

INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE COM CÉLULAS TUMORAIS MCF7 PRÉ-TRATADAS COM MESOCARPO DE BABAÇU*

ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE BY MCF7 TUMOR CELLS PRETREATED WITH BABASSU MESOCARP

RESPUESTA INDUCIDA POR LAS CÉLULAS TUMORALES MCF7 TRATADAS PREVIAMENTE CON MESOCARPIO “BABAÇU”

Caroline Silva Costa de Almeida

Graduanda em Medicina da Universidade Federal do Maranhão/UFMA

Josemar Marcelino Ferreira Godinho Júnior

Pós-Graduando do Mestrado em Ciências da Saúde/UFMA

Thiare Silva Fortes da Cunha

Pós-Graduanda do Doutorado em Ciências da Saúde/UFMA

Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Professora Doutora Associada da UFMA

Ana Paula S. Azevedo dos Santos

Professora Doutora Adjunta do Departamento de Ciências fisiológicas da Universidade Federal do Maranhão/UFMA

RESUMO: A imunoterapia é uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. E o mesocarpo obtido do fruto do Babaçu (*Attalea speciosa*) demonstra atividade imunomoduladora com relevantes perspectivas na atividade antitumoral. O objetivo deste trabalho foi avaliar resposta imune antitumoral contra células tumorais pré-tratadas com Extrato Aquoso de Mesocarpo de Babaçu (EAMB). As células tumorais MCF-7 foram ressuspensas no EAMB para determinação da viabilidade celular. Posteriormente, os animais foram inoculados com MCF-7 ressuspensas em salina ou EAMB, por via subcutânea, nos dias 0, 5 e 10. No dia 15, os animais foram eutanasiados e o baço retirado cirurgicamente. Os esplenócitos foram caracterizados por fenotipagem com anticorpos monoclonais para células aderentes e não aderentes por citometria de fluxo. Parte das células não aderentes foram usadas para co-cultura com MCF-7 por 5 dias e depois feita fenotipagem dos esplenócitos. A viabilidade celular foi de 97% e não houve diferença no peso do baço entre os grupos. A frequência de células aderentes que expressam os marcadores IA/IE e Ly-6G foram maiores no grupo MCF-7 pré-tratadas com EAMB quando comparado com o controle. Na fenotipagem de células não aderentes foi observada uma proporção de 1:2 linfócitos T CD8+ para linfócitos T CD4+. Contudo, após 5 dias de co-cultura com MCF-7, os esplenócitos obtidos dos animais estimulados com MCF-7 pré-tratados com EAMB apresentaram aumento de células T helper e citotóxicas, alterando a relação para 1:1. Os resultados mostram que o EAMB pode induzir uma resposta imunogênica específica, atuando como um adjuvante da resposta imune antitumoral.

Palavras-chave: Mesocarpo de Babaçu. Células Tumorais MCF-7. Adjuvante Imunológico.

* Trabalho premiado durante o XXV Encontro do SEMIC, realizado na UFMA, entre os dias 18 a 22 de novembro de 2013. Artigo recebido em fevereiro de 2014

Aprovado abril de 2014

ABSTRACT: The immunotherapy is a promising strategy for the treatment of cancer. The mesocarp obtained from the fruit of the Babassu Palm (*Attalea speciosa*) demonstrates immunomodulating activity with relevant perspectives in antitumor activity. The aim of the study was to evaluate antitumoral immune response against tumor cells pre-treated with Aqueous Extract of Mesocarp of Babassu (AEMB). The tumor cells MCF-7 were resuspended in EAMB for determination of cell viability. Subsequently, the animals were inoculated with MCF-7 resuspended in saline or EAMB, subcutaneously, on days 0, 5 and 10. On day 15, the animals were euthanized and the spleen surgically removed. The splenocyte were characterized by phenotyping with monoclonal antibodies for adherent cells and non-adherent cells for flow cytometry. Part of non-adherent cells were used for co-culture with MCF-7 for 5 days and then made phenotyping of splenocyte. The cell viability was 97% and there was no difference in the weight of the spleen between the groups. The frequency of adherent cells that express markers IA/IE and Ly-6G were higher in group MCF-7 pre-treated with EAMB when compared with the control. In phenotyping of non-adherent cells was observed a ratio of 1:2 T lymphocytes CD8+ to CD4+ T lymphocytes. However, after 5 days of co-culture with MCF-7, the splenocyte obtained from animals stimulated with MCF-7 pre-treated with EAMB showed increase of helper T cells and cytotoxic, changing the ratio to 1:1. The results show that the EAMB may induce an immunogenic response specific, acting as an adjuvant of antitumor immune response.

KEYWORDS: Babassu Mesocarp. Tumor Cells MCF-7. Immunological Adjuvant.

RESUMEN: La inmunoterapia es una estrategia que fornece buenas perspectivas para el tratamiento del cáncer. El mesocarpio obtenido a partir del fruto del “babaçú” (*Attalea speciosa*) demuestra actividad inmunomoduladora con perspectivas de actividad antitumoral. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune antitumoral contra las células tumorales tratadas previamente con extracto acuoso de mesocarpio de babaçú (EAMB). Las células tumorales MCF-7 fueron suspendidas nuevamente en EAMB para la determinación de viabilidad celular. Posteriormente, los animales fueron inoculados con MCF-7, cultivo en solución salina, o con EAMB, por vía subcutánea durante los días 0, 5 y 10. El día 15, los animales fueron sacrificados y el bazo extirpado quirúrgicamente. Los esplenócitos se caracterizaron mediante la prueba fenotípica con anticuerpos monoclonales de células adherentes y células no adherentes por citometría de flujo. Parte de las células adherentes fueron utilizadas para un co-cultivo con MCF-7 durante 5 días y luego realizó la prueba fenotípica de los esplenocitos. La viabilidad de las células fue del 97% y no hubo diferencia en el peso del bazo entre los grupos. La frecuencia de células adherentes que expresan marcadores IA/IE y Ly-6G fue mayor en el grupo MCF-7 pre-tratados con EAMB en comparación con el control. En la prueba fenotípica de las células adherentes se observó una proporción de 1:2 linfocitos T CD8+ con respecto a los linfocitos T CD4+. Sin embargo, después de los 5 días de co-cultivo con MCF-7, los esplenocitos obtenidos a partir de animales estimulados con MCF-7 pre-tratados con EAMB mostraron aumento de células T CD4+ y TCD8+, cambiando la proporción de 1:1. Los resultados muestran que la EAMB puede inducir una respuesta inmunogénica específica, actuando como un adyuvante de respuesta inmune antitumoral.

PALABRAS CLAVE: mesocarpio. Células tumorales MCF-7. Adyuvantes inmunológicos.

1 | Introdução

O Brasil apresenta uma diversificada flora com potencial para busca de novos fito ativos com aplicação terapêutica e o Estado do Maranhão possui espécies representativas dos biomas de Amazônia, Cerrado, Caatinga e Matas de transição (CUNHA, 1987; ALBIERO; MACIEL; GAME-RO, 2011). O babaçu (*Attalea speciosa Mart.*) é uma palmeira característica das matas de transição, representa um importante produto do extrativismo vegetal com impacto socioeconômico e tem sua maior reserva no Maranhão (PRANCE, 1985; ALBIERO; MACIEL; GAMERO, 2011). O fruto desta espécie, coco babaçu, possui três componentes: epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O epicarpo corresponde a 15% do peso total do fruto, o mesocarpo a 20% e o endocarpo a 58% do peso. Do mesocarpo é obtida uma farinha bastante comercializada no Maranhão, por ser rica em carboidratos e sais minerais, comumente utilizada como suplemento na alimentação (ROSENTHAL, 1975). Também é popularmente utilizada para o tratamento de diversas doenças como constipação, dismenorreia, doenças inflamatórias e leucemias (CARVALHO FILHO, 2003). Estudos realizados experimentalmente mostram que os produtos derivados do mesocarpo de babaçu apresentam propriedades anti-tiroideanas, anti-inflamatórias, induzem aumento de óxido nítrico, in vitro e in vivo, por macrófagos peritoneais e possuem efeito antitrombótico (GAITAN et al., 1994; NASCIMENTO et al., 2006; AZEVEDO et al., 2007). A atividade antitumoral do mesocarpo traz grandes perspectivas, já que a incidência de câncer do Brasil se aproxima da dos Estados Unidos, da União Europeia e do Japão, entretanto com maior proporção de óbitos. Estima-se que mais de um milhão de indivíduos irão morrer de câncer por ano a partir de 2030 no Brasil (GOSS et al., 2013; SILVA; MAGALHÃES, 2013). Assim, o estudo dos mecanismos imunológicos desencadeados por produtos de origem vegetal, como o babaçu, pode ser uma ferramenta inovadora na tentativa de se restabelecer a integridade do organismo hospedeiro frente ao tumor. Nesse sentido, a eliminação de células tumorais envolve tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa, alicerçada em diferentes tipos de células e moléculas que funcionam de forma conjunta (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra as células tumorais, sendo representada principalmente pela atuação das células *Natural Killers* e macrófagos. Em seguida, a imunidade adaptativa desenvolve-se em fases mais tardias, sendo os linfócitos T as células mais importantes nesse tipo de resposta por possuírem atividade citotóxica específica contra os antígenos tumorais e memória imunológica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Contudo, alguns antígenos tumorais podem ser imunógenos fracos, reduzindo uma resposta de células T antígeno-específica e induzindo a ação de células T regulatórias, favorecendo uma condição de equilíbrio entre a imunidade do hospedeiro e o tumor. Como relatos da literatura mostram que o mesocarpo do babaçu apresenta uma atividade imunomodulatória, esta poderia mudar o contexto induzido pelo ambiente tumoral, favorecendo uma resposta citotóxica do hospedeiro. Assim, o presente trabalho investigou os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos na resposta antitumoral do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu.

2 | Metodologia

2.1 | Extrato aquoso de babaçu

O extrato aquoso de mesocarpo de Babaçu (EAMB) foi obtido por maceração da farinha de mesocarpo de babaçu (Mesovital - Município de Arari) na concentração de 20 mg/ml a 4°C por 24h e filtrado com filtro de papel poro 14µm (J Prolab, Paraná, Brasil).

2.2 | Animais

Foram usados camundongos Swiss machos, com 30 dias de idade, cedidos pelo Biotério da Universidade Federal do Maranhão. A utilização dos animais esteve de acordo com os princí-

pios éticos de experimentação animal de Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEUA/UFMA, parecer nº 05/11, protocolo nº 0068089/2011-00. Os animais foram adaptados ao biotério experimental do Laboratório de Imunofisiologia por cinco dias, mantidos em ambiente com temperatura e umidade monitorada e foto período de 12 horas claro/escuro antes do início dos ensaios.

2.3 | Ensaio de atividade antitumoral

2.3.1 | Obtenção das células tumorais e avaliação da viabilidade

As células das linhagens de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), suplementado com soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) a 10% em estufa de CO₂. Após uma semana, quando apresentaram confluência, essas células foram removidas por tripsinização. Para isso, as células aderidas foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada e adicionado 3mL de tripsina-EDTA 0,025% (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). Após 2 minutos, suspensão de células foi removida para tubo de polietileno de 15mL contendo 12mL de meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 10%. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 18 C, o sobrenadante descartado e a lavagem repetida mais uma vez. Após a lavagem, as células tumorais foram quantificadas, ajustadas para 1x10⁵ células e ressuspensas em 100 µL de EAMB concentração de 20mg/mL ou salina por 3 horas. Para descartar um efeito citotóxico direto do extrato foi verificada a viabilidade, utilizando método do Azul de Tripán (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil). Verificou-se um total de 97% das células viáveis.

2.3.2 | Inoculação

Os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos (n=3/grupo). Os grupos foram inoculados com 1x10⁵ células tumorais da linhagem MCF-7 e ressuspensos em 100 µL salina ou EAMB 20mg/mL. A inoculação foi por via subcutânea, nos dias 0, 5 e 10, finalizando no 15 dia.

2.3.3 | Tratamento dos animais

Os animais do grupo 1 foram tratados com 100µL de solução salina, o grupo 2 com 100 µL de EAMB, os animais do grupo 3 receberam MCF-7 em 100µL de solução salina e os animais do grupo 4 receberam 1x10⁵ MCF-7 em 100µL de EAMB.

2.3.4 | Retirada e trituração do baço

Os animais foram eutanasiados e o baço foi removido cirurgicamente, pesado e triturado junto à 3mL de solução salina tamponada em tamis com o êmbolo de seringa de 1mL para avaliação de celularidade. A suspensão foi colocada em gelo até a contagem. Foram retirados 90µL da solução desta última suspensão de células e adicionados a 10µL de cristal violeta (Newprov, Pa-raná, Brasil) para a realização da contagem ao microscópio óptico de luz comum em câmara de Neubauer. As células do baço foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 10% por 2 horas, em estufa de CO₂, para separação de células aderentes e não aderentes. Posteriormente as populações de células foram caracterizadas por fenotipagem com an-ticorpos monoclonais comerciais (BD Biosciences, Califórnia, USA) separados em painéis para células aderentes anti-IA/IE (PE) e anti-Ly6G (PE-Cy5) e não aderentes com anti-CD3 (FITC), anti-CD4 (PE) e anti-CD8 (PE-Cy5) para leitura em citômetro de fluxo. Alíquotas de 5x10⁵ célu-

las foram colocadas em micro tubos tipo eppendorf graduado neutro de 1,5 mL (CRAL, China) e centrifugadas (5 min, 290g, 4°C) para obtenção de um “pellet”, este foi ressuspenso em 100µL de tampão para citometria Hemoton spec (SLM Engenharia Clinica, Fortaleza, Brasil) ao qual foram adicionados anticorpos específicos para os marcadores citados, combinando os painéis de marcadores associados aos fluorocromos FITC, PE e PE-Cy5. As células foram incubadas por 20 min a 4°C ao abrigo da luz. Após este período, o material foi lavado por duas vezes com tampão para citometria. Após as lavagens, as células foram ressuspenso em 500µL de tampão de citometria suplementado com paraformaldeído a 2% e feita a aquisição de dados pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, Califórnia, USA). Os dados obtidos foram analisados usando-se o software FlowJo. Parte das células não aderentes do baço foram usadas para a realização de co-cultura.

2.3.5 | Co-cultura

Para este estudo utilizou-se as células do baço de camundongos Swiss e a linhagem de tumor humano MCF-7. Após a obtenção das células do baço, esperou-se 2 horas para que as células pudessem aderir. Depois desse intervalo, as células não aderentes foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. As células não aderentes do baço foram ajustadas para 3x10⁵ células/100µL a ser adicionado em placa de 96 poços. Nestas já havia sido plaqueada as células tumorais, 3 horas antes, para completa adesão. A placa ficou em co-cultura por cinco dias. A relação de células do baço e tumor foi de 30:1 e as linhagens de tumor usadas na co-cultura foram das mesmas passagens usadas no tratamento dos animais, dos quais o baço foi removido.

2.3.6 | Fenotipagem dos esplenócitos após 5 dias de co-cultura

Para determinação do fenótipo de membrana, as células obtidas da co-cultura foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais (BD Biosciences, Califórnia, USA) específicos para os seguintes marcadores: CD3 (marcador de linfócitos e timócitos), CD4 (glicoproteína expressa em uma sub população de linfócitos auxiliares), CD8a (glicoproteína expressa em população de linfócitos citotóxicos). O procedimento para a fenotipagem foi o mesmo descrito para o item c, subitem *iv*.

2.4 | Análise estatística

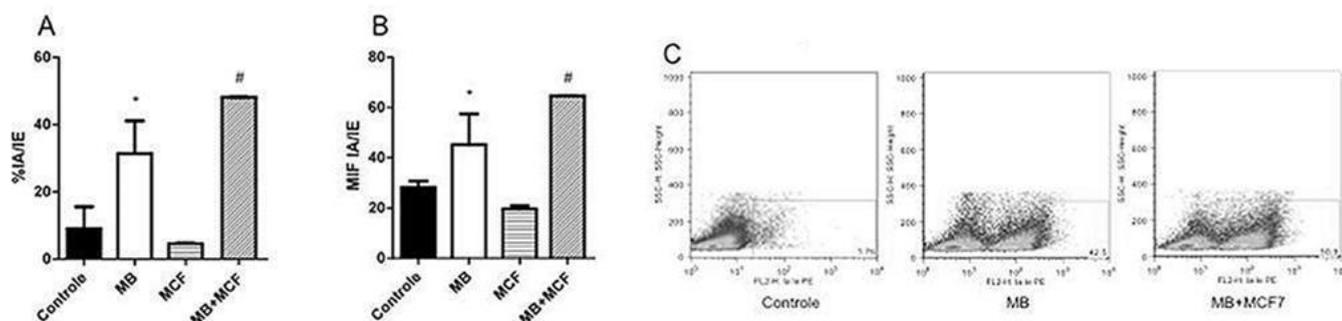
Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análises estatísticas com o teste ANOVA, com pós-teste de Newman-Keuls, e teste t, para os parâmetros que não apresentaram diferenças significativas no ANOVA, mas que visualmente possuíam diferença, sendo considerado como significativo um valor de $p < 0,05$.

3 | Resultados

3.1 | Celularidade do baço e fenotipagem dos esplenócitos

Não foi observada diferença no peso e na contagem de células esplênicas entre os grupos. A frequência de células positivas para o marcador I-A/I-E mostraram que os animais estimulados com mesocampo de babaçu ou com células MCF-7 pré-tratadas com o extrato apresentaram um aumento na frequência de células positivas e na intensidade de fluorescência para este marcador comparado com os esplenócitos obtidos do grupo controle (figura 1).

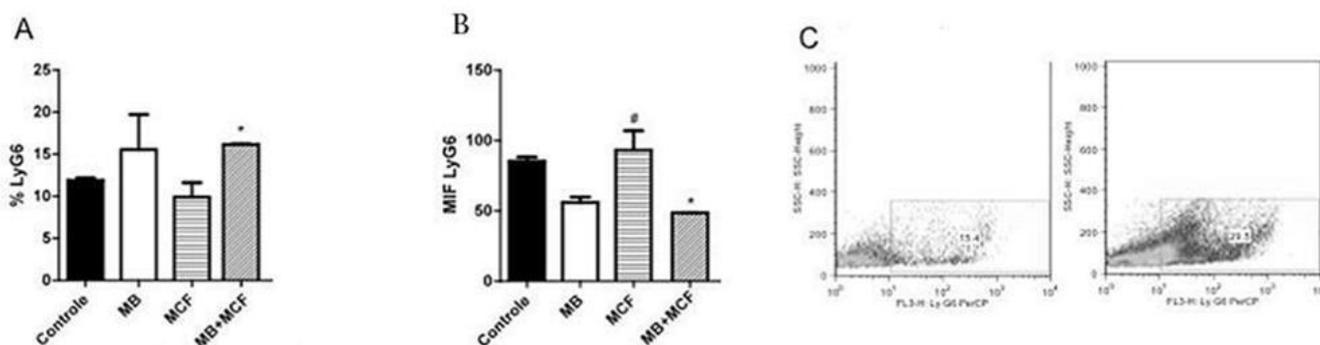
Figura 1 - Avaliação da frequência de células IA/IE positivas (A) e da média de intensidade de fluorescência (B) em esplenócitos de camundongos Swiss nos diferentes grupos de tratamento. Dot plot representativo da frequência de células IA/IE positivas nos grupos Controle, MB e MB+MCF-7 (C). Essa população de células foi analisada por citometria de fluxo. Os resultados foram considerados significantes com $p < 0,05$ * em relação aos demais grupos, exceto o grupo estimulado com MCF-7 e extrato e # em relação aos demais grupos exceto o grupo estimulado ape-nas com extrato.



Fonte: Elaborado pelos autores

A frequência de células positivas para Ly6G-Ly6C foi maior no grupo estimulado com células da linhagem MCF-7 pré-tratadas com mesocarpo de babaçu quando comparado com o grupo controle, entretanto a intensidade do marcador foi menor neste grupo, bem como no grupo estimulado com mesocarpo de babaçu. A expressão do Ly6G-Ly6C foi maior nos esplenócitos dos animais estimulados apenas com células da linhagem MCF-7 (figura 2).

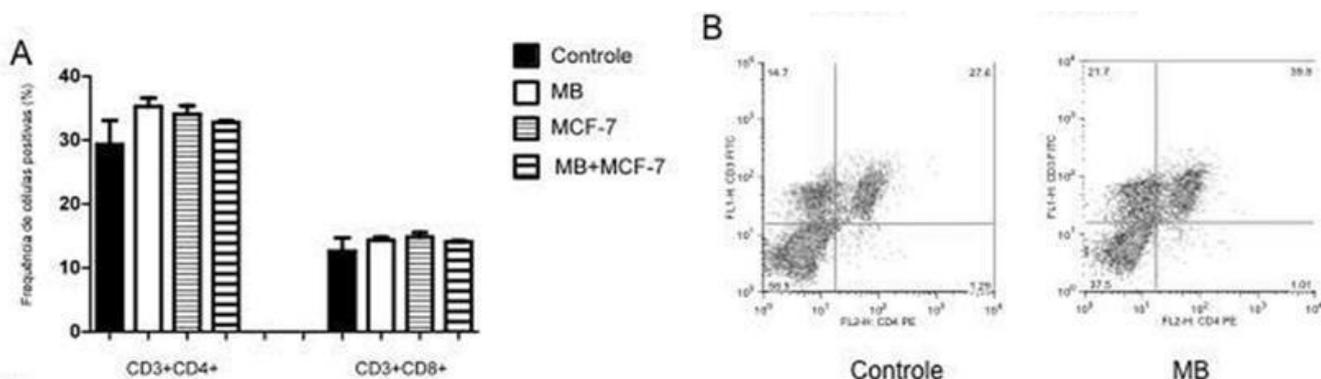
Figura 2 - Avaliação da frequência de células LyG6 positivas (A) e da média de intensidade de fluorescência (B) em esplenócitos de camundongos swiss nos diferentes grupos de tratamento. Dot plot representativo da frequência de células LyG6 positivas nos grupos Controle e MB+MCF-7 (C). Essa população de células foi analisada por citometria de fluxo. Os resultados foram considerados significantes com $p < 0,05$ * quando comparado ao grupo controle e # quando comparado com o grupo tratado com MCF-7 e EAMB.



Fonte: Elaborado pelos autores

Para fenotipagem de células não aderentes foram analisadas a frequência das populações de células T (CD3+), além das subpopulações de linfócitos T *helper* e citotóxico através dos mar-cadores CD3+CD4+ e CD3+CD8+, respectivamente. Os resultados não mostraram diferenças entre a frequência e populações de células imunes estudadas. Na avaliação das subpopulações de células T, os estímulos não apresentaram diferenças em relação à frequência de células T *helper* citotóxica (figura 3).

Figura 3 - Avaliação da frequência de células CD3+CD4+ (A) em esplenócitos não aderentes obtidos de camundongos swiss tratados com a linhagem MCF-7 com ou sem extrato de MB e controle. Dot plot representativo da frequência de células positivas nos grupos Controle e MB (B). Essas populações de células foram analisadas por citometria de fluxo.

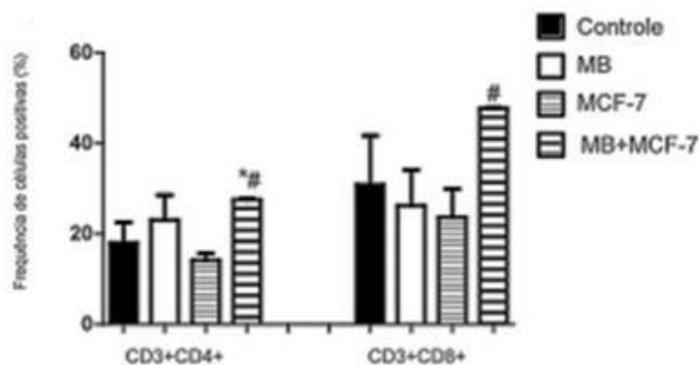


Fonte: Elaborado pelos autores

3.2 | Fenotipagem dos esplenócitos após 5 dias de co-cultura

Após 5 dias em co-cultura, as células foram removidas e feita a fenotipagem para a determinação das subpopulações de linfócitos T. Os resultados mostraram que em co-cultura com MCF-7, os esplenócitos obtidos dos animais estimulados com MCF-7 pré-tratado com mesocampo de babaçu apresentou aumento nas populações de células T helper e citotóxicas. A frequência de células T *helper* nos esplenócitos do grupo de tumor pré-tratado também foi maior que o grupo estimulado só com as células tumorais. Os demais grupos não mostraram diferença em relação ao controle (figura 4).

Figura 4 - Avaliação da frequência de células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ após 5 dias de co-cultura de esplenócitos com células de tumor MCF-7. Os resultados foram considerados significantes com $p < 0,05$ * quando comparado ao grupo controle e # quando comparado ao grupo tratado com linhagem sem extrato.



Fonte: Elaborado pelos autores

4 | Discussão

Para verificar se a resposta imune antitumoral modulada pelo mesocampo de babaçu seria capaz de induzir uma ação específica e, de preferência, citotóxica, foi inoculada linhagem de tumor humano em camundongos. Esta inoculação não teve como objetivo induzir o crescimento do tumor, mas sim, sensibilizar o sistema imune destes animais para os diversos antígenos tumorais presentes na linhagem. A linhagem usada foi a MCF-7, uma linhagem celular que possui diver-

sas características de um epitélio mamário diferenciado, incluindo a capacidade de processar o estradiol por meio de receptores de estrogênio citoplasmáticos e capacidade de formação de nódulos (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2013). Já o EAMB apresenta composição majoritariamente representada por carboidratos, os quais são capazes de induzir atividades fagocíticas (SILVA; PARENTE, 2001). Assim, os animais inoculados com MCF-7 pré-tratados com EAMB apresentaram aumento na expressão de marcador para granulócitos (Ly6G-LY6C), o que sugere um aumento da captura de antígenos, nesse caso antígenos tumorais. As células fagocíticas reconhecem moléculas na superfície de microorganismos através de Receptores de Padrão Molecular Associado à Patogenos (PAMPs do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*) induzindo a ativação com a produção de citocinas inflamatórias, recrutamento de novos fagócitos e diferenciação em Células Apresentadoras de Antígenos (APCs do inglês *Antigen Presenting Cell*) (JANEWAY JÚNIOR; MEDZHITOV, 2002). Dentro dos PAMPs existem receptores capazes de reconhecer carboidratos incomuns nas células do hospedeiro, dentre eles os receptores de manose (FUJITA, 2002). Uma possível explicação para a melhor resposta na presença de células granulocíticas nos animais que receberam o EAMB pode ser pela rica composição em carboidratos do extrato (SILVA; PARENTE, 2001), sugerindo um efeito pró-inflamatório. Além disso, a frequência e a intensidade de expressão do marcador I-A/I-E foi significativa, indicando um aumento de Células Apresentadoras de Antígenos no baço dos animais imunizados com EAMB. A molécula I-A/I-E é uma sub-região codificada de glicoproteína do Complexo Principal de Histo-compatibilidade classe II (MHC-II do inglês *Major Histocompatibility Complex-class II*) envolvido na apresentação de antígenos para os linfócitos T (BHATTACHARYA; DORF; SPRINGER, 1981). Durante a apresentação do antígeno que ocorre pela interação do peptídeo específico associado ao MHC-II com o receptor da célula T (TCR do inglês *T Cell Receptor*), apenas os linfócitos que apresentam um TCR complementar sofrem ativação e expansão clonal (HENNECKE; WILEY, 2001). Os dados sugerem um aumento na capacidade de apresentação de antígenos no órgão linfóide em presença EAMB, favorecendo a ativação das células da imunidade inata e APCs e, por conseguinte, na ativação dos linfócitos antígeno-específicos determinando uma resposta adaptativa. Na análise fenotípica das células não-aderentes, não foi observada diferença entre os grupos logo após a imunização, entretanto quando os esplenócitos foram mantidos em co-cultura foi observada uma linfoproliferação e aumento da frequência de células T citotóxica e helper nas células obtidas dos animais imunizados com tumor e EAMB. Analisando a proporção de linfócitos T CD8+ para linfócitos T CD4+ foi observado que a imunização apresentou uma razão de 1:2. Contudo, após 5 dias de co-cultura com MCF-7, os esplenócitos obtidos dos animais estimulados com MCF-7 pré-tratados com EAMB apresentaram inversão na razão indicando uma maior proporção de células T citotóxicas. Isto sugere uma melhora da resposta imune antitumoral modulada pelo tratamento com o extrato, podendo induzir uma resposta específica antitumoral. Assim, o mesocarpo de babaçu induziu uma melhor resposta imune adaptativa quando utilizado como adjuvante em modelo de imunização com células tumorais, sugerindo um potencial com adjuvante imunológico.

5 | Considerações finais

Com base nos resultados obtidos, o extrato sozinho não mostrou diferenças na avaliação dos órgãos linfóides, mas a fenotipagem sugeriu um aumento de granulócitos e de células apresentadoras de antígeno, induzindo imunogenicidade. As células do grupo do MCF-7 pré-tratadas com o extrato aquoso de mesocarpo de babaçu mostraram uma elevação na frequência de células expressando MHC-II nos esplenócitos aderidos sugerindo o aumento da apresentação de antígeno no baço, efeito que possivelmente foi modulado pelo mesocarpo. Em co-cultura por 5 dias,

os esplenócitos não aderidos dos animais do grupo MCF-7 pré-tratadas com EAMB promoveram linfoproliferação e aumento da frequência de células T helper e citotóxica em relação ao controle. Sintetizando, os resultados sugerem uma melhora da resposta imune pelo tratamento com o extrato, podendo ele possivelmente induzir uma resposta específica, isso justificaria o interesse de testar sua atividade antitumoral frente às células do tumor de mama.

Referências

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Introdução à imunologia: imunologia celular e molecular. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 74p.
- ALBIERO, D.; MACIEL, A. J. S.; GAMERO, C. A. Desenvolvimento e projeto de colhedora de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) para agricultura familiar nas regiões de matas de transição da Amazônia. *Acta Amazônica*, v. 41, n. 1, p. 57-68, 2011.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/HTB-22.aspx>>. Acesso em: 17 jul. 2013.
- AZEVEDO, A.P.S. et al. Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. *J Ethnopharmacol*, v. 111, n. 1, p. 155-159, Apr. 2007.
- BHATTACHARYA, A.; DORF, M. E.; SPRINGER, T. A. A shared alloantigenic determinant on Ia antigens encoded by the I-A and I-E sub regions: evidence for region gene duplication. *Journal Immunol*, v. 127, n. 6, p. 2488-2495, Dec. 1981.
- CARVALHO FILHO, C. J. Influência das dietas ricas em carboidrato sobre a produção de anticorpos auto reativos em camundongos. 2003. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2003.
- CUNHA, L.M. Contribuição ao reconhecimento fito-geográfico do gênero *Orbignya phalerata* na Estado do Maranhão. 1987. 22f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís 1987.
- FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Re-views*, v. 2, p. 346-351, 2002.
- GAITAN E., COOKSEY, R.C. et al. Antithyroid effects in vivo and in vitro of babassu and mandioca: A staple food in goiter areas of Brazil. *Eur J Endocrinol*, v. 131, p. 138-144, 1994.
- GOSS, P. E. et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *The Lancet Oncology*, v. 14, p. 391-436, 2013.
- HENNECKE, J.; WILEY, D. C. T Cell Receptor-MHC interactions up close. *Cell*, v. 104, p. 1-4, 2001.
- JANEWAY JÚNIOR, C. A. Jr.; MEDZHITOV, R. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol*, v. 20, n. 197-216, 2002.
- NASCIMENTO, F. R. et al. Ativação de macrófagos induzida por *Orbignya phalerata* Mart. *J Ethnopharmacol*, v. 103, p. 53–58, 2006.
- PRANCE, G.T. Manual de Botânica do Maranhão. Gráfica. São Luís: Universitária da Universidade Federal do Maranhão, 1985.
- ROSENTHAL, F.R.T. O amido do coco de babaçu, algumas propriedades dos grânulos e das pastas. *Rev. Bras. de Tecno*, v. 6, p. 29-33, 1975.
- SILVA, B. P.; PARENTE, J.P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 887-893, 2001.
- SILVA, J. B. da, MAGALHÃES, H. M. Initiates in cancer control from Brazil's Ministry of Health. *The Lancet Oncology*, v. 14, n. 5, p. 385-386, 2013.