados são

representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=7$). ANOVA one-way foi usado para comparar os grupos, seguida do pós-teste de Tukey-Kramer (distribuição normal) ou teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn (distribuição não normal), onde foi considerado um valor significativo de $p \leq 0,05$. * quando $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$. A linha tracejada representa a média referente ao grupo controle negativo (NC). Quando o * não está associado a uma barra, suas comparações referem-se ao grupo NC. Grupo controle (NC); Grupo ciclofosfamida (PC); Grupo suplementação pós-tumor (TS) e Grupo suplementação pós-tumor e tratado com ciclofosfamida (TCS).

4. Discussão

Nesse trabalho estudamos a possibilidade de um mix de tocoferóis funcionar como um adjuvante imunológico no tratamento quimioterápico com a ciclofosfamida. Nossos dados demostram que o mix de tocoferóis não possui efeito direto nas células Hs578T, não modificando parâmetros como viabilidade e crescimento, demonstrando assim a falta de um efeito antitumoral direto. Tal achado deve-se talvez a agressividade da linhagem em questão. Apesar disso, efeitos pontuais do mix sobre a invasibilidade foram achados, provavelmente devido a modificações na qualidade do citoesqueleto dessas células.

O real efeito adjuvante dos tocoferóis fica bem estabelecido no modelo in vivo. Nesse modelo a interação entre o mix de tocoferóis e a ciclofosfamida não impediu o efeito esperado do quimioterápico, mas sim modula um dos seus principais efeitos deletérios, a destruição da resposta imunológica vigente, em algo positivo, uma vez que reduz a atividade imunológica pró-tumoral. O resetar da resposta imune causado pelo antineoplásico se soma a modulação pró Th1 mediada pelo mix de tocoferóis, resultando em uma forte resposta antitumoral frente ao tumor.

Essa interação é observada pela ativação diferencial das células imunes em órgãos linfoides. Além desse efeito imunológico, a suplementação com o mix de tocoferóis também foi capaz de reverter muitos dos efeitos deletérios do desenvolvimento do tumor que são amplificados pelo tratamento quimioterápico, sendo seu efeito mais marcante a diminuição da caquexia.

O estudo da suplementação com vitamina E não demostram efeitos quimioprotetores de forma consistente (FLESHNER et al., 2011; GAZIANO et al., 2012; LIPPMAN et al., 2009; SLATORE et al., 2008). Apesar disso, inúmeros estudos apontam sua função como a principal reguladora de radicais livres lipossolúveis encontradas na dieta humana além de ser capaz de promover a formação de uma

resposta Th1, sendo esse tipo de resposta celular a mais efetiva frente a tumores (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; HAN et al., 2000; NIKI, 2014).

Nesse sentido, a possibilidade dos tocoferóis, uma porção importante da vitamina E, possuírem atividade adjuvante no tratamento oncológico ganha destaque, uma vez que o seu uso pode atenuar efeitos deletérios de quimioterápicos, inclusive da ciclofosfamida, cujos efeitos colaterais, em especial a imunossupressão são intensos (BJELOGRIC et al., 2005; FENG et al., 2010; GHOSH; DAS; MISRO, 2002; MAGNI et al., 1996).

Para acessar o possível efeito adjuvante dos tocoferóis, analisamos inicialmente sua ação direta na linhagem celular Hs578T, um carcinoma mamário humano, triplo negativo, extremamente invasivo com um prognóstico extremamente ruim. Esses tipos de tumor necessitam de tratamento com quimioterapia, sendo, portanto, um modelo favorável ao estudo translacional de um possível adjuvante (WAHBA; EL-HADAAD, 2015).

Os tocoferóis usados não possuíram efeitos citotóxicos diretos na linhagem Hs578T, assim como não afetaram a capacidade dessa linhagem em se dividir. Apesar de vários tipos de vitamina E (vitâmeros separados ou formulações contendo diferentes misturas deles) terem a capacidade de gerar morte seletiva de células tumorais por inúmeros processos, de regulação dos genes Bax/Bcl-2 ao acúmulo de radicais livres, muitos tumores são irresponsivos a esta estratégia (CONSTANTINO; PAPAS; CONSTANTINO, 2008; REAGAN-SHAW et al., 2008; SAILO et al., 2018; STANKOV et al., 2007).

Descartadas os efeitos diretos inerentes a viabilidade e divisão, foram analisados os efeitos ligados ao processo de metástase, em particular a motilidade, necessária para a colonização de novos sítos e a invasão, importante para a fixação das novas colônias.

A motilidade da linhagem Hs578T não foi alterada pelo mix de tocoferóis. Apesar disso, estudos com tocotrienóis, em particular o vitâmero gama, demonstra a capacidade desse vitâmero em modificar a motilidade da linhagem MDA-MB-231 através da regulação do eixo Rac1/WAVE2, que por sua vez possui um papel primordial na reorganização do citoesqueleto celular (ALGAYADH; DRONAMRAJU; SYLVESTER, 2016). A discrepância dos resultados obtidos em nosso experimento parece ser diretamente relacionada as propriedades diretas dos

tocotrienóis em afetar células tumorais, devido a um possível efeito biológico mais intenso do que aqueles apresentados pelos tocoferóis (DAS GUPTA; SUH, 2016).

O processo de invasão, o segundo passo necessário para uma metástase bem sucedida, foi afetado pela presença dos tocoferóis. Neste ensaio o mix teve um efeito dose dependente sobre a capacidade de invasão, sendo a taxa de inibição aproximadamente de 16%. Os mecanismos que podem levar a esse fenômeno são vários, indo da diminuição de proteínas remodeladoras da matriz extracelular, baixa produção de espécies reativas de oxigênio até modificações da atividade mitocondrial. Apesar disso, componentes do citoesqueleto podem estar diretamente relacionados com uma maior capacidade invasiva de células tumorais, principalmente quando levamos em conta a presença da matriz extracelular (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014; SAHAI, 2005; SAHAI; OLSON; MARSHALL, 2001; ZHAO et al., 2014).

Com o intuito de avaliar se a diminuição da invasão promovida pelo mix de tocoferóis estava associada ao citoesqueleto seus componentes foram avaliados. A partir da intensidade de fluorescência média dos marcadores por célula é possível notar que os tocoferóis são capazes de diminuir a dinâmica/quantidade tanto de actina quanto da tubulina. A menor quantidade ou incapacidade de polimerização dessas proteínas está diretamente relacionado a menor capacidade de migração e invasão de alguns tumores, sendo estes componentes do citoesqueleto alvos em potencial de novas drogas antitumorais (FISCHER; HAYN; MIERKE, 2020; GANDALOVÍČOVÁ et al., 2017).

A diminuição acentuada dos componentes do citoesqueleto poderia explicar a menor capacidade de invasão observadas nos experimentos anteriores. Apesar disso, sua capacidade de motilidade não foi afetada. Isso pode ser um indicio que a presença dos tocoferóis afete mais fortemente os parâmetros responsáveis pela invasão do que aqueles inerentes a mobilidade. Além dos componentes citoplasmáticos, o mix de tocoferóis também foi capaz de diminuir a intensidade da coloração dos núcleos das células pelo corante DAPI. Sabe-se que a vitamina E e seus vitâmeros são capazes de modificar a expressão gênica de vários genes, assim como o grau de condensação do (AZZI et al., 2004).

Modificações no tamanho e condensação do DNA parecem ser fatores importantes para o processo de migração, onde células tumorais mais invasivas em matrizes extracelulares possuem núcleos menores e com material genético mais

condensado (CALERO-CUENCA; JANOTA; GOMES, 2018). A florescência diferenciada encontrada nas células tratadas talvez seja um indicativo de possíveis modificações nesses parâmetros, corroborando com a diminuição da taxa de invasão através da matriz extracelular e a não modificação da motilidade.

Com o objetivo de estudar de forma mais profunda as outras propriedades do mix de tocoferóis, utilizamos um modelo cujas características de agressividade se assemelham ao tumor formado pelas células Hs578T, sendo este o tumor de Erlich, onde o estudo da capacidade adjuvante foi propriamente estudada devido à complexidade dos organismos vivos (LEHMANN et al., 2011; ZHAO et al., 2014).

Uma vez comprovado a limitada capacidade do mix de tocoferóis em afetar diretamente as células da linhagem Hs578T, mas sabendo de suas potencialidades imunoestimuladoras e moduladoras da resposta Th1, um possível efeito adjuvante foi levantado. Para isso, a suplementação com o mix de tocoferóis foi realizada em camundongos portadores do tumor sólido de Erlich e tratados com ciclofosfamida.

O grupo TSC demonstrou um aumento tanto do consumo de ração, quanto um maior aproveitamento alimentar. Sendo que estes dois parâmetros se unem para explicar a menor porcentagem de massa corpórea perdida. Esses dados demonstram uma possível influência positiva dos tocoferóis sobre os efeitos deletérios do tratamento quimioterápico e do processo de carcinogênese. A anorexia é um dos principais efeitos deletérios tanto do processo de carcinogênese quanto do próprio uso de quimioterápicos, entre eles, a ciclofosfamida (NICOLINI et al., 2013).

Essa síndrome está diretamente ligada às repercussões sistêmicas causadas pelo avanço do processo cancerígeno (JIMÉNEZ et al., 2011). Além disso, o hipermetabolismo causado diretamente pelo crescimento tumoral ou indiretamente pelo processo inflamatório sistêmico também contribuem para esse fenômeno. Esse efeito pode evoluir para um processo de caquexia quando a perda de massa corpórea chega a ser maior que 5% (FEARON et al., 2011).

O mecanismo pelo qual a suplementação com tocoferóis pode ter afetado esses parâmetros metabólicos são diversos. Estudos demonstram que o vitâmeros alfa tocoferol é capaz de reverter a perda de peso, desgaste muscular e alterações moleculares provenientes do processo de caquexia induzida por TNF-alfa (BUCK; CHOJKIER, 1996).

Han e colaboradores (2000) também observaram que o tratamento prévio de camundongos com vitamina E foi capaz de reduzir os níveis séricos de TNF e IL-6 em

camundongos infectados com o vírus influenza, sendo esta diminuição diretamente correlacionada com a proteção contra a anorexia, perda de peso e aumento de sobrevivência. Esses mecanismos podem estar em maior ou menor parte ligados aos efeitos anti-inflamatórios dos vários vitâmeros da vitamina E (JIANG, 2014; PEKMEZCI, 2011; REITER; JIANG; CHRISTEN, 2007), que ao impedir uma hiperativação imunológica sistêmica protege o organismo dos efeitos deletérios, seja pelo controle dos níveis de citocinas séricas ou seja pelo menor desgaste muscular causado por elas (CHUNG et al., 2010; MOCCHIGIANI et al., 2014).

Outro ponto importante da repercussão sistêmica do câncer e os seus tratamentos, são as mudanças no padrão hematológico. Tal efeito parece estar fortemente associada à ativação de células imunes por citocinas inflamatórias (DIEDERICH; MORCEAU; DICATO, 2009; WEISS; GANZ; GOODNOUGH, 2019). Essa confluência de fatores faz com que a anemia ocorra em mais de 40% dos casos de câncer (KNIGHT; WADE; BALDUCCI, 2004). Esse sintoma, porém, pode aumentar para até 90% quando associado a quimioterapia, cuja ação leva a diminuição da série vermelha e branca (TAS et al., 2002).

Sabe-se que a vitamina E pode agir como um fator de eritropoiese, sendo sua deficiência correlacionada com uma baixa produção de elementos figurados (FITCH; DRAKE, 1980; JILANI; IQBA, 2011). Observar-se uma intensa produção de leucócitos no grupo TS fenômeno este já relatado na literatura, que parece ser mantido mesmo com a presença do tumor (MARKO et al., 2009; MORIGUCHI, 1997).

Apesar de ocorrer uma intensa ação imunoestimulante devido a presença dos tocoferóis, esse maior quantitativo de células imunes não repercute na diminuição do tumor, pelo contrário, está associado ao seu aumento. Isso provavelmente se deve a intensa influência do tumor sobre as novas células produzidas, que não são capazes de modificar a imunoedição do microambiente tumoral em prol do tumor.

O grupo TSC é fortemente afetado pela ciclofosfamida provavelmente devido ao seu efeito citotóxico sobre linfócitos e sua atividade quelante (MAGNI et al., 1996; VOELCKER, 2020). Apesar disso, a presença dos tocoferóis é capaz de manter títulos de leucócitos maiores do que aqueles encontrados no grupo PC, demonstrando um efeito adjuvante importante, embora não estatisticamente relevante.

Para se entender o efeito adjuvante do mix de tocoferóis no microambiente tumoral é necessário compreender as fases do desenvolvimento do Ehrlich. O modelo em questão possui uma fase inflamatória, uma fase de estabilização e um aumento

exponencial de células tumorais, resultando em metástase (FADEL et al., 2010; FERNANDES et al., 2015). A suplementação sem a presença da droga padrão (grupo TS) não foi capaz de conter o desenvolvimento do tumor, mas sim agravá-lo. Esses dados nos permitem inferir que o mix de tocoferóis não foi capaz de conter o processo inflamatório decorrente da estabilização do tumor, (0-11 dias) indo de encontro com as suas propriedades anti-inflamatórias (MOCCHEGIANI et al., 2014).

Os vitâmeros também não foram capazes de conter o crescimento tumoral, (11-17 dias), indo de encontro com suas propriedades antitumorais (CONSTANTINOU; CHARALAMBOUS; KANAKIS, 2020; CONSTANTINOU; PAPAS; CONSTANTINOU, 2008). A associação do mix de tocoferóis com a ciclofosfamida, parece não ter influenciado a capacidade do quimioterápico de conter o tumor. Tal efeito da droga padrão se dá na fase de crescimento exponencial do tumor por se tratar de um agente alquilante (HARTMANN et al., 1995).

Os metabolitos da ciclofosfamida causam ligações entre as fitas do DNA impedindo sua dinâmica de fechamento e abertura, tanto para processos de transcrição quanto para replicação, o que culmina com a parada do ciclo celular, e em apoptose (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009).

A equivalência da cinética entre os grupos PC e TSC demonstram que os tocoferóis não interferem na capacidade da ciclofosfamida de conter o desenvolvimento tumoral. Essa é uma preocupação válida, uma vez que os mecanismos de ação desse quimioterápico envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio nas células tumorais e danos ao seu DNA (HARTMANN et al., 1995; LIU et al., 2012).

Estes mecanismos são passíveis de serem influenciados pela vitamina E devido a suas propriedades antioxidantes e protetoras do DNA (CLAYCOMBE; MEYDANI, 2001; E. GERBER, 2012). Apesar disso, o efeito antineoplásico foi mantido, assim como demonstrado em outros modelos (MUFAZALOVA et al., 2004; VINITHA et al., 1995).

O aumento do tumor no grupo TS pode ser inferido, além do desenvolvimento tumoral, pela produção de citocinas no ambiente tumoral. A produção de IL-12, IFN- γ , MCP-1 e a quase total ausência de Il-10 no grupo controle, demonstram a capacidade do tumor de recrutar células para o sítio do inóculo assim como de manter um intenso processo inflamatório (FERNANDES et al., 2015; HAMSA; KUTTAN, 2011). O mix tende a aumentar a produção de IL-12, IFN- γ , MCP-1, levado a uma inflamação não

resolutiva. Tal efeito pode ser causado pela grande influência do tumor sobre a ativação e produção das células imunes (FEITOSA et al., 2021).

No grupo TSC se observa uma tendência de aumento de IL-12, TNF- α , IFN- γ assim como de IL-10, além de um aumento de quase 3 vezes na relação IL-12/INF- γ em comparação com o grupo PC. Parte desse feito pode ser explicado pela capacidade da ciclofosfamida em “reiniciar” a resposta imunológica frente a um tumor em desenvolvimento. Isso ocorre a sua alta toxicidade sobre linfócitos reguladores (CD4+CD25) induzidos pelo tumor e pela capacidade de aumentar a população de células dendríticas maturadas em detrimento das imaturas (WADA et al., 2009).

Esses fenômenos permitem o surgimento de uma nova resposta imunológica contra o tumor, com a reativação de linfócitos e células da resposta inata permitindo o controle é até mesmo a eliminação do tumor (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; GHIRINGHELLI et al., 2004; WADA et al., 2009).

Essa característica da ciclofosfamida explicaria a modificação das citocinas inflamatórias no grupo PC, um indício de uma nova resposta imune em formação, livre da influência do tumor. Somado a isso, a presença dos tocoferóis poderia modular essa resposta devido ao sua capacidade de: a) potencializar a expansão clonal via produção de IL-2, b) aumento da responsividade frente à mitógenos, c) aumento da produção de IFN- γ , d) melhora da sinapse imunológica e e) modulação pró resposta Th1 (PAE; MEYDANI; WU, 2012). A junção das propriedades da ciclofosfamida e dos tocoferóis parecem propiciar a formação de uma resposta imune diferenciada.

Outro ponto importante a se levar em conta é a tendência do aumento da produção de IL-10. Apesar do seu papel imunossupressora, sua produção também está diretamente ligada ao controle do processo inflamatório (DENNIS et al., 2013; MANNINO et al., 2015; ZHAO et al., 2015). Essa regularização é necessária para impedir efeitos deletérios da resposta imune efetiva como também do próprio controle do processo inflamatório causado pelo desenvolvimento tumoral (DENNIS et al., 2013).

Certos modelos apontam que as próprias células Th1 são capazes de produzir IL-10 como forma de autorregulação, evitando possíveis efeitos deletérios sistêmicos decorrentes de sua ativação (COPE et al., 2011; MUMM et al., 2011; VIEIRA, 2007). Esses dados nos permitem teorizar que o balanço entre as citocinas pró inflamatórias e a regulação feita através da IL-10 no grupo TSC foi capaz de permitir a organização de uma resposta antitumoral controlada. Esse fenômeno evidencia os efeitos

adjuvantes benéficos do mix de tocoferóis, evidenciados nos parâmetros nutricionais e hematopoiéticos, que apesar de estarem contidos no microambiente tumoral, parecem ter repercussões sistêmicas.

Em relação as citocinas encontradas no soro, o padrão de resposta não foi claro. Apesar disso, é possível notar que o grupo TSC possui uma diminuição dos níveis séricos de IL-6. Essa citocina possui um papel dubio nas repostas imunes, porém, seu nível elevado está associado a processos inflamatório crônicos e a um padrão Th2 (HIRANO, 2021). A diminuição dessa citocina no grupo TSC parece corroborar com a modulação em direção da resposta Th1 e também poderia explicar a menor perda de massa corporal nesse grupo, uma vez que IL-6 em excesso e/ou produzida de forma constante está associado a caquexia (CARSON; BALTGALVIS, 2010).

Considerando o perfil de citocinas gerado pelo efeito adjuvante dos tocoferóis, fizemos a avaliação fenotípica das células para confirmar o possível padrão de resposta Th1. A fenotipagem do baço deixa claro que a suplementação isolada não foi capaz de alterar as populações de linfócitos helps, citotóxicos ou NKs ativadas de forma significativa. Porém, quando utilizado em conjunto da ciclofosfamida, ocorreu um aumento das células imunes ativas. A presença de células imunológicas ativas pode ser vantajosa uma vez que muitos tumores são capazes de causar sua inativação por processos imunossupressores(WHITESIDE, 2012).

Esses processos de imunossupressão estão associados à formação de uma resposta reguladora favorável ao tumor, relacionada ao recrutamento e ativação de células T e B reguladoras. Essas células são respostáveis pela manutenção de uma inflamação crônica incapaz de se tornar resolutive, geralmente percebida pela falta de moléculas co-estimulatórias nas células imunes, citocinas regulatórias, falta de citocinas da resposta Th1 e a inativação da resposta inata (DHATCHINAMOORTHY; COLBERT; ROCK, 2021; REUTER et al., 2010; WHITESIDE, 2012). Esse cenário parece ser o encontrado no grupo TS.

O efeito adjuvante do mix de tocoferóis fica evidente quando percebemos que as pequenas modificações do padrão de citocinas encontrados no microambiente tumoral repercutem de forma intensa na ativação de linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos, assim como células da imunidade inata, demonstrando um padrão Th1, com uma possível capacidade de eliminar o tumor (HINRICHS; ROSENBERG, 2014).

Além das vias de reconhecimento e ativação dependentes dos complexos de histocompatibilidade I e II utilizados pelos linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ respectivamente, a utilização da ciclofosfamida juntamente com o mix de tocoferóis foi capaz de quadruplicar a população de células NK ativadas, uma população celular cujas vias reconhecimento e eliminação diferem dos acima citados.

A estratégia de eliminação empregada por esse subtipo celular consiste na detecção da baixa expressão do MHC de classe I juntamente com a alta expressão de moléculas de stress como os relacionados a família NKG2D (BOTTINO et al., 2004), tal padrão relativamente comum em células infectadas por vírus e células tumorais (HORST et al., 2011; K; M, 1998).

Essa característica torna as células NK particularmente efetivas em tumores que tenham evadido o sistema imune pela depleção do MCH de classe I como estratégia evolutiva para escapar da eliminação dos linfócitos CD8⁺ como parece ser o caso do tumor de Ehrlich (CHEN; WATKINS, 1970; QUEZADA et al., 2011). Sua presença poderia explicar o melhor desempenho na contenção do tumor por esses grupos, assim como o padrão de citocinas encontrado.

Em linhas gerais, podemos concluir que a combinação do mix de tocoferóis juntamente com ciclofosfamida é capaz de atenuar alguns dos efeitos colaterais deste quimioterápico, em particular o agravamento da caquexia, anemia e leucopenia. Além disso, sua modulação no padrão de citocinas, embora pequeno, parece se relacionar com um melhor padrão de ativação das células imunes, notadamente em direção a uma reposta Th1.

Especula-se que um maior número de animais nos grupos experimentais poderia tornar a tendência encontrada no padrão de citocinas mais contundente dada a variação encontrada nessa abordagem. Além disso, o estudo do padrão de ativação das células no microambiente tumoral poderia relevar mais informações sobre a modulação observada.

Em experimentos futuros sugere-se que as análises se foquem no local do tumor e que a presença de células reguladoras como Treg e células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs) seja analisada. Essa abordagem poderia permitir um melhor entendimento dos mecanismos de reiniciação da resposta imune pela ciclofosfamida e a modulação pró Th1 induzida pelos tocoferóis, talvez relevando seus mecanismos imunológicos.

5. Conclusão

Levando-se em conta os dados levantados, podemos concluir que o mix de tocoferóis utilizados nesse estudo não foram capazes de exercer um efeito direto sobre as células Hs578T, tendo apenas efeitos pontuais sobre sua invasibilidade. No modelo *in vivo* o mix de tocoferóis apresentou um efeito adjuvante no tratamento com ciclofosfamida, melhorando os parâmetros nutricionais, hematológicos e induzido ativação das células imunes, a favor de uma resposta Th1.

Essa modulação parece ser possível, apenas quando levamos em conta o efeito a capacidade do quimioterápico de anular a resposta imunológica previa produzida e/ou influenciada pelo tumor. A resposta subsequente é teoricamente favorável a eliminação de células tumorais que tenham escapado ao efeito do antineoplásico.

Tendo em vista que a ciclofosfamida é utilizada de forma rotineira no tratamento oncológico e que o uso da vitamina E é usado como suplementação nutricional nesses pacientes, a combinação das duas abordagens não estaria fora da realidade dos tratamentos antitumorais. Essa abordagem poderia levar a formulação de um tratamento mais seguro e com propriedades imunomoduladoras positivas além de financeiramente viáveis.

Referencias

1. AMERICAN CANCER SOCIETY. **The cancer atlas, economic-burden**. [s.l: s.n.].
Disponível em: <<https://canceratlas.cancer.org/taking-action/economic-burden>>.
1. AMERICAN CANCER SOCIETY. **The cancer atlas, economic-burden**. [s.l: s.n.].
Disponível em: <<https://canceratlas.cancer.org/taking-action/economic-burden/>>.
- A. SHETTY, A. Vegetables as Sources of Antioxidants. **Journal of Food & Nutritional Disorders**, v. 02, n. 01, 2013.
- ABIRI, B.; VAFA, M. Vitamin C and Cancer: The Role of Vitamin C in Disease Progression and Quality of Life in Cancer Patients. **Nutrition and Cancer**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2020.
- ABRAHAM, A. et al. Vitamin E and its anticancer effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 17, p. 2831–2838, 2019.
- ABUSAMRA, A. J. et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, n. 2, p. 169–173, 2005.
- AHLMANN, M.; HEMPEL, G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, n. 4, p. 661–671, 2016.
- AKHMANOVA, A.; STEINMETZ, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: Two ends in the limelight. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 12, p. 711–726, 2015.
- AL-EITAN, L. N. et al. Vitamin E protects against cisplatin-induced genotoxicity in human lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 62, n. September 2019, p. 104672, 2019.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to Leishmania infection: Is this paradigm still relevant? **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. APR, p. 1–13, 2012.

- ALGAYADH, I. G.; DRONAMRAJU, V.; SYLVESTER, P. W. Role of Rac1/WAVE2 signaling in mediating the inhibitory effects of γ -tocotrienol on mammary cancer cell migration and invasion. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 12, p. 1974–1982, 2016.
- ANDREYEV, J. et al. Guidance on the management of diarrhoea during cancer chemotherapy. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 10, p. e447–e460, 2014.
- AZZI, A. et al. Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1031, p. 86–95, 2004.
- AZZI, A. Tocopherols, tocotrienols and tocomonoenols: Many similar molecules but only one vitamin E. **Redox Biology**, v. 26, n. June, p. 101259, 2019.
- BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11–22, 2011.
- BAKER, S. et al. Cancer Hallmarks Analytics Tool (CHAT): A text mining approach to organize and evaluate scientific literature on cancer. **Bioinformatics**, v. 33, n. 24, p. 3973–3981, 2017.
- BANIYASH, M. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: New insights and outlook. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n. 1, p. 80–88, 2006.
- BARAJAS GALINDO, D. E. et al. Appetite disorders in cancer patients: Impact on nutritional status and quality of life. **Appetite**, v. 114, p. 23–27, 2017.
- BARCELLOS-HOFF, M. H.; LYDEN, D.; WANG, T. C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 7, p. 511–518, 2013.
- BIERIE, B.; MOSES, H. L. Transforming growth factor beta (TGF- β) and inflammation in cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 1, p. 49–59, 2010.
- BJELOGRLIC, S. K. et al. Activity of d,l- α -tocopherol (vitamin E) against cardiotoxicity

induced by doxorubicin and doxorubicin with cyclophosphamide in mice. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 97, n. 5, p. 311–319, 2005.

BOBEVSKI, I. et al. Demoralisation and its link with depression, psychological adjustment and suicidality among cancer patients: A network psychometrics approach. **Cancer Medicine**, n. July, p. 1–11, 2021.

BOROWICZ, S. et al. The soft agar colony formation assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 92, p. 1–6, 2014.

BOTTINO, C. et al. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. **Molecular Immunology**, v. 41, n. 6–7, p. 569–575, 2004.

BRUMMAIER, T. et al. Using cyclophosphamide in inflammatory rheumatic diseases. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, n. 7, p. 590–596, 2013.

BUCK, M.; CHOJKIER, M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. **EMBO Journal**, v. 15, n. 8, p. 1753–1765, 1996.

CALERO-CUENCA, F. J.; JANOTA, C. S.; GOMES, E. R. Dealing with the nucleus during cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 50, p. 35–41, 2018.

CARSON, J. A.; BALTGALVIS, K. A. Interleukin 6 as a key regulator of muscle mass during cachexia. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 38, n. 4, p. 168–176, 2010.

CHABANON, R. M. et al. Mutational landscape and sensitivity to immune checkpoint blockers. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 17, p. 4309–4321, 2016.

CHAN, A. C. Normal plasma vitamin E concentration. **The Biochemical journal**, v. 260, n. 2, p. 623, 1989.

CHEN, C. S. et al. Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: Identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 1278–1285, 2004.

CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the Presence of H2 Histocompatibility Antigens in Ehrlich Ascites Tumour Cells. **Nature Publishing Group**, v. 228, p. 726–734, 1970.

CHIMAL-RAMÍREZ, G. K.; ESPINOZA-SÁNCHEZ, N. A.; FUENTES-PANANÁ, E. M. Protumor activities of the immune response: Insights in the mechanisms of immunological shift, oncotraining, and oncopromotion. **Journal of Oncology**, v. 2013, 2013.

CHOUDHURY, R. C.; JAGDALE, M. B. Vitamin E protection from/potential of the cytogenetic toxicity of cisplatin in Swiss mice. **Journal of Chemotherapy**, v. 14, n. 4, p. 397–405, 2002.

CHUNG, B. M.; ROTTY, J. D.; COULOMBE, P. A. Networking galore: Intermediate filaments and cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 25, n. 5, p. 600–612, 2013.

CHUNG, M. Y. et al. Dietary α - and γ -tocopherol supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory-related responses in an obese mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1200–1206, 2010.

CLAYCOMBE, K. J.; MEYDANI, S. N. Vitamin E and genome stability. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 475, n. 1–2, p. 37–44, 2001.

COFFEY, J. C. et al. Excisional surgery for cancer cure: Therapy at a cost. **Lancet Oncology**, v. 4, n. 12, p. 760–768, 2003.

COLOMBO, M. L. An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2103–2113, 2010.

CONSTANTINO, C.; CHARALAMBOUS, C.; KANAKIS, D. Vitamin E and cancer:

an update on the emerging role of γ and δ tocotrienols. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 845–857, 2020.

CONSTANTINO, C.; PAPAS, A.; CONSTANTINO, A. I. Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 4, p. 739–752, 2008.

COPE, A. et al. The Th1 life cycle: Molecular control of IFN- γ to IL-10 switching. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 6, p. 278–286, 2011.

COSTA, D. S. J. et al. The Impact of Cancer on Psychological and Social Outcomes. **Australian Psychologist**, v. 51, n. 2, p. 89–99, 2016.

CRAFT, N.; EZRA, N.; OCHOA, M. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 248, 2010.

DA FONSECA, G. W. P. et al. Cancer cachexia and related metabolic dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 1–19, 2020.

DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. An Experimental Study on the Lymphatic Dissemination of the Soud Ehrlich Tumor in Mice. **Braz. J. vet Res. anim. Sci**, v. 29, n. 1, p. 97–103, 1992.

DAS GUPTA, S.; SUH, N. Tocopherols in cancer: An update. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 6, p. 1354–1363, 2016.

DEBELJAK, N.; SOLÁR, P.; SYTKOWSKI, A. J. Erythropoietin and cancer: The unintended consequences of anemia correction. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–14, 2014.

DELON, I.; BROWN, N. H. Integrins and the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 1, p. 43–50, 2007.

DENNIS, K. L. et al. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, n. 6, p. 637–645, 2013.

DESAI, R.; COXON, A. T.; DUNN, G. P. Therapeutic applications of the cancer immunoediting hypothesis. **Seminars in Cancer Biology**, n. February, 2021a.

DESAI, R.; COXON, A. T.; DUNN, G. P. Therapeutic applications of the cancer immunoediting hypothesis. **Seminars in Cancer Biology**, n. March, 2021b.

DESANTIS, C. E. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 4, p. 252–271, 2014.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 2008.

DHATCHINAMOORTHY, K.; COLBERT, J. D.; ROCK, K. L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, 2021.

DICATO, M.; PLAWNY, L. Erythropoietin in cancer patients: Pros and cons. **Current Opinion in Oncology**, v. 22, n. 4, p. 307–311, 2010.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (United Kingdom)**, v. 36, n. 3, p. 134–138, 2018.

DIEDERICH, M.; MORCEAU, F.; DICATO, M. Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: Regarding molecular mechanisms of erythropoiesis. **Mediators of Inflammation**, v. 2009, n. II, 2009.

DOI, K. et al. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. **Cancer**, v. 77, n. 8 SUPPL., p. 1598–1604, 1996.

DONG, L. F. et al. Vitamin E analogues inhibit angiogenesis by selective induction of apoptosis in proliferating endothelial cells: The role of oxidative stress. **Cancer Research**, v. 67, n. 24, p. 11906–11913, 2007.

DREHER, M. L. Pistachio nuts: Composition and potential health benefits. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 4, p. 234–240, 2012.

DROZ, N. et al. Kinetic profiles and management of hepatitis B virus reactivation in patients with immune-mediated inflammatory diseases. **Arthritis Care and Research**, v. 65, n. 9, p. 1504–1514, 2013.

DUPAGE, M. et al. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 405–409, 2012.

E. GERBER, L. Physiobiochemical Significance of Vitamin E and other Tocopherols in the U.S. Diet: Cancer Promoters or Preventers? **Journal of Physiobiochemical Metabolism**, v. 01, n. 01, p. 28–30, 2012.

EID, R. A. et al. Old-School Chemotherapy in Immunotherapeutic Combination in Cancer, A Low-cost Drug Repurposed. **Cancer Immunology Research**, v. 4, n. 5, p. 377–382, 2016.

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, n. 11, p. 638–647, 2009.

ESFAHANI, K. et al. A review of cancer immunotherapy: From the past, to the present, to the future. **Current Oncology**, v. 27, n. S2, p. 87–97, 2020.

FADEL, M. A. et al. Preventing of Ehrlich tumor metastasis in liver, kidney and spleen by electromagnetic field. **International Journal of Physical Sciences**, v. 5, n. 13, p. 2057–2065, 2010.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011.

FEERICK, C. L., LYNCH, K., KRAWCZYK, J., O'DWYER, M., & RYAN, A. Low Dose Cyclophosphamide in Combination with Elotuzumab - a Novel Immunotherapeutic Strategy for Multiple Myeloma. **Blood**, v. 138, 2021.

FEITOSA, I. B. et al. What are the immune responses during the growth of Ehrlich's tumor in ascitic and solid form? **Life Sciences**, v. 264, n. June 2020, p. 118578, 2021.

FENG, Z. et al. α -Tocopherol is an effective Phase II enzyme inducer: Protective effects on acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human retinal pigment epithelial cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1222–1231, 2010.

FERNANDES, P. D. et al. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 83–89, 2015.

FIFE, C. M.; MCCARROLL, J. A.; KAVALLARIS, M. Movers and shakers: Cell cytoskeleton in cancer metastasis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 24, p. 5507–5523, 2014.

FINN, O. J. Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. **Annals of Oncology**, v. 23, n. SUPPL.8, p. viii6–viii9, 2012.

FISCHER, T.; HAYN, A.; MIERKE, C. T. Effect of Nuclear Stiffness on Cell Mechanics and Migration of Human Breast Cancer Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. May, p. 1–18, 2020.

FITCH, D.; DRAKE, R. Status E as an erythropoietic. p. 2386–2393, [s.d.].

FLESHNER, N. E. et al. Progression from high-grade prostatic intraepithelial neoplasia to cancer: A randomized trial of combination vitamin-E, soy, and selenium. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 17, p. 2386–2390, 2011.

FRAJACOMO, F. T. T. et al. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. **Life Sciences**, v. 162, p. 47–53, 2016.

GALLO, G. Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis Vitamin E in Vitro Action on Horse Red Blood Cell Membranes from Rest and Exercised Horses: Modulation of Membrane Fluidity and Glutathione Peroxidase Activity. n. November, 2021.

GANDALOVIČOVÁ, A. et al. Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 6, p. 391–406, 2017.

GAUTAM, M. et al. Immunomodulatory activity of *Asparagus racemosus* on systemic Th1/Th2 immunity: Implications for immunoadjuvant potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 241–247, 2009.

GAZIANO, J. M. et al. Multivitamins in the prevention of cancer in men: The physicians' health study II randomized controlled trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 308, n. 18, p. 1871–1880, 2012.

GEORGE, S.; ABRAHAMSE, H. Redox potential of antioxidants in cancer progression and prevention. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1–21, 2020.

GHIRINGHELLI, F. et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 2, p. 336–344, 2004.

GHOSH, D.; DAS, U. B.; MISRO, M. Protective role of α -tocopherol-succinate (Provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: A correlative approach to oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 36, n. 11, p. 1209–1218, 2002.

GOGOS, C. A. et al. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy: A randomized control trial. **Cancer**, v. 82, n. 2, p. 395–402, 1998.

GRANGE, C. et al. Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation. **Journal of Immunological Methods**, v. 372, n. 1–2, p. 119–126, 2011.

GRISHAGIN, I. V. Automatic cell counting with ImageJ. **Analytical Biochemistry**, v. 473, p. 63–65, 2015.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

HAMSA, T. P.; KUTTAN, G. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-tumor effect of *Ipomoea obscura* (L) and its mode of action through the inhibition of pro inflammatory cytokines, nitric oxide and COX-2. **Inflammation**, v. 34, n. 3, p. 171–183, 2011.

HAN, S. N. et al. Vitamin E supplementation increases T helper 1 cytokine production in old mice infected with influenza virus. **Immunology**, v. 100, n. 4, p. 487–493, 2000.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANSON, M. G. V. et al. A short-term dietary supplementation with high doses of vitamin e increases NK cell cytolytic activity in advanced colorectal cancer patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 7, p. 973–984, 2007.

HARTIG, S. M. Basic image analysis and manipulation in imageJ. **Current Protocols in Molecular Biology**, n. SUPPL.102, p. 1–12, 2013.

HARTMANN, A. et al. DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single-cell gel test (comet assay). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, n. 3, p. 180–187, 1995.

HELFINGER, V.; SCHRÖDER, K. Redox control in cancer development and progression. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 63, n. January, p. 88–98, 2018.

HINRICHS, C. S.; ROSENBERG, S. A. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. **Immunological Reviews**, v. 257, n. 1, p. 56–71, 2014.

HIRANO, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. **International immunology**, v. 33, n. 3, p. 127–148, 2021.

HORST, D. et al. Viral evasion of T cell immunity: Ancient mechanisms offering new applications. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 1, p. 96–103, 2011.

HOUSSIAU, F. A. et al. The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 1, p. 61–64, 2010.

HU, H. G.; LI, Y. M. Emerging Adjuvants for Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, n. July, p. 1–7, 2020.

IQUBAL, A. et al. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. **Life Sciences**, v. 218, n. December 2018, p. 112–131, 2019.

JIANG, Q. Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 72, p. 76–90, 2014.

JIANG, Q. et al. Gamma-tocopherol, a major form of vitamin E in diets: Insights into antioxidant and anti-inflammatory effects, mechanisms, and roles in disease management. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 178, n. November 2021, p. 347–359, 2022.

JILANI, T.; IQBA, M. P. Does vitamin e have a role in treatment and prevention of anemia's? **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 2, p. 237–242, 2011.

JIMÉNEZ, A. et al. Symptom clusters in advanced cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 42, n. 1, p. 24–31, 2011.

JOY, M. E. et al. A high-content, multiplexed screen in human breast cancer cells identifies profilin-1 inducers with anti-migratory activities. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–12, 2014.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. 1–8, 2014.

K, K.; M, C. **Specificity, Function, and Development of NK cells**. [s.l: s.n.]. v. 28

KABIRAI, A. et al. Chemical carcinogenesis: A brief review on mechanism & metabolism. **Journal of Oral Medicine, Oral Surgery, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 6, n. 3, p. 120–124, 2020.

KALISH, S. V. et al. Macrophages Reprogrammed In Vitro Towards the M1 Phenotype and Activated with LPS Extend Lifespan of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. **Medical science monitor basic research**, v. 21, p. 226–234, 2015.

KANNAPPAN, R. et al. Tocotrienols fight cancer by targeting multiple cell signaling pathways. **Genes and Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 43–52, 2012.

KASTEN, F. H. Paul Ehrlich: Pathfinder in cell biology 1. Chronicle of his life and accomplishments in immunology, cancer research, and chemotherapy: Paul Ehrlich's recipe for success: "Patience, ability, money and luck". **Biotechnic and Histochemistry**, v. 71, n. 1, p. 2–37, 1996.

KHURANA, R. K. et al. Administration of antioxidants in cancer: debate of the decade. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 4, p. 763–770, 2018.

KIDD, P. 10.1.1.333.4347.Pdf. **Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic**, v. 8, n. 3, p. 223–46, 2003.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 38, n. 1, p. 96–109, 2010.

KNIGHT, K.; WADE, S.; BALDUCCI, L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: A systematic review of the literature. **American Journal of Medicine**, v. 116, n. 7 SUPPL. 1, p. 11–26, 2004.

KOCH, J. et al. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 4, p. 182–191, 2013.

KÖNIG, J. et al. Radiotherapy effects on early breast cancer survival in observational and

randomized studies: a systematic analysis of advantages, disadvantages and differences between the two study types. **Breast Cancer**, v. 23, n. 3, p. 415–424, 2016.

KUDERER, N. M. et al. Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients. **Cancer**, v. 106, n. 10, p. 2258–2266, 2006.

KUEH, H. Y.; MITCHISON, T. J. Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 960–963, 2009.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. 469–471, 2018.

LAI, Y. J. et al. The role of micronutrient and immunomodulation effect in the vaccine era of COVID-19. **Journal of the Chinese Medical Association : JCMA**, v. 84, n. 9, p. 821–826, 2021.

LEE, H. M.; MOON, A. Amygdalin regulates apoptosis and adhesion in Hs578T triple-negative breast cancer cells. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 24, n. 1, p. 62–66, 2016.

LEHMANN, A. D. et al. An in vitro triple cell co-culture model with primary cells mimicking the human alveolar epithelial barrier. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 398–406, 2011.

LEWIS, E. D.; MEYDANI, S. N.; WU, D. Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. **IUBMB Life**, v. 71, n. 4, p. 487–494, 2019.

LI, C. et al. Comparison and analysis of fatty acids, sterols, and tocopherols in eight vegetable oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12493–12498, 2011.

LIN, S. R. et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 6, p. 1409–1423, 2020.

LIPPMAN, S. M. et al. Effect of Selenium and Vitamin E on Risk of Prostate Cancer and Other Cancers. **Jama**, v. 301, n. 1, p. 39, 2009.

LIU, C. Y. et al. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. **Laboratory Investigation**, v. 93, n. 7, p. 844–854, 2013.

LIU, F. et al. The cyclophosphamide metabolite, acrolein, induces cytoskeletal changes and oxidative stress in Sertoli cells. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 1, p. 493–500, 2012.

MABUCHI, S. et al. Pretreatment leukocytosis is an indicator of poor prognosis in patients with cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 122, n. 1, p. 25–32, 2011.

MAEDA, H. et al. Vascular permeability enhancement in solid tumor: Various factors, mechanisms involved and its implications. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 3, p. 319–328, 2003.

MAGNI, B. M. et al. Induction of Cyclophosphamide-Resistance. p. 1097–1103, [s.d.].

MAHABADY, M. K. et al. Prophylactic effects of melatonin on sodium valproate-induced neural tube defects and skeletal malformations in rat embryos. **American Journal of Applied Sciences**, v. 8, n. 5, p. 413–419, 2011.

MANNINO, M. H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, p. 103–107, 2015.

MANTOVANI, G. et al. Cancer-related anorexia/cachexia syndrome and oxidative stress: An innovative approach beyond current treatment. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 13, n. 10, p. 1651–1659, 2004.

MARKO, M. G. et al. Age-Associated Decline in Effective Immune Synapse Formation of CD4 + T Cells Is Reversed by Vitamin E Supplementation . **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 3, p. 1443–1449, 2007.

MARKO, M. G. et al. Vitamin E reverses impaired linker for activation of T cells activation in T cells from aged C57BL/6 mice. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 6, p.

1192–1197, 2009.

MEOTTI, F. C. et al. Antagonism of the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) attenuates hyperalgesia and urinary bladder overactivity in cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, n. 2, p. 440–447, 2013.

MERLO, L. M. F. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 12, p. 924–935, 2006.

MEYDANI, S. N. et al. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects: A randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 277, n. 17, p. 1380–1386, 1997.

MIJATOVIĆ, S. et al. The double-faced role of nitric oxide and reactive oxygen species in solid tumors. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, 2020.

MIRANDA-FILHO, A. et al. The world cancer patient population (WCPP): An updated standard for international comparisons of population-based survival. **Cancer Epidemiology**, v. 69, n. January, p. 3–6, 2020.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2001.

MITTAL, D. et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. **Current Opinion in Immunology**, v. 27, n. 1, p. 16–25, 2014.

MOCCHEGIANI, E. et al. Vitamin E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: Implications for treatment. A systematic review. **Ageing Research Reviews**, v. 14, n. 1, p. 81–101, 2014.

MOGHADAMYEGHANEH, Z. et al. Preoperative leukocytosis in colorectal cancer patients. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 221, n. 1, p. 207–214, 2015.

- MOHEBBI, E. et al. Iran Cancer Statistics in 2012 and projection of cancer incidence by 2035. **Basic & Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 3, p. 3–22, 2017.
- MOKBEL, K.; MOKBEL, K. Chemoprevention of Breast Cancer With Vitamins and Micronutrients: A Concise Review. **In Vivo**, v. 33, n. 4, p. 983–997, 2019.
- MOLANO, A.; MEYDANI, S. N. Vitamin E, signalosomes and gene expression in T cells. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 55–62, 2012.
- MOLFINO, A. et al. Timing of antioxidant supplementation is critical in improving anorexia in an experimental model of cancer. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 5, p. 570–574, 2013.
- MORGAN, J.; FULLERTON, R.; BEDI, C. Treatment of locally recurrent and advanced breast cancer. **Surgery (Oxford)**, p. 1–5, 2021.
- MORIGUCHI, S. S. Long-Term the Feeding Decreased Splenic of High Mitogen Lymphocytes Vitamin Response with E Diet Aging Improves of Rat Sakiyo SAKAI and Satoru MORIGUCHI * Department of Nutrition , School of Medicine , The University of Tokushima , under. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**, v. 43, p. 113–122, 1997.
- MOTOYOSHI, Y. et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. **Oncology Reports**, v. 16, n. 1, p. 141–146, 2006.
- MOURÃO, D. M. et al. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 4, p. 529–539, 2005.
- MOWEN, K. A.; GLIMCHER, L. H. Signaling pathways in Th2 development. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 203–222, 2004.
- MUELLER, L. M. Cancer in the tropics: geographical pathology and the formation of cancer epidemiology. **BioSocieties**, v. 14, n. 4, p. 512–528, 2019.
- MUFAZALOVA, N. A. et al. Effects of T-activin and vitamin E on toxicity and antitumor activity of cyclophosphamide. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 137,

n. 1, p. 37–39, 2004.

MUMM, J. B. et al. IL-10 Elicits IFN γ -Dependent tumor immune surveillance. **Cancer Cell**, v. 20, n. 6, p. 781–796, 2011.

MURAILLE, E.; LEO, O.; MOSER, M. Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–12, 2014.

NARAYAN, V. M. Radiotherapy With or Without Chemotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer. **50 Studies Every Urologist Should Know**, p. 147–152, 2021.

NECHUTA, S. et al. Vitamin supplement use during breast cancer treatment and survival: A prospective cohort study. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 20, n. 2, p. 262–271, 2011.

NEUZIL, J. et al. Selective cancer cell killing by α -tocopheryl succinate. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 1, p. 87–89, 2001.

NGUYEN, D. X.; MASSAGUÉ, J. Genetic determinants of cancer metastasis. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 341–352, 2007.

NICOLINI, A. et al. Malnutrition, anorexia and cachexia in cancer patients: A mini-review on pathogenesis and treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 67, n. 8, p. 807–817, 2013.

NIKI, E. Role of vitamin e as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: In vitro and in vivo evidence. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 3–12, 2014.

NISHIMURA, T. et al. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 46, n. SUPPL., p. 52–61, 2000.

NOURREDDINE, S. et al. NF45 and NF90 Regulate Mitotic Gene Expression by Competing with Staufen-Mediated mRNA Decay. **Cell Reports**, v. 31, n. 7, 2020.

- OH, S. J.; SANTY, L. C. Differential effects of cytohesins 2 and 3 on $\beta 1$ integrin recycling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14610–14616, 2010.
- OHL, K.; TENBROCK, K. Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. October, p. 1–7, 2018.
- OHNISHI, S. et al. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.
- OTT, J. J. et al. Global cancer incidence and mortality caused by behavior and infection. **Journal of Public Health**, v. 33, n. 2, p. 223–233, 2011.
- PAE, M.; MEYDANI, S. N.; WU, D. The role of nutrition in enhancing immunity in aging. **Aging and Disease**, v. 3, n. 1, p. 91–129, 2012.
- PAPAIIOANNOU, N. E. et al. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 14, 2016.
- PATIL, P.; GENDLEY, M.; PATIL, M. Immunity augmentation through nutritional approach in animals: A review. ~ 232 ~ **The Pharma Innovation Journal**, v. 10, n. 5, p. 10, 2021.
- PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 2016.
- PAWELEC, G. et al. The conundrum of human immune system “senescence”. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 192, n. September, 2020.
- PEKMEZCI, D. **Vitamin E and Immunity**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 86
- PHILIP, M.; SCHIETINGER, A. Heterogeneity and fate choice: T cell exhaustion in cancer and chronic infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 58, p. 98–103, 2019.
- PIJUAN, J. et al. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. JUN, p. 1–16, 2019.

PLUMMER, M. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 9, p. e609–e616, 2016.

POVIRK, L. F.; SHUKER, D. E. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 318, n. 3, p. 205–226, 1994.

PRATHEESHKUMAR, P. et al. Cancer Prevention with Promising Natural Products: Mechanisms of Action and Molecular Targets. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1159–1184, 2012.

QIU, M. Z. et al. Incidence of anemia, leukocytosis, and thrombocytosis in patients with solid tumors in China. **Tumor Biology**, v. 31, n. 6, p. 633–641, 2010.

QUEZADA, S. A. et al. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: From tumor tolerance to eradication. **Immunological Reviews**, v. 241, n. 1, p. 104–118, 2011.

RAMACHANDRAN VINITHA, MUTHUSAMY THANGARAJU, P. S. Effect of administering cyclophosphamide and vitamin E on the levels of tumor-marker enzymes in rats with experimentally induced fibrosarcoma. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 1995, n. 1, p. 145–156, 1995.

RAVASCO, P. Nutrition in cancer patients. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 8, p. 1–13, 2019.

REAGAN-SHAW, S. et al. Combination of vitamin E and selenium causes an induction of apoptosis of human prostate cancer cells by enhancing Bax/Bcl-2 ratio. **Prostate**, v. 68, n. 15, p. 1624–1634, 2008.

REBOUL, E. et al. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8749–8755, 2006.

REDDEL, R. R. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis.

Carcinogenesis, v. 21, n. 3, p. 477–484, 2000.

REITER, E.; JIANG, Q.; CHRISTEN, S. Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, n. 5–6, p. 668–691, 2007.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.

RIDLEY, A. J. et al. Cell Migration : Integrating Signals from Front to Back Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3835875> Cell Migration : Integrating Signals from Front to Back. v. 302, n. 5651, p. 1704–1709, 2016.

RODRIGUES, J. A. G. et al. Avaliação toxicológica in vivo de polissacarídeo sulfatado bruto da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* em camundongos Swiss. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 35, n. 4, p. 603–610, 2013.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, H. et al. Obesity and inflammation: Epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, 2013.

SABAT, R. IL-10 family of cytokines. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 5, p. 315–324, 2010.

SAHAI, E. Mechanisms of cancer cell invasion. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 15, n. 1, p. 87–96, 2005.

SAHAI, E.; OLSON, M. F.; MARSHALL, C. J. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. **EMBO Journal**, v. 20, n. 4, p. 755–766, 2001.

SAILO, B. L. et al. Tocotrienols: The promising analogues of vitamin E for cancer therapeutics. **Pharmacological Research**, v. 130, p. 259–272, 2018.

SARMIENTO-SALINAS, F. L. et al. Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis,

cancer cell signaling and tumor progression. **Life Sciences**, v. 284, n. June, 2021.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011.

SENOVILLA, L. et al. Immunosurveillance as a regulator of tissue homeostasis. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 10, p. 471–481, 2013.

SERNA-THOME, G. et al. Use of functional foods and oral supplements as adjuvants in cancer treatment. **Revista de Investigacion Clinica**, v. 70, n. 3, p. 136–146, 2018.

SHKLAR, G. et al. Prevention of experimental cancer and immunostimulation by vitamin E (immunosurveillance). **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 19, n. 2, p. 60–64, 1990.

SILVA, 11. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA. **Acesso a informação**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/acesso-a-informacao/despesas>>.

SLATORE, C. G. et al. Long-term use of supplemental multivitamins, vitamin C, vitamin E, and folate does not reduce the risk of lung cancer. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 177, n. 5, p. 524–530, 2008.

SMOLAREK, A. K.; SUH, N. Chemopreventive activity of vitamin e in breast cancer: A focus on γ - and δ -tocopherol. **Nutrients**, v. 3, n. 11, p. 962–986, 2011.

SOLDATI, L. et al. The influence of diet on anti-cancer immune responsiveness. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2018.

STANILOV, N. et al. Advanced colorectal cancer is associated with enhanced IL-23 and IL-10 serum levels. **Laboratory Medicine**, v. 41, n. 3, p. 159–163, 2010.

STANKOV, K. et al. Alpha-tocopheryl succinate (α -TOS) influences cell vitality and enzyme activity in Ehrlich ascites carcinoma cells. **Archive of Oncology**, v. 15, n. 3–4,

p. 65–68, 2007.

STROUHALOVA, K. et al. Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2020.

TARVER, T. Cancer Facts & Figures 2012. American Cancer Society (ACS). **Journal of Consumer Health On the Internet**, v. 16, n. 3, p. 366–367, 2012.

TAS, F. et al. Anemia in oncology practice: Relation to diseases and their therapies. **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**, v. 25, n. 4, p. 371–379, 2002.

THOMPSON, M. D.; COONEY, R. V. The Potential Physiological Role of γ -Tocopherol in Human Health: A Qualitative Review. **Nutrition and Cancer**, v. 72, n. 5, p. 808–825, 2020.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 443–452, 2007.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116–129, 2010.

VAUGHAN-SHAW, P. G. et al. Whether vitamin D supplementation protects against colorectal cancer risk remains an open question. **European Journal of Cancer**, v. 115, p. 1–3, 2019.

VERNIERI, C. et al. Diet and supplements in cancer prevention and treatment: Clinical evidences and future perspectives. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 123, n. December 2016, p. 57–73, 2018.

VIEIRA, A. O. AND P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10 Anne. **FOCUS ON CYTOKINES & CYTOKINE THERAPIES**, v. 7, n. June, p. 425–428, 2007.

VOELCKER, G. The mechanism of action of cyclophosphamide and its consequences

for the development of a new generation of oxazaphosphorine cytostatics. **Scientia Pharmaceutica**, v. 88, n. 4, p. 1–13, 2020.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 340, n. 6127, p. 1546–1558, 2013.

WADA, S. et al. Cyclophosphamide augments antitumor immunity: Studies in an autochthonous prostate cancer model. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4309–4318, 2009.

WAHBA, H. A.; EL-HADAAD, H. A. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. **Cancer Biology and Medicine**, v. 12, n. 2, p. 106–116, 2015.

WANG, H.; GEIER, M. S.; HOWARTH, G. S. Prebiotics: A Potential Treatment Strategy for the Chemotherapy-damaged Gut? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 946–956, 2016.

WANG, W. S. et al. Overexpression of the thymosin β -4 gene is associated with increased invasion of SW480 colon carcinoma cells and the distant metastasis of human colorectal carcinoma. **Oncogene**, v. 23, n. 39, p. 6666–6671, 2004.

WEISS, G.; GANZ, T.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of inflammation. **Blood**, v. 133, n. 1, p. 40–50, 2019.

WHITESIDE, T. L. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 4, p. 327–334, 2012.

WILCOX, R. A. Cancer-associated myeloproliferation: Old association, new therapeutic target. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, n. 7, p. 656–663, 2010.

WOGAN, G. N. et al. Environmental and chemical carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, n. 6, p. 473–486, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. No Title. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO fact sheets, 2021**. Disponível em:

<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>>.

WU, D.; MEYDANI, S. Age-Associated Changes in Immune Function: Impact of Vitamin E Intervention and the Underlying Mechanisms. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 14, n. 4, p. 283–289, 2014.

YANG, C. S. et al. Vitamin E and cancer prevention: Studies with different forms of tocopherols and tocotrienols. **Molecular Carcinogenesis**, v. 59, n. 4, p. 365–389, 2020.

YUEN, R. C.-F.; TSAO, S.-Y. Embracing cancer immunotherapy with vital micronutrients. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 9, p. 712–724, 2021.

ZHAO, S. et al. Serum IL-10 predicts worse outcome in cancer patients: A meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2015.

ZHAO, Y. et al. Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro. **Biofabrication**, v. 6, n. 3, 2014.

ZHENG, L. et al. Gamma tocopherol, its dimmers, and quinones: Past and future trends. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 22, p. 3916–3930, 2020.

ZITVOGEL, L. et al. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 74–88, 2013.

Apêndice

Hindawi
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2018, Article ID 3161045, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/3161045>



Research Article

Antileishmanial and Immunomodulatory Effect of Babassu-Loaded PLGA Microparticles: A Useful Drug Target to *Leishmania amazonensis* Infection

Mayara Cristina Pinto da Silva,¹ Jefferson Mesquita Brito,¹ Amalia dos Santos Ferreira,² Andre Alvares Marques Vale,¹ Ana Paula Azevedo dos Santos¹,¹ Lucilene Amorim Silva,¹ Paulo Vitor Socio Pereira,¹ Flavia Raquel Fernandes Nascimento,¹ Roberto Nicolette¹,³ and Rosane Nassar Meireles Guerra¹

¹Laboratory of Immunophysiology, Department of Pathology, Center of Biological and Health Sciences, Federal University of Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

²Oswaldo Cruz Foundation, Rondonia, 76812-245 Porto Velho, RO, Brazil

³Oswaldo Cruz Foundation, Ceara, 61760-000 Eusébio, CE, Brazil

Correspondence should be addressed to Rosane Nassar Meireles Guerra; roguerra@globo.com

Received 20 January 2018; Revised 3 May 2018; Accepted 16 May 2018; Published 25 June 2018

Academic Editor: Caigan Du

Copyright © 2018 Mayara Cristina Pinto da Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The immunological and the anti-*Leishmania amazonensis* activity of babassu-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) [PLGA] microparticles was evaluated. The anti-*Leishmania* activity was evaluated against promastigotes or amastigotes forms, in Balb/c macrophages. The size of the microparticles ranged from 3 to 6.4 μm , with a zeta potential of -25 mV and encapsulation efficiency of 48%. The anti-*Leishmania* activity of the PLGA microparticles loaded with the aqueous extract of babassu mesocarp (MMP) (IC_{50}) was 10-fold higher than that free extract (Meso). MMP exhibited overall bioavailability and was very effective in eliminating intracellular parasites. MMP also reduced *ex vivo* parasite infectivity probably by the increased production of nitric oxide, hydrogen peroxide, and $\text{TNF-}\alpha$ indicating the activation of M1 macrophages. The overexpression of $\text{TNF-}\alpha$ did not impair cell viability, suggesting antiapoptotic effects of MMP. In conclusion, babassu-loaded microparticles could be useful for drug targeting in the treatment of leishmaniasis, due to the immunomodulatory effect on macrophage polarization and the increased efficacy as an anti-*Leishmania* product after the microencapsulation. These findings are of great relevance since the development of new drugs for the treatment of neglected diseases is desirable, mainly if we consider the high morbidity and mortality rates of leishmaniasis worldwide.

1. Introduction

Leishmaniasis is a protozoan infection that is transmitted by a sandfly bite to man and other vertebrates. According to the World Health Organization leishmaniasis is considered one of the most important neglected diseases, since it is endemic in 84 countries, with high prevalence in tropical areas of the world [1].

The currently available treatments for leishmaniasis have been considered unsatisfactory because of the high prevalence of parasite resistance and high toxicity [2–4]. For

this reason, different groups have been investigating new approaches and novel treatments in an attempt to discover products and formulations with anti-*Leishmania* activity that are, at the same time, safe and effective, to be used instead of the conventional treatment or concomitantly as an adjuvant therapy [5–7].

Ethnobotanical data have shown the use of babassu mesocarp both as food and as medicine for the treatment of inflammation, gastric ulcers, rashes, and vulvovaginitis [8]. The aqueous extract of babassu mesocarp possesses several therapeutic effects already proven in preclinical trials such as

Research Article

Could Increased Expression of Hsp27, an “Anti-Inflammatory” Chaperone, Contribute to the Monocyte-Derived Dendritic Cell Bias towards Tolerance Induction in Breast Cancer Patients?

Ana Paula Silva de Azevedo-Santos¹,¹ Mirtes Castelo Branco Rocha,¹
Sulayne Janayna Araujo Guimarães,¹ André Alvares Marques Vale,¹ Fabio Martins Laginha,²
Flavia Raquel F. Nascimento,¹ Maria Aparecida Nagai,³ Patrícia C. Bergami-Santos,⁴
and José Alexandre Marzagão Barbuto⁴

¹Biological and Health Sciences Center, Federal University of Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, Brazil

²Pérola Byington Hospital, Avenida Brigadeiro Luis Antonio, 683 São Paulo, Brazil

³The State of São Paulo Cancer Institute (ICESP), Avenida Dr. Arnaldo, 251 São Paulo, Brazil

⁴Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730 São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana Paula Silva de Azevedo-Santos; apsazevedo@yahoo.com.br

Received 17 May 2019; Revised 22 August 2019; Accepted 1 October 2019; Published 18 November 2019

Guest Editor: Luisa Cervantes-Barragan

Copyright © 2019 Ana Paula Silva de Azevedo-Santos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Dendritic cells (DCs) are the most efficient *antigen-presenting cells* and link the innate immune sensing of the environment to the initiation of adaptive immune responses, which may be directed to either acceptance or elimination of the recognized antigen. In cancer patients, though DCs would be expected to present tumor antigens to T lymphocytes and induce tumor-eliminating responses, this is frequently not the case. The complex tumor microenvironment subverts the immune response, blocks some effector mechanisms, and drives others to support tumor growth. Chronic inflammation in a tumor microenvironment is believed to contribute to the induction of such regulatory/tolerogenic response. Among the various mediators of the modulatory switch in chronic inflammation is the “antidanger signal” chaperone, heat shock protein 27 (Hsp27), that has been described, interestingly, to be associated with cell migration and drug resistance of breast cancer cells. Thus, here, we investigated the expression of Hsp27 during the differentiation of monocyte-derived DCs (Mo-DCs) from healthy donors and breast cancer patients and evaluated their surface phenotype, cytokine secretion pattern, and lymphostimulatory activity. Surface phenotype and lymphocyte proliferation were evaluated by flow cytometry, interferon- γ (IFN- γ), and interleukin-10 (IL-10) secretion, by ELISA and Hsp27 expression, by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Mo-DCs from cancer patients presented decreased expression of DC maturation markers, decreased ability to induce allogeneic lymphocyte proliferation, and increased IL-10 secretion. In coculture with breast cancer cell lines, healthy donors’ Mo-DCs showed phenotype changes similar to those found in patients’ cells. Interestingly, patients’ monocytes expressed less GM-CSF and IL-4 receptors than healthy donors’ monocytes and Hsp27 expression was significantly *higher* in patients’ Mo-DCs (and in tumor samples). Both phenomena could contribute to the phenotypic bias of breast cancer patients’ Mo-DCs and might prove potential targets for the development of new immunotherapeutic approaches for breast cancer.

1. Introduction

Dendritic cells (DCs) are mononuclear phagocytes, specialized in antigen presentation to naïve T cells and, consequently, to initiation and control of immunity in immunogenic or

tolerogenic response [1–3]. In cancer context, DCs are crucial for the induction of a potent immune response; on the other hand, defects in their differentiation/maturation can be favorable to tumor escape [4]. The complex relationship between tumor cells and the host immune

RESEARCH NOTE

Open Access



High dose gabapentin does not alter tumor growth in mice but reduces arginase activity and increases superoxide dismutase, IL-6 and MCP-1 levels in Ehrlich ascites

Plinio da Cunha Leal^{1,3*}, Ed Carlos Rey Moura¹, Rachel Jorge Dino Cossetti¹, Johnny Ramos do Nascimento¹, Izabel Cristina Portela Bogéa Serra¹, Bruno de Paulo Ribeiro¹, Andre Álvares Marques Vale¹, Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos¹, Flavia Raquel Fernandes do Nascimento¹ and Rioko Kimiko Sakata²

Abstract

Objectives: The purpose of this study was to evaluate the effect of gabapentin on Ehrlich tumor growth in Swiss mice, a highly aggressive and inflammatory tumor model. Mice were grouped into sets of 5 animals and treated from days 2 to 8 with gabapentin 30 mg/kg body weight (G30) or 100 mg/kg body weight (G100), or normal sterile saline (control).

Results: The mice were euthanized on day 10. Tumor growth, tumoricidal agents and inflammatory cytokines levels were assessed. At day 10, G30 and G100 mice gained weight, but there were no differences in tumor cell count or in ascites volume. In G100, there was a reduction in arginase and an increase in SOD activities. There was an increase in IL-6 and MCP-1 levels, especially in G100, but no alterations in TNF- α . There was no direct evidence of tumor induction by gabapentin. However, the findings suggest that its use modulates immune response to a more effector and less deleterious profile, with increase in activity of anti-oxidant enzymes and in cytokines that favor activation of macrophages, which could improve the general status of the tumor host.

Keywords: Gabapentin, Tumor growth, Cytokine, Arginine, SOD, Ehrlich tumor

Introduction

Pain is one of the most common and dreaded symptoms in cancer [1]. Guidelines to assist in the management of cancer pain have been developed by the World Health Organization (WHO) more than 20 years ago. They are based on an analgesic ladder, which includes the use of opioid and non-opioid analgesics [2].

Morphine is the most frequently used opioid for the treatment of cancer pain worldwide. However, induction of tumor growth seems to be a potential side effect associated with its use [2]. An interesting option to reduce

total opioid dose is the addition of gabapentin. Gabapentin is a first-line drug for the treatment of neuropathic cancer-related pain and a non-opioid adjuvant in the treatment of nociceptive cancer pain [1, 3, 4].

However, the effect of gabapentin in the activity of arginase and nitric oxide (NO) synthase, essential enzymes for normal and malignant cells growth, proliferation and survival, need to be studied to evaluate a possible pro or anti-tumor effect [5, 6].

Bugan et al. [7] suggest possible detrimental effects of higher doses of gabapentin in tumor angiogenesis and growth. In addition, Câmara et al. [8] demonstrated increased inflammatory response and higher cytokine levels associated to gabapentin use in rats submitted to sciatic nerve constriction.

*Correspondence: pliniocunhaleal@hotmail.com

³ Rua das Boninas, Bloco 2, apartment 1202, condomínio Ile Saint Louis, São Luís, MA 65077-552, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Ruthenium (II) complexes with N, O-chelating proline and threonine ligands cause selective cytotoxicity by the induction of genomic instability, cell cycle arrest and apoptosis in breast and prostate tumor cells



Israel Higino de Sousa^{a,b,*}, Vanessa Niely Soares Campos^c, André Alvares Marques Vale^{d,e}, Vera Lucia Maciel-Silva^{a,b,f}, Celisnolia Moraes Leite^g, Alberto Jorge Oliveira Lopes^{d,h}, Penina Sousa Mourão^h, Francisco das Chagas Alves Lima^h, Alzir Azevedo Batista^g, Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos^e, Marcio Aurélio Pinheiro Almeida^c, Silma Regina Ferreira Pereira^b

^a Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology-BIONORTE, Federal University of Maranhão, Dom Delgado University City, 1966, CEP. 65085-580, São Luís, MA, Brazil

^b Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, Brazil

^c Coordination of Science and Technology, Federal University of Maranhão, Brazil

^d Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão, Brazil

^e Laboratory of Immunology applied to Cancer, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, Brazil

^f Department of Chemistry and Biology, State University of Maranhão, Paul VI campus, CEP 65055970, São Luís, MA, Brazil

^g Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, CP 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

^h Research Group in Computational Quantum Chemistry & Pharmaceutical Planning, State University of Piauí, GPQQ&PF/UESPI, Teresina, PI, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Antitumoral
Cytotoxicity
Genotoxicity
Cell death

ABSTRACT

Ruthenium complexes are being considered as novel chemotherapeutic alternatives for cancer treatment. In our study, we assessed the antitumoral activities of novel ruthenium complexes coupled to the amino acids proline (RuPro) and threonine (RuThr) in prostate tumor cell lines (DU145) and breast (MCF7), and normal cell lines of the lung fibroblast (GM07492A). Our results revealed that the EC₅₀ of the complexes for DU145 and MCF7 was two times lower than that GM07492A. Moreover, RuPro and RuThr were not able to induce significant genomic instability, cell cycle arrest or cell death in GM07492A, but could induce DNA damage, arrest in G2/M and apoptosis in DU145 and MCF7. Furthermore, BAX, TP53 and ATM were found to be upregulated in DU145 and MCF7 treated with RuPro and RuThr, in which, a higher ASCT2 gene expression was also observed. Using molecular docking, RuPro and RuThr interact with ASCT2, suggesting that this transporter might have a pivotal role in the execution of their activities. Hence, our results with RuPro and RuThr are capable of selectively inducing genetic damage, cell cycle arrest and apoptosis in DU145 and MCF7. We suggest that the selective action of the RuPro and RuThr complexes is related to the higher expression of ASCT2 in the tumor cells.

1. Introduction

Although cancer is the second deadliest disease in the world (Ferlay et al., 2015), therapeutic options are still restricted, and some inorganic compounds such as cisplatin and carboplatin are commonly being used for the treatment of several types of cancers. However, due to a series of adverse effects associated with the usage of these platin-based compounds, investigation of new antitumor drugs is ongoing (Alama et al., 2009; Albert et al., 2015). Studies on the complexes of copper, cobalt,

zinc (Pan et al., 2017) and iron (Estrada-Montano et al., 2017) have revealed that they are potentially cytotoxic to different tumor cell lines. Herein, we will focus on ruthenium complexes that have been synthesized and tested for different biological activities, including as promising drugs against several tumor cell lines (Mari et al., 2015; Pages et al., 2015; Adeniyi and Ajibade, 2016).

The antitumor properties of the ruthenium complexes may have different mechanisms of action. These mechanisms generally include mitochondria pathways, death receptor-mediated pathways, and

* Corresponding author at: Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, Brazil.
E-mail address: israelhigino@hotmail.com (I.H. de Sousa).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104679>

Received 16 July 2019; Received in revised form 20 September 2019; Accepted 5 October 2019
Available online 30 October 2019

0887-2333/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

The anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* L. increases the lifespan of diabetic mice with lethal sepsis

Aluísio S. Oliveira, Johnny R. Nascimento, Liana O. Trovão, Patrícia C.S. Alves, Marcia Cristina G. Maciel, Luís Douglas M Silva, André A. Marques, Ana Paula S.A. Santos, Lucilene A. Silva, Flavia Raquel F. Nascimento, Rosane N.M. Guerra*

Laboratory of Immunophysiology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

1. Introduction

Anacardium occidentale L. (family Anacardiaceae), commonly known as the cashew tree, is a native Brazilian species that is widely distributed in the northeastern region of the country, including the State of Maranhão. In addition to its medicinal properties, the plant plays an important economic and social role (Cruz, 1985; Albuquerque, 1989; Lorenzi and Matos, 2002).

Different parts of *A. occidentale* such as the leaves, stem, fruits and flowers have been used to elucidate the different ethnopharmacological applications reported for this species. *Anacardium occidentale* is used in folk medicine to treat infections, inflammatory diseases, diabetes, diarrhea, and hemorrhage (Lorenzi and Matos, 2002). Silva et al. (2016) demonstrated broad antimicrobial activity of the ethanolic extract obtained from the flowers of *A. occidentale*, which is possibly due to the presence of alkaloids, saponins, phenolic compounds, and tannins.

Sepsis is a severe public health problem and the leading cause of death in intensive care units. This condition is characterized by high lethality and it is estimated that over 17 million cases of sepsis occur every year worldwide. During septic shock, endotoxins and exotoxins activate resident endothelial cells and leukocytes. Monocytes and neutrophils increase the production of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α), which results in generalized inflammation associated with infection. Furthermore, the production of nitric oxide (NO) significantly contributes to the progression of sepsis and septic shock, although it is an important mediator of the host defense. Under uncontrolled inflammatory conditions, NO causes severe microvascular damage and dysfunction (Angus and Poll, 2013; Hotchkiss et al., 2013; Lerman and Kim, 2015).

Patients with sepsis frequently have chronic diseases such as diabetes mellitus. These patients are at a constant risk of bacterial colonization, increasing the risk of skin and soft tissue infections and sepsis caused by these microorganisms. It is therefore important to study the elements of the immune response related to both conditions (Kaech et al., 2006; Thomsen et al., 2005; Trevelin et al., 2017).

Considering the *in vitro* antimicrobial potential of *A. occidentale*, our aim was to investigate whether the oral treatment with the ethanolic extract of flowers can control bacterial growth and the systemic inflammatory response observed in sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) of diabetic mice.

2. Material and methods

2.1. Animals

Five-month-old male Swiss mice (n = 12/group) weighing 40 g, obtained from the Central Animal House of the Federal University of Maranhão (UFMA), were used. The animals were maintained at a temperature of 23 $\pm$ 1 °C and humidity of 40–60% under a 12-h light-dark cycle, with free access to water and ration until the time of induction of experimental diabetes. All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of UFMA (Approval No. 23115.009717/2015-10).

2.2. Plant species

Anacardium occidentale flowers were collected at the Campus of UFMA, São Luís, Maranhão, Brazil, and identified at the Ático Seabra Herbarium (voucher n° 1050/SL017213). The flowers were first dried

* Corresponding author. Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Prédio do Integrado, Bloco 1, Sala 1A, CEP: 65085-580, São Luís, Maranhão, Brazil.

E-mail addresses: aso.fama@yahoo.com.br (A.S. Oliveira), john_nyramos@yahoo.com.br (J.R. Nascimento), lianatrovao@hotmail.com (L.O. Trovão), patriciahszfarmacia@outlook.com (P.C.S. Alves), macielmcg@yahoo.com.br (M.C.G. Maciel), luisdouglass@hotmail.com (L.D.M. Silva), andre_amvale@hotmail.com (A.A. Marques), apsazevedo@yahoo.com.br (A.P.S.A. Santos), lucileneamorimsilva@yahoo.com.br (L.A. Silva), roguerra@globo.com (R.N.M. Guerra).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.014>

Received 6 July 2018; Received in revised form 14 February 2019; Accepted 5 March 2019

Available online 11 March 2019

0378-8741 / Published by Elsevier B.V.

Article

Therapeutic Use of *Scoparia dulcis* Reduces the Progression of Experimental Osteoarthritis

Marcus Vinícius Viégas Lima ^{1,2,*} , Abner de Oliveira Freire ¹, Emerson Lucas Frazão Sousa ¹, André Alvares Marques Vale ¹, Alberto Jorge Oliveira Lopes ^{1,3}, Cleydlenne Costa Vasconcelos ¹, Mônica Virginia Viégas Lima-Aragão ¹, Humberto Oliveira Serra ⁴, Rosane Nassar Meireles Guerra Liberio ¹, Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos ¹, Gyl Eanes Barros Silva ^{1,4}, Cláudia Quintino da Rocha ⁵ , Fernando César Vilhena Moreira Lima ⁶ , Maria do Socorro de Sousa Cartágenes ^{1,*} and João Batista Santos Garcia ^{1,*} 

¹ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil; abnerfreire@live.com (A.d.O.F.); e.lucasfrazao@gmail.com (E.L.F.S.); andre_amvale@hotmail.com (A.A.M.V.); lopesajo@gmail.com (A.J.O.L.); cleydlenne@yahoo.com.br (C.C.V.); monicavvl@hotmail.com (M.V.V.L.-A.); roguerra@globo.com (R.N.M.G.L.); apsazevedo@yahoo.com.br (A.P.S.d.A.d.S.); gyleanes@ig.com.br (G.E.B.S.)

² Universidade Ceuma, São Luís 65075-120, Brazil

³ Universidade Federal do Maranhão, Coordenação de Ciências Naturais, Campus Bacabal, São Luís 65080-80, Brazil

⁴ Hospital Universitário Presidente Dutra, São Luís 65020-070, Brazil; hoserra@gmail.com

⁵ Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil; claudiarocha3@yahoo.com.br

⁶ Faculdade Santa Terezinha, São Luís 65045-180, Brazil; fernandovilhena15@gmail.com

* Correspondence: m.viegas.lima@gmail.com (M.V.V.L.); scartagenes@gmail.com (M.d.S.d.S.C.); jbgarcia@uol.com.br (J.B.S.G.); Tel.: +55-(98)-3272-9527 (M.V.V.L.)

Academic Editor: Maria da Graça Costa G. Miguel

Received: 30 July 2019; Accepted: 10 September 2019; Published: 25 September 2019



Abstract: Pain is recognized as one of the main symptoms in knee osteoarthritis and is the main reason why patients seek medical attention. *Scoparia dulcis* has been popularly used to relieve discomfort caused by various painful conditions. The objective of the study is to evaluate the analgesic and anti-inflammatory effect of the crude extract of *S. dulcis*, in an experimental model of osteoarthritis. The experiment was performed with Wistar rats divided into 4 groups with 5 animals each: healthy, saline, crude extract, and meloxicam groups. Knee osteoarthritis was induced by intra-articular injection of sodium mono-iodoacetate. First, clinical parameters of pain were assessed at days 0, 5, 10, 15, and 20 after induction. Second, the potential cyclooxygenase inhibition was evaluated, and the cytokines of the synovial fluid were quantified. An in silico test and Molecular Docking tests were performed. A histopathological evaluation was made on articular cartilage with safranin O staining. The results showed that a 15-day treatment with crude extract reduced edema, spontaneous pain, peripheral nociceptive activity, and proinflammatory cytokines in the synovial fluid. The highest inhibition of cyclooxygenase 2 in the crude extract occurred at 50 µg/mL. The crude extract of *S. dulcis* presents therapeutic potential for the treatment of osteoarthritis due to its anti-inflammatory and anti-nociceptive action.

Keywords: *Scoparia dulcis*; Osteoarthritis; Pain; Inflammation; Treatment

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a chronic, complex disease characterized by loss, alteration and progressive degeneration of cartilage and subchondral bone; reduction of joint space; synovitis; pain, and formation



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science & Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Preparation, characterization and *in vitro* anticancer performance of nanoconjugate based on carbon quantum dots and 5-Fluorouracil

Elaine S.M. Cutrim^a, André A.M. Vale^b, Danilo Manzani^c, Hernane S. Barud^d,
Enrique Rodríguez-Castellón^e, Ana P.S.A. Santos^b, Ana C.S. Alcântara^{a,*}

^a Hybrid and Bionanocomposite Materials Research Group - Bionanos, Universidade Federal do Maranhão, Department of Chemistry, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

^b Laboratory for Applied Cancer Immunology, Universidade Federal do Maranhão, Biological and Health Sciences Center, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

^c São Carlos Institute of Chemistry, Universidade de São Paulo, 13566-590 São Carlos, SP, Brazil

^d Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais, Universidade de Araraquara/Uniar, 14801-320 Araraquara, São Paulo, Brazil

^e Universidad de Málaga, Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, 29071 Málaga, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Carbon quantum dots
5-Fluorouracil
Drug delivery systems
Cancer therapy
Biomedical applications

ABSTRACT

This study is focused on the development of a nanodevice for loading and release of 5-Fluorouracil (5-FU) with a view to improving its therapeutic efficiency, using as strategy the fabrication of a nanoconjugate through drug anchorage on the surface of carbon quantum dots (CQD). Several physicochemical and analytical techniques were employed to obtain information about materials morphology, structure, and optical properties. The results indicated that the interactions between both entities resulted in good physicochemical properties and photostability. Acid pH favored drug release, indicating a tendency to release 5-FU from 5-FU-CQD into the tumor microenvironment. The cytotoxicity of CQD and 5-FU-CQD nanoconjugate was evaluated against normal human lung fibroblast (GM07492A) and human breast cancer (MCF-7) cell lines. The CQD was non-toxic, indicating that these materials are biocompatible and can be used as a nanocarrier for 5-FU in biological systems. For the 5-FU-CQD nanoconjugate, it was observed a reduction in toxicity for normal cells compared to free 5-FU, suggesting that drug anchoring in CQD reduced drug-associated toxicity, while for cancer cells exhibited an antitumor effect equivalent to that of the free drug, opening perspectives for the application of this material in anticancer therapy.

1. Introduction

Noncommunicable diseases (NCDs) are the result of an association of genetic, physiological, environmental, and behavioral factors that currently account for 71% of all deaths globally. Cancer is the second leading cause of deaths from NCDs [1], where predictions suggest that by 2040, near to 16.4 million people will die of cancer, representing an increase of 71.1% compared to 2018 estimative [2]. Nowadays, chemotherapy is the most conventional approach for cancer treatment, nevertheless, despite notable progress made in this area, this therapy strategy shows many disadvantages like low therapeutic effectiveness, poor bioavailability and, high non-productive drug distribution due to the lack of specificity for tumors [3,4]. The non-selectivity of anticancer drugs leads to serious consequences such as undesirable side effects, multiples drug resistance, and reduced drug concentration at the target location [5,6].

Recently, nanomedicine has made remarkable efforts to overcome

the drawbacks associated with traditional cancer therapies, enabling substantial progress in basic research and clinical applications. The development of smart drug delivery systems (DDS) based on nanoparticles (also referred to as nanocarriers) has demonstrated to be capable to enhance chemotherapeutic drug efficiency due to their ability to improve pharmacokinetics, reduce toxicities, controlling the release and, delivering the active agent in a site-specific location [7–9]. These nanosystems can also passively target and accumulate in solid tumors due to enhanced permeation and retention effect, whereas drug concentration remained at safe levels in healthy tissues, enabling an increase in therapeutic efficacy and reducing the side effects, simultaneously [6]. Nano-DDS may also increase the stability and solubility of anticancer drugs which is of great importance since more than 40% of these drugs have poor water dispersibility. This is one of the major limitations associated with intravenous administration of chemotherapeutic agents, thus the association with nanomaterials can increase the bioavailability and biodistribution of drugs [10]. As a result

* Corresponding author.

E-mail address: ana.alcantara@ufma.br (A.C.S. Alcântara).

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111781>

Received 9 September 2020; Received in revised form 21 October 2020; Accepted 27 November 2020

Available online 4 December 2020

0928-4931/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Article

Pic-Producing *Escherichia coli* Induces High Production of Proinflammatory Mediators by the Host Leading to Death by Sepsis

Itaynara L. Dutra ^{1,2}, Lorena G. Araújo ^{1,3}, Raissa G. Assunção ^{1,2}, Yago A. Lima ⁴, Johnny R. Nascimento ^{2,4}, André A. M. Vale ^{2,4}, Patrícia C. S. Alves ^{2,4}, Liana O. Trovão ^{2,4}, Ana Carolina M. Santos ⁵, Rosa M. Silva ⁵, Lucilene A. Silva ^{2,4}, Márcia C. G. Maciel ^{2,6}, Eduardo M. de Sousa ^{2,3}, Waldir P. Elias ⁷, Flávia R. F. Nascimento ^{2,4} and Afonso G. Abreu ^{1,2,3,*}

¹ Laboratório de Patogenicidade Microbiana, Universidade Ceuma, São Luís 65075-120, Brazil; itaynaradutra@hotmail.com (I.L.D.); araujo.lorenabio@gmail.com (L.G.A.); raissa_guara@hotmail.com (R.G.A.)

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil; john_nyramos@yahoo.com.br (J.R.N.); andre_amvale@hotmail.com (A.A.M.V.); patriciaacosta88@bol.com.br (P.C.S.A.); lianatrovao@hotmail.com (L.O.T.); lucileneamorimsilva@yahoo.com.br (L.A.S.); macielmcg@gmail.com (M.C.G.M.); edmsousa@hotmail.com (E.M.d.S.); nascimentofrf@yahoo.com.br (F.R.F.N.)

³ Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Universidade Ceuma, São Luís 65075-120, Brazil

⁴ Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil; yagohh_center@hotmail.com

⁵ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo 04023-062, Brazil; carolina.mello@unifesp.br (A.C.M.S.); rosa.unifesp@gmail.com (R.M.S.)

⁶ Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília 70878-040, Brazil

⁷ Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, Brazil; waldir.elias@butantan.gov.br

* Correspondence: afonso.abreu@ceuma.br

Received: 30 January 2020; Accepted: 18 February 2020; Published: 18 March 2020



Abstract: *Escherichia coli* is an important pathogen responsible for a variety of diseases. We have recently shown that Pic, a serine protease secreted by *E. coli*, mediates immune evasion by the direct cleavage of complement molecules. The aim of this study was to investigate the action of a Pic-producing bacteria in a murine model of sepsis. Mice were infected with Pic-producing *E. coli* (F5) or F5Δpic mutant. Animal survival was monitored for five days, and a subset of mice was euthanized after 12 h for sample acquisition. The inoculation of Pic-producing bacteria induced 100% death within 24 h. The colony forming units count in the organs was significantly higher in F5. Hematological analysis showed a decrease of total leukocytes. Nitric oxide and cytokines were detected in serum, as well as on peritoneal lavage of the F5 group in higher levels than those detected in the other groups. In addition, immunophenotyping showed a decrease of activated lymphocytes and macrophages in the F5 group. Therefore, Pic represents an important virulence factor, allowing the survival of the bacterium in the bloodstream and several organs, as well as inducing a high production of proinflammatory mediators by the host, and concomitantly a cellular immunosuppression, leading to sepsis and death.

Keywords: *Escherichia coli*; Pic; serine protease; virulence; sepsis

Research Article

Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios in Nondialysis Chronic Kidney Patients

Gysllene M. C. Brito ¹, Andrea M. M. Fontenele ^{1,2}, Erika Cristina R. L. Carneiro ¹,
Iara Antonia L. Nogueira ¹, Tamires B. Cavalcante ², André A. M. Vale ²,
Sally Cristina M. Monteiro ² and Natalino Salgado Filho ²

¹University Hospital of the Federal University of Maranhão, São Luís 65020-070, Brazil

²Federal University of Maranhão, CEP: 65080-805, São Luís, Brazil

Correspondence should be addressed to Gysllene M. C. Brito; gysmelc@hotmail.com

Received 1 November 2020; Revised 8 June 2021; Accepted 17 June 2021; Published 23 June 2021

Academic Editor: B. L. Slomiany

Copyright © 2021 Gysllene M. C. Brito et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. The Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) and the Platelet-to-Lymphocyte Ratio (PLR) are inflammatory biomarkers for several diseases, such as cancer and cardiovascular morbidities; however, there are currently few studies on kidney diseases. We aimed to evaluate nondialysis patients and determine the association of NLR and PLR with inflammation in these patients. **Methods.** A prospective cross-sectional study was conducted with 85 patients at different stages of chronic kidney disease (CKD), treated at the Kidney Disease Prevention Center of the University Hospital of the Federal University of Maranhão. This study included adult nondialysis patients diagnosed with CKD. The participants' blood samples were collected for a high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) test and blood count. They were divided into two groups according to the presence or absence of inflammation based on the hs-CRP value (<0.5 mg/dL). NLR and PLR were calculated based on the absolute number of neutrophils, lymphocytes, and platelets and were compared between them and with hs-CRP. Statistical analysis was performed using the Stata software, with the Shapiro-Wilk, Mann-Whitney, Spearman's Correlation, and receiver operating characteristic curve tests. This study was approved by the local ethics committee. **Results.** The participants were categorized into two groups: with inflammation ($n = 64$) and without inflammation ($n = 21$). The mean age was 61.43 ± 14.63 y. The NLR and PLR values were significantly different between the groups with and without inflammation ($p = 0.045$ and $p = 0.004$, respectively). However, only PLR showed a significant positive correlation with hs-CRP ($p = 0.015$). The best cutoff point for NLR to detect inflammation was 1.98, with 76.19% sensitivity and 48.44% specificity. For PLR, it was 116.07, with 85.71% sensitivity and 51.56% specificity. There was no significant difference between the area under the NLR and PLR curve (0.71 vs. 0.64; $p = 0.186$) for this population. **Conclusions.** This study showed that PLR was positively correlated with hs-CRP in nondialysis CKD patients and can be used to identify inflammation in this population.

1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by progressive and irreversible loss of renal function. It is a major health issue worldwide, which leads to end-stage renal failure (ESRD) [1]. A systematic review and meta-analysis of observational studies revealed that CKD has an estimated global prevalence between 11 and 13%, and in Brazil, this prevalence, by population criteria, is between 3 and 6 millions of people [2, 3].

CKD has high morbidity and is associated with increased cardiovascular mortality, with 5 to 10 million annual deaths worldwide, followed by infections [1, 3, 4]. Inflammatory processes play a key role in chronic kidney disease and are considered a well-established risk factor for this pathology [5–8].

The chronic systemic inflammation in the CKD, sometimes referred to as low-grade chronic inflammation, is characterized by 2–3-fold increase of acute-phase protein and inflammatory mediators, slow developing, persistent, and of multifactorial origin [6, 8].

Anexos

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 36
PROJETO DE PESQUISA	Registro do CEUA: 36/15 Nº do Protocolo: 23115.012986/2015-63 Data de entrada no CEUA: 15/10/2015 Parecer: APROVADO

I – Identificação

Título do projeto: ESTUDOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA EM UM MODELOS EXPERIMENTAL DE CÂNCER MURINO		
Identificação da equipe executora: Coordenador: Profa. Dra. Ana Paula Silva Azevedo; Colaboradores: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, Profa. MSc. Mayara Cristina Pinto da Silva, Profa. MSc. Thiare Silva Fortes da Cunha		
Instituição onde será realizado: Universidade Federal do Maranhão		
Área temática:	Multicêntrico: Não	Data de recebimento: 15/10/2015
Cooperação estrangeira: Não		Data de devolução 10/12/2015

II – Objetivos:

Estudos de compostos orgânicos e inorgânicos na modulação da resposta imunitária em um modelo experimental de câncer murino.

III – Sumário do projeto:

O projeto visa avaliar de que forma a suplementação com micronutrientes pode afetar o desempenho das células imunes, através da avaliação de parâmetros importantes desta resposta.

Serão usados para os ensaios 80 camundongos swiss (n=10/grupo) machos, com 60 dias de idade, cedidos pelo biotério da Universidade Federal do Maranhão. Os animais serão adaptados ao biotério experimental por 3 dias, mantidos em ambiente com temperatura e umidade monitorada e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, com água e ração ad libitum. O consumo de líquido e de alimento serão monitorados ao longo do experimento.

No desenho experimental, os animais serão divididos nos grupos: Grupo Controle (CTL) que receberá por v.o. um volume de 200µL de salina; Grupo Vitamina E (Vit) que serão tratados com vitamina E na dose de 450µg/Kg, v.o. em 200µL; Grupo Selênio (Se) que será administrado por v.o. com Selênio na dose 3µg/Kg ; e o Grupo (Vit+Se) que serão tratados com vitamina E e Selênio nas doses 450µg/Kg e 3µg/Kg, v.o. respectivamente. Entretanto, o tempo de tratamento será feito de forma profilática, iniciando 7 dias antes do inóculo e de forma terapêutica, após 3 dias de inoculação. O inóculo será feito com 50µL de uma suspensão de células de Tumor de Ehrlich em PBS, na concentração de 1×10^7 células/mL.

IV – Comentário do relator frente à resolução Nº 779 - CONSEPE e complementares em particular sobre:

O projeto é conciso e segue as normas da resolução No 779 – CONSEPE. Os animais estarão sob condições controladas e não propositais de estresse. Os métodos anestésicos, cirúrgicos e de eutanásia estão de acordo com as normas da Universidade Federal do Maranhão e CONSEPE.

V – Pendências

Ausência de Pendências.

VI – Recomendações:

Ausência de Recomendações.

VII – Parecer consubstanciado do CEUA

O projeto proverá caracterização importante do papel da suplementação com micronutrientes sobre as ações do sistema imune, especificamente no processo carcinogênico. E, uma vez que obedecem as normas éticas para sua execução, o presente projeto está Aprovado pela CEUA.

São Luís, ____10____/____Fevereiro____/____2016____



Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva
Presidente do CEUA / UFMA