

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

MICHELE CIAVARELLI

**ESTUDO DO EFEITO DO ESTRESSE SOCIAL SOBRE A PRODUÇÃO DE
ÓXIDO NÍTRICO EM CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH**

BAURU- 2010

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

**ESTUDO DO EFEITO DO ESTRESSE SOCIAL SOBRE A PRODUÇÃO DE
ÓXIDO NÍTRICO EM CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH**

**Michele Ciavarelli
Prof^ª Dra Dulce H. J. Constantino**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos, para obtenção do título de licenciatura em Biologia. Sob a orientação da Prof^ª Dr^ª Dulce Constantino.

BAURU- 2010

C566e

Ciavarelli, Michele

Estudo do efeito do estresse social sobre a produção de Oxido nítrico em camundongos portadores do Tumor ascítico de Ehrlich / Michele Ciavarelli -- 2010.

25f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Câncer. 2. Camundongos. 3. Estresse. 4. Cortisol. 5. Tumor ascítico de Ehrlich. I. Constantino, Dulce Helena Jardim. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Cristina e Mauricio e a minha Irmã Mirian, que sempre me apoiaram na escolha da minha carreira e me ajudaram a conquistar mais um objetivo da minha vida.

Ao meu amigo Eduardo que como biólogo me apresentou a esta profissão fascinante.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª. Dr^ª. Dulce Helena Jardim Constantino, por ter acreditado em minha capacidade e dedicação, por toda sua compreensão e paciência nas orientações deste trabalho.

A Prof^ª Claudia Sgaviolli por seu apoio e orientações de extrema importância no desenvolvimento do trabalho.

A minha amiga Daniela F. Pavanelli que me ajudou nos momentos de dúvida e dificuldade, esteve sempre ao meu lado para me auxiliar.

“Deus não escolhe os preparados,
prepara os escolhidos. Fazer ou não
fazer algo só depende da nossa vontade
e perseverança” (Albert Einstein)

RESUMO

Este estudo teve como principal objetivo analisar o efeito do estresse social sobre a produção de óxido nítrico em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich. O câncer está em ascensão em todo o Brasil, essa doença é colocada como problema de saúde pública, associada ao crescimento anormal das células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo, ultrapassando seus limites e invadindo as estruturas vizinhas, até dominar o organismo do indivíduo. Existem vários fatores que podem influenciar o crescimento de um tumor, o estresse é um deles por apresentar efeito imunossupressor que contribui para o desenvolvimento do câncer; neste processo é liberado um hormônio denominado cortisol que é capaz de reduzir a proliferação de células do sistema imune. A resposta imune antitumoral se baseia na ação principal de macrófagos e linfócitos natural killer (NK), porém o influxo e o estado funcional destas células podem estar diretamente relacionados ao desenvolvimento tumoral.

Palavras chave: Câncer, Estresse Social, Tumor Ascítico de Ehrlich.

ABSTRACT

This study aimed to examine the effect of social stress on nitric oxide production in mice bearing Ehrlich ascites tumor. The cancer is rising in Brazil, this disease is set up as public health problem, associated with the abnormal growth of cells that invade tissues and organs. Rapidly dividing, these cells tend to be very aggressive and uncontrollable, causing the formation of malignant tumors that can spread to other body regions, overstepping its bounds and invade neighboring structures, to dominate the body of the individual. There are several factors that can influence the growth of a tumor, stress is one of them by having immunosuppressive effect that contributes to cancer development, this process is releasing a hormone called cortisol that is able to reduce proliferation of immune cells. The antitumor immune response is based on the main action of macrophages and natural killer (NK), but the influx and functional status of these cells can be directly related to tumor development.

Keywords: Cancer, Social stress, Ehrlich ascites tumor

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Efeito do estresse social sobre o número de células tumorais presentes no lavado peritoneal de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

.....20

TABELA 2. Efeito do estresse social sobre a produção de óxido nítrico (NO) e o número de células tumorais presentes no lavado peritoneal de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

.....22

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Efeito do estresse social sobre o número de células tumorais.....	19
GRÁFICO 2: Efeito do estresse social sobre a produção de óxido nítrico.....	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4	RESULTADOS.....	18
5	GRÁFICOS.....	19
6	DISCUSSÃO.....	22
7	CONCLUSÃO.....	25
8	REFERÊNCIAS.....	26

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O Câncer tem aumentado em todo o Brasil essa doença é colocada como problema de saúde pública, que causa o crescimento desordenado das células, invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo, ultrapassando seus limites e invadindo as estruturas vizinhas, até dominar o organismo do indivíduo. (ASSIS, 2000)

Segundo FRANKS e TEICH (1990), o tumor é reconhecido através do crescimento anormal das células, onde a célula tumoral se difere da normal por não responder aos mecanismos de controle.

Organismo como um todo é o resultado da somatória das atividades e interação das unidades celulares. Quando ocorre alguma alteração nessa funcionalidade, busca-se a compreensão e o estudo do caso. (MONTENEGRO e FRANCO, 1999)

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2006), as causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando sempre inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas.

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, é correspondente a um adenocarcinoma mamário de camundongos, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906. (EHRlich, 1906)

Estudos realizados no laboratório de Cultura de Células do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) demonstram que camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich tem comprometimento do sistema hematopoiético induzindo a mielossupressão drástica através de redução no número de precursores hematopoiéticos de granulócitos e macrófagos. Descrito pela primeira vez por Ehrlich (EHRlich & APOLANT , 1905) este tumor é um adenocarcinoma de mama de origem espontânea encontrado em camundongos caracterizado por crescimento bastante rápido tanto em sua forma sólida como na forma ascítica.

Os tumores podem ter início em diferentes tipos de células. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas. (INCA, 2006).

Segundo COSTA e LEITE (2009) a incidência do câncer e seus índices de mortalidade são cada vez mais elevados. Embora afete todas as faixas etárias, as pessoas mais acometidas são com mais de 65 anos de idade, onde o câncer será mais prevalente nas mulheres (52%) do que nos homens (48%).

Apesar de homens adoecerem e morrerem mais do que as mulheres, a população feminina é mais numerosa, especialmente nas faixas etárias mais avançadas. O tipo mais comum de tumor nos homens é o de próstata, seguido de pulmão, cólon e reto, estômago, oral, esôfago, leucemias e pele melanoma. Entre as mulheres, os cânceres mais frequentes são os de mama, colo de útero, cólon e reto, pulmão, estômago, leucemias, oral, pele melanoma e esôfago. (COSTA e LEITE, 2009)

De acordo com a Organização de Saúde, a tendência de mortalidade é menor em países desenvolvidos, onde a população tem mais acesso aos serviços de saúde. Em média 40% das mortes por câncer poderiam ser evitadas. (MINISTÉRIO NACIONAL, 1991).

O contexto da doença e o tratamento podem gerar estresse, trazendo sinais e sintomas tais como: depressão, desânimo, apatia, hipersensibilidade emotiva, raiva, irritabilidade. (COSTA e LEITE, 2009).

Segundo COSTA e LEITE (2009), o estresse pode exercer atividades imunossupressoras acarretando o desenvolvimento de doenças como câncer, além de maior susceptibilidade a infecções por microorganismos. Ele é definido como um estado em que a homeostase é perturbada, e esta relacionado com o enfraquecimento das defesas imunológicas.

Quando o estresse aumenta a imunidade cai, e elevam-se os riscos para o corpo adoecer, resultando na liberação de hormônios que, além de alterar vários aspectos da

fisiologia, têm ainda um efeito modulador das defesas do organismo. Em humanos, o principal hormônio com essas funções é o cortisol ou glicocorticóide. (BUER, 2002)

BUER (2002) afirma que um dos efeitos bem conhecidos do cortisol, tanto durante o estresse quanto no caso do uso terapêutico dos glicocorticóides sintéticos, é a regulação da migração dos leucócitos pelos tecidos do corpo. Após o estresse, por exemplo, ocorre um aumento expressivo do número sanguíneo de neutrófilos, e uma redução importante na contagem de linfócitos. A migração, a distribuição e a localização dos leucócitos no organismo são de extrema importância para o desenvolvimento das respostas imunológicas.

Segundo FILHO e ZILBERSTEIN (2000) o óxido nítrico é uma molécula gasosa simples, imunossupressora produzida a partir do substrato L-arginina é mediadora de diversas funções, tais como vasodilatação, neurotransmissor e metabolismo do ferro. Os efeitos do NO na biologia tumoral são ambíguos e complexos, sua atividade tem sido demonstrada em diversos tumores.

De acordo com os estudos comparativos a concentração de nitrito e nitrato é uma maneira de se compreender que o oxido tem como função tratar os mecanismos de defesa do nosso organismo para eliminar bactérias invasoras, e é usado como molécula-mensageira, o que é muito engenhoso. Por ser pequena, ela consegue se disseminar rapidamente do endotélio até as células dos músculos e é o responsável pelo relaxamento da musculatura vascular; como agente antimicrobiano, defende-nos contra as bactérias que causam doenças. (FILHO e ZILBERSTEIN, 2000)

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos de estresse social sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento tumoral;
- Quantificar a produção de óxido nítrico no lavado peritoneal de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Foram inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) doze animais e divididos em dois grupos (sem estresse e com estresse). Seis animais foram mantidos agrupados na mesma gaiola (sem estresse) e o foram distribuídos em gaiolas separadas, um animal por gaiola (com estresse social), os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*. Decorridos 7 dias os animais foram eutanasiados, o lavado peritoneal foi removido e procedeu-se à contagem de células tumorais e quantificação de óxido nítrico.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos suíços, machos, com idade entre 30 e 45 dias e procedentes do Biotério Central da Universidade Sagrado Coração. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno.

3.3 Neoplasia

Foi empregado o tumor de Ehrlich (EHRlich e APOLLANT, 1905) As células neoplásicas foram mantidas *in vivo* por repiques semanais, através do implante de 10^7 células tumorais por via intraperitoneal (i.p.). A determinação do número total de células neoplásicas inoculadas por animal foi realizada através da contagem em câmara de Neubauer, empregando-se apenas as suspensões onde a viabilidade celular foi superior a 95% (teste de exclusão do Azul Trypan).

3.4 Implante tumoral

Suspensões contendo 10^4 células tumorais por mL foram inoculadas intraperitonealmente, num volume de 0,1mL (total de células implantadas foi de 10^3).

3.5 Eutanásia

Após 7 dias de tratamento os animais foram eutanasiados com dose letal de ketamina (0,2mL) e xylasina (0,2mL).

3.6 Obtenção do lavado peritoneal para avaliação da produção de óxido nítrico

Com auxílio de seringa descartável foram inoculados 3ml de solução fisiológica na cavidade peritoneal. O abdome do animal foi massageado e posteriormente realizado uma incisão no abdome com o objetivo de se introduzir uma pipeta automática e recolher o lavado peritoneal. Todo este procedimento foi realizado após a eutanásia do animal.

3.7 Contagem de células tumorais

Após remoção do lavado peritoneal, realizou-se a diluição 1:100 do lavado e posterior contagem em câmara de Neubauer.

3.8 Avaliação da produção de NO

A determinação da concentração de nitrito é uma forma indireta de se determinar a concentração de óxido nítrico (NO). Este procedimento foi feito utilizando-se o método de Griess, este método quantifica indiretamente a produção de NO pela determinação de nitritos e nitratos acumulados no sobrenadante das células, após o tratamento (MOSHAGE, 1995). Para tanto a cada 0,2ml de lavado peritoneal foi acrescido de 1,8ml do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naphtylenediamina a 0,1% em água destilada). Como branco do teste empregamos 1,8ml de solução fisiológica acrescido de 0,2ml do lavado peritoneal. A reação ocorreu num período de 20min, após o qual foi realizada a leitura em espectrofotômetro (CELM) em comprimento de onda 540nm. O cálculo dos resultados foi realizado através da comparação do comprimento de onda dos testes com o comprimento de onda de um padrão com 100ug de nitrito/ml.

3.9 Análise Estatística

Foi empregado o Teste T de student na comparação da variável estresse sobre os parâmetros número de células tumorais e a produção de óxido de nítrico. O estudo estatístico foi realizado com auxílio do software Sigma Stat, versão 3.1 (Jandel Scientific).

4. RESULTADOS

Com o intuito de avaliar a influencia do estresse social sobre o crescimento do tumor ascitico de Ehrlich, os animais foram divididos em dois grupos: em um grupo controle os animais foram mantidos agrupados e no grupo teste foram mantidos isolados. Constatamos que o grupo submetido ao estresse mostrou uma tendência ao aumento no numero de células tumorais. Porém esta diferença não foi tao abundante no analise estatística(dados se encontram na tabela 1 e gráfico 1) .

Tabela 1. Efeito do estresse social sobre o número de células tumorais presentes no lavado peritoneal de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

Grupos ^a	<i>Células tumorais ($\times 10^5$)</i>
Sem estresse	176,19 \pm 61,10 ^{b,c}
Com estresse	188,67 \pm 32,62

a- animais sem estresse: mantidos em grupo de 6 animais por gaiola; animais com estresse: mantidos em isolamento (um animal por gaiola);

b- Resultados expressos em media \pm desvio padrão;

c- n= 6 animais por grupo.

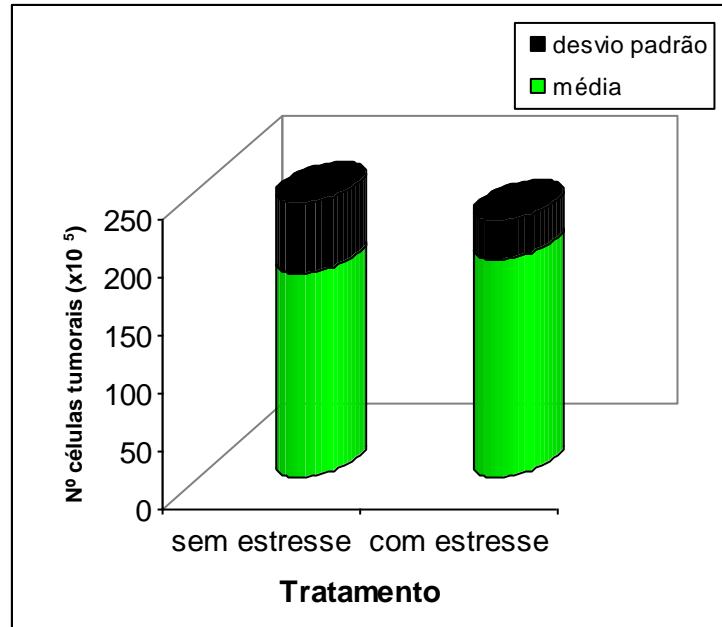


Gráfico 1. Efeito do estresse social sobre o número de células tumorais

Constatamos que o estresse social também apresentou uma tendência ao aumento na produção de óxido nítrico, porém estes dados revelaram significância estatística levando-se em consideração um elevado desvio padrão constatado (Dados se encontram demonstrados na tabela 2 e no gráfico 2).

Tabela 2. Efeito do estresse social sobre a produção de óxido nítrico (NO) em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

Grupos ^a	NO (ug/mL)
Sem estresse	0,41 ± 0,32 ^{b,c}
Com estresse	1,57 ± 1,14

a- animais sem estresse: mantidos em grupo de 6 animais por gaiola; animais com estresse: mantidos em isolamento (um animal por gaiola);

b- Resultados expressos em media ± desvio padrão;

c- n= 6 animais por grupo.

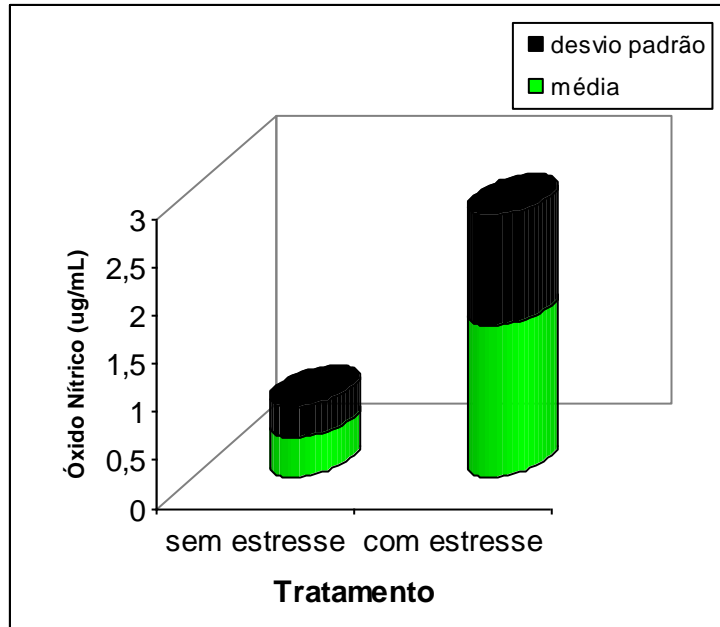


Gráfico 2. Efeito do estresse social sobre a produção de óxido nítrico.

5.0 DISCUSSÃO

Segundo ASSIS (2000) o câncer tem aumentado em todo o Brasil e é colocado como uma das principais doenças de saúde pública, devido sua capacidade de se proliferar e afetar tanto o ser humano como os animais. Sua incidência e seus índices de mortalidade são cada vez mais elevados embora afete todas as faixas etárias.

O principal objetivo desse estudo foi o de avaliar o crescimento tumoral e quantificar a produção de óxido nítrico no lavado peritoneal de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich, obtemos um resultado satisfatório em relação a produção de óxido nítrico de acordo com o esperado.

O contexto da doença e o tratamento podem gerar estresse no indivíduo, trazendo sinais e sintomas tais como: depressão, desânimo, hipersensibilidade emotiva, raiva, irritabilidade e a liberação do hormônio denominado cortisol. (COSTA e LEITE, 2009)

BUER (2002) alega que um dos efeitos bem conhecidos do cortisol, tanto durante o estresse quanto no caso do uso terapêutico dos glicocorticóides sintéticos, é a regulação da migração dos leucócitos pelos tecidos do corpo, podendo afetar o sistema imune. Após o estresse, por exemplo, ocorre um aumento expressivo do número sanguíneo de neutrófilos, e uma redução importante na contagem de linfócitos NK.

Os linfócitos NK são grandes células linfóides com grânulos intracelulares e compõe uma pequena fração das células sanguíneas (cerca de 5%). O que contribui para a defesa do sistema contra qualquer tipo doença que afere a homeostasia. (JANEWAY et al, 2000).

Um papel importante na imunidade celular é a secreção de linfócitos NK ativados por IL-2, que apresentam atividade citolítica maiores que os NK podendo secretar IFN- γ , que tem por função ativar os linfócitos e as células de defesa responsáveis pela imunidade do nosso organismo.

LIMA e BAMBIRRA (1980) afirmam que o envolvimento do sistema imune na destruição das células tumorais tem constituído um tema importante a ser analisado pelos

pesquisadores, graças ao desenvolvimento experimental de tumores espontâneos ou induzidos.

A resposta de defesa ao câncer tem uma grande relação com o sistema imunológico, os macrófagos, por exemplo, e os linfócitos NK tem um papel central nesse sistema, pois os macrófagos são células capazes de secretar muitos produtos biologicamente ativos que participam de diferentes processos no organismo, como remodelagem tecidual, reparação de ferimentos, remove células danificadas e velhas, hematopoese e homeostase.(KLIMP et al, 2002)

De acordo com SHARON (2000), os macrófagos possuem mecanismos para reagir e destruir aos patógenos das células tumorais que invadem o sistema do indivíduo, o que os torna importantes para a imunidade inata participando com os linfócitos para que desenvolvam respostas imunes adaptativas.

O sistema imunológico é um dos mecanismos mais complexos de defesa , pois é através dele que as células revertem algum tipo de inflamação ou doença dominante no organismo do indivíduo, seja ele animal ou ser humano.

O óxido nítrico possuiu uma grande variedade de funções como um duplo papel no processo inflamatório, é um imunossupressor que causa um aumento nos vasos sanguíneos e atua em muitos processos fisiológicos, dentre eles na regulação do sistema imunológico, possui ação antibacteriana, antiparasitária, que resulta num poder de defesa microbicida onde inibe enzimas essenciais para o crescimento tumoral, causando morte ou inibição destas células. (LOPES, 2004)

O NO é uma molécula mensageira benéfica ou às vezes maléfica, que regula respostas celulares e humorais na inflamação, e tem a capacidade tanto anti-inflamatória quanto pós-inflamatória, ele é secretado em altos níveis pelos macrófagos, que são indispensáveis na defesa contra microorganismos e células tumorais (BOGDAN, 2001).

Em resumo o presente trabalho nos permitiu avaliar a influencia do estresse social sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich, os animais foram divididos em dois grupos: em um grupo controle os animais foram mantidos agrupados e no grupo teste foram mantidos isolados por vários dias o que nos trouxe um resultado.

Constatamos que o grupo submetido ao estresse mostrou uma tendência ao aumento no número de células tumorais. Porém esta diferença não foi tão significativa, porém todos os objetivos do trabalho foram alcançados e estabelecidos de acordo com o esperado.

6. CONCLUSÃO

Constatamos uma tendência ao aumento das células tumorais nos dois grupos principalmente no grupo teste, pois ficarão alojados em gaiolas diferentes, o que causou estresse social e o aumento significativo sobre a produção do óxido nítrico..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ASSIS, F. A. Efeito do selênio orgânico e da vitamina E no crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor experimental de Ehrlich, 2000.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. Nat. Immunol. New York, 2001.

BUER, M. E, Revista Ciência Hoje: Doenças associadas ao estresse crônico. 2002, pg 20,21

COSTA, P.; LEITE, RCBO. Estratégias de enfrentamento utilizadas pelos pacientes oncológicos submetidos a cirurgias mutiladoras, 2009

EHRlich, P; APOLANT, H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. Berl Klin Wschr, 1905.

FILHO, R; F, ZILBERSTEIN. B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. São Paulo, 2000. Revista da Associação Médica Brasileira.

FRANKS, L. M.; TEICH .N. Introdução a Biologia Celular e Molecular do Câncer, São Paulo: Editora Roca, 1990.

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

JANEWAY, A.C et al. Imunologia: O sistema imunológico na saúde e na doença. Porto Alegre: Artimed, 2000; 634p.

LIMA, A.O; BAMBIRRA, E. A. Cancerologia: Conceitos atuais. Imunopatologia das Neoplasias. Rio de Janeiro, 1980.

LOPES, F.C.M. **Avaliação da atividade imunológica in vitro da Alchornea spp, quanto a produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral por macrófagos murinos.** Monografia de análises clínicas, faculdade de ciências farmacêuticas. Araraquara, 2004.

Ministério Nacional: **Registro Nacional de Patologia Tumoral.** Rio de Janeiro, 1991

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**, 4 ed. São Paulo> Editora Atheneu, 1999..