

EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO SELÊNIO ASSOCIADO A VITAMINA E *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS DE CÂNCER DE BEXIGA T24

Bruna Zeferino Pereira, Daniely Alves Leite, Tamires de Almeida Angelos, Eduardo Vargas de Oliveira, Anderson Barros Archanjo, Louisiane de Carvalho Nunes.

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário s/n, Centro – 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, bruna.z.pereira@edu.ufes.br, danielyalvesl@hotmail.com, tamiressangelos@gmail.com, duvargass@hotmail.com, anderson.archanjo@ufes.br, louisiane.nunes@ufes.br.

Resumo

A intoxicação crônica por *Pteridium* sp. (samambaia) causa a enfermidade conhecida como hematúria enzoótica bovina (HEB). Como não existe tratamento específico para essa síndrome, objetivou-se avaliar o efeito terapêutico da suplementação com selênio (Se) e vitamina E sobre células uroteliais da linhagem T24. Para isto, foi realizado o teste *in vitro* com a linhagem T24, no qual as células foram tratadas com selênio e vitamina E de forma isolada e associada, de forma a avaliar a morfologia celular e o número de células atípicas por campo em cada tratamento. Deste modo, foi possível verificar que após 24 horas das células submetidas aos tratamentos não houve diminuição significativa no número de células viáveis, porém, em relação à morfologia celular, o tratamento com Selênio 75 µM, Vitamina E 20 µg/mL e a associação entre Selênio 75 µM com Vitamina E 10 µg/mL mostraram redução do número de células atípicas. Esses achados indicam que a suplementação com selênio e vitamina E pode ser uma alternativa viável para o tratamento da HEB.

Palavras-chave: Hematúria enzoótica bovina. Células uroteliais. Intoxicação. Suplementação. Cultivo celular.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde/Medicina Veterinária.

Introdução

Usualmente, bovinos são intoxicados por *Pteridium* sp. cronicamente, o que pode ocasionar enfermidade conhecida como hematúria enzoótica bovina (HEB), cujo ptaquilosídeo é o principal princípio tóxico (Yamada; Ojika; Kigoshi, 2007).

No caso dos animais intoxicados, comumente são encontradas alterações, a saber: urina avermelhada, hematúria intermitente, prostração, anemia, emagrecimento podendo evoluir para o óbito meses ou anos depois do aparecimento dos primeiros sinais clínicos (Ribeiro; Soto-Blanco, 2020). Juntamente, pode ser observado infiltrado inflamatório, acompanhado de tumores epiteliais ou mesenquimais benignos e malignos, sendo os mais frequentemente encontrados na bexiga carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionais ou uroteliais, porém com baixa probabilidade de metástase (Silva *et al.*, 2012).

Ademais, o tratamento é realizado apenas para a sintomatologia do animal, visto que não existe tratamento específico para intoxicação de *Pteridium* sp., assim como na maioria dos casos descritos não há prognóstico favorável (Pessoa *et al.*, 2019). Diante dessa lacuna, a suplementação com selênio (Se) e vitamina E tem emergido como uma alternativa promissora.

O selênio é um micronutriente essencial, com propriedades anticancerígenas que incluem a indução de apoptose, a redução de inflamações e a proteção contra danos no DNA (Almondes, 2010). A vitamina E, por sua vez, é reconhecida por sua potente ação antioxidante, protegendo membranas celulares e modulando respostas inflamatórias (Meydani *et al.*, 2020). A combinação de selênio e vitamina E demonstra efeitos sinérgicos, potencializando a proteção celular, imunomodulação e a capacidade de combater radicais livres e estresse oxidativo, além de inibir a proliferação celular (Silva, 2015).

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Perante o exposto, faz-se necessário estudos com testes *in vitro*, como o cultivo celular (Alves; Guimarães, 2010), no qual poderá permitir a descoberta de como a suplementação com selênio e vitamina E agem sobre as células de câncer de bexiga e como desencadeiam as ações anticarcinogênicas (Brock *et. al*, 2018) de modo a contribuir com medidas preventivas para a redução das perdas econômicas na bovinocultura nacional, especialmente a leiteira.

Metodologia

O estudo foi conduzido na Sala de Cultivo Celular do Laboratório Multiusuário de Experimentação Animal (CCAUE-UFES). Foi utilizada a linhagem celular T24, derivada de carcinoma de células de transição de bexiga.

As células T24 foram rotineiramente cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e Nutrient Mixture F-10 Ham (F-10), na proporção 1:1, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (25 µg/L). O cultivo foi realizado em frascos de polietileno de 75 cm², com densidade média de 1×10^6 células/mL, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, até atingir confluência.

Para a análise das alterações morfológicas, após atingirem confluência, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 6 poços contendo lamínulas de 24x24 mm autoclavadas, na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL. Em seguida, foram expostas aos tratamentos descritos na Tabela 1.

O selênio foi dissolvido em HCl 0,005N e a vitamina E em etanol 95%, seguindo a metodologia descrita por Venkateswaran, Fleshner e Klotz (2004), com adaptações. Para os grupos controle, as células foram expostas apenas aos respectivos diluentes: HCl 0,005N para o selênio, etanol 95% para a vitamina E e a combinação de HCl 0,005N e etanol 95% para a associação de selênio e vitamina E.

Tabela 1 – Grupos experimentais

Tratamento
HCl 0,005N (Controle negativo 1)
Etanol 95% (Controle negativo 2)
HCl 0,005N + etanol 95% (Controle negativo 3)
Selênio 37,5 µM
Selênio 75 µM
Selênio 150 µM
Vitamina E 5 µg/mL
Vitamina E 10 µg/mL
Vitamina E 20 µg/mL
Selênio 37,5 µM + Vitamina E 5 µg/mL
Selênio 75 µM + Vitamina E 10 µg/mL
Selênio 150 µM + Vitamina E 20 µg/mL

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Após 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, procedeu-se à fixação com metanol por 4 minutos, seguida de lavagem em água destilada. As células foram coradas com hematoxilina por 4 minutos e novamente lavadas em água destilada. Posteriormente, realizou-se desidratação em álcool (três banhos de 3 minutos cada), diafanização em xilol por 3 minutos e montagem das lâminas com lamínula. A avaliação morfológica celular foi realizada em microscópio óptico, com captura de imagens utilizando objetiva de 10x.

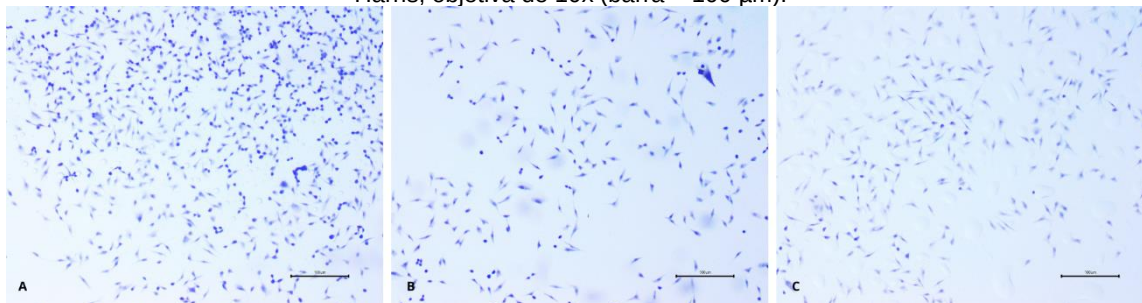
Resultados

No grupo controle tratado com a associação de HCl e etanol (Figura 1), observou-se baixa celularidade, acompanhada de alterações morfológicas evidentes. Entre essas atipias destacaram-se

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

a presença de células multinucleadas, anisocariose, cromatina nuclear grosseira e nucléolos evidentes, podendo estar localizados de forma central ou em múltiplos focos.

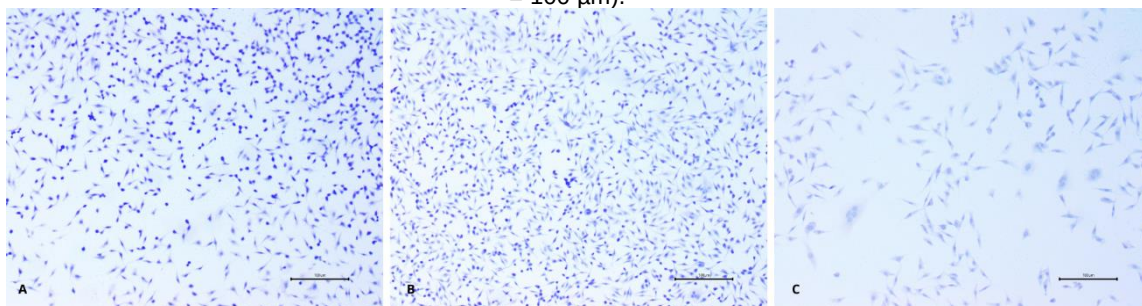
Figura 1 – (a) Fotomicrografia de células uroteliais da linhagem T24 após 24 horas do controle negativo 1; (b) após 24 horas do controle negativo 2 e (c) após 24 horas do controle negativo 3. Coloração de Hematoxilina de Harris, objetiva de 10x (barra = 100 μ m).



Fonte: Os autores.

De modo semelhante, os grupos tratados com Selênio nas concentrações de 37,5 μ M, 75 μ M e 150 μ M (Figura 2) apresentaram padrões de atipia celular comparáveis aos do grupo controle negativo 2, incluindo irregularidades nucleares e presença de células multinucleadas.

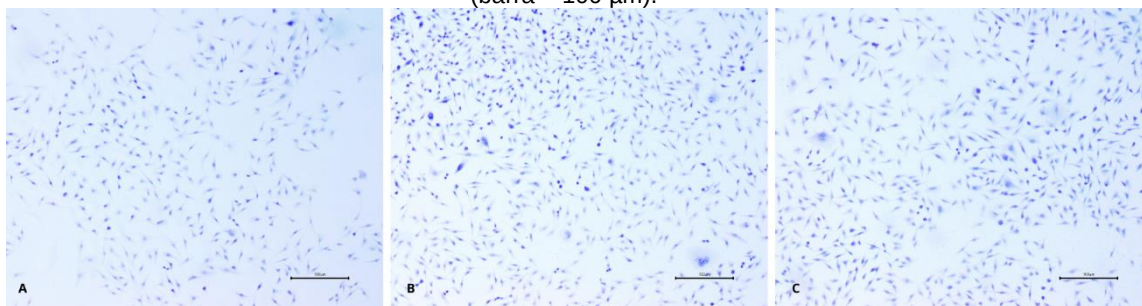
Figura 2 – Fotomicrografia de células da linhagem T24 após 24 horas do tratamento com selênio nas concentrações 37,5 μ M (a), 75 μ M (b) e 150 μ M (c). Coloração de Hematoxilina de Harris, objetiva de 10x (barra = 100 μ m).



Fonte: Os autores.

As células tratadas com Vitamina E nas concentrações 5 μ g/mL, 10 μ g/mL e 20 μ g/mL apresentaram baixa citotoxicidade mesmo em concentrações mais altas, sendo possível observar elevada celularidade com atipias, como múltiplos nucléolos evidentes, anisocariose e discretas células multinucleadas (Figura 3).

Figura 3 – Fotomicrografia de células da linhagem T24 após 24 horas do tratamento com vitamina E nas concentrações 5 μ g/mL (a), 10 μ g/mL (b) e 20 μ g/mL (c). Coloração de Hematoxilina de Harris, objetiva de 10x (barra = 100 μ m).

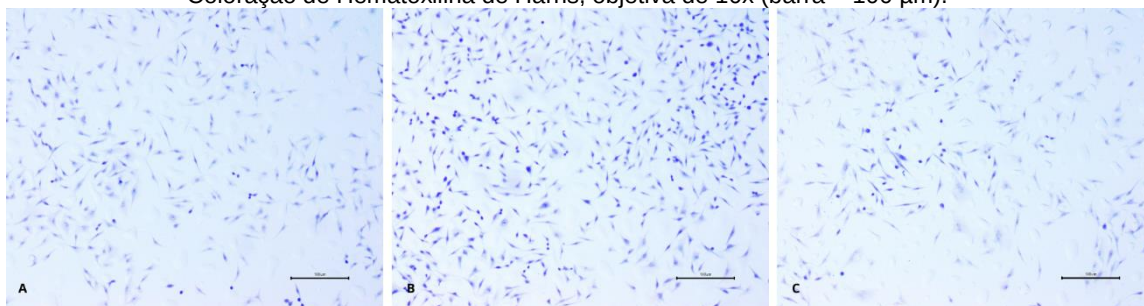


Fonte: Os autores.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Foi observado que a associação de selênio 37,5 μM com vitamina E 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, selênio 75 μM com vitamina E 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e selênio 150 μM com vitamina E 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, consequentemente, apresentaram moderada citotoxicidade, observando-se redução do número de células. No entanto, em relação à morfologia celular, não houve diferença entre os tratamentos (Figura 4)

Figura 4 – Fotomicrografia de células da linhagem T24 após 24 horas do tratamento com: (a) selênio 37,5 μM + vitamina E 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (b) selênio 75 μM + vitamina E 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (c) com selênio 150 μM + vitamina E 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Coloração de Hematoxilina de Harris, objetiva de 10x (barra = 100 μm).



Fonte: Os autores.

Discussão

A suplementação com selênio e vitamina E em animais de laboratório intoxicados por samambaia ou de bovinos com HEB tem sido bastante relatada devido a sua eficiência nas funções metabólicas do organismo que atua na proteção das membranas celulares contra efeitos tóxicos de peróxidos lipídicos e radicais livres, além disso o selênio consegue reverter os efeitos causados pelo ptaquilosideo (Latorre *et al.*, 2011; Lima; Domingues, 2007; Silva, 2015).

Nos tratamentos com doses crescentes de selênio adotados neste estudo verificou-se que houve redução do número de células e das atipias celulares conforme houve aumento da concentração. Achados semelhantes também foram observados por Brinckman *et al.* (2006) e por Moreira Júnior (2024) que relataram que o selênio atua de maneira dose-dependente, além de diminuir a proliferação celular e aumentar a apoptose das células cancerígenas.

Em um trabalho realizado por Lima e Domingues (2007) foi verificado que a vitamina E associada ao selênio é bastante eficaz devido a sua característica oxidante na proteção da membrana celular contra a ação dos radicais livres o que corrobora com os dados obtidos neste trabalho, onde foi observado que a associação selênio e vitamina E causou diminuição das atipias celulares.

Conclusão

O tratamento com selênio e vitamina E se mostraram eficazes *in vitro* sobre as células da linhagem T24 revelando redução do número de células atípicas. Esses achados indicam que a suplementação com selênio e vitamina E pode ser uma alternativa viável para o tratamento da hematúria enzoótica bovina.

Referências

- ALMONDES, Kaluce Gonçalves de Sousa et al. O papel das selenoproteínas no câncer. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 56, p. 484-488, 2010.
- ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo celular. EPSJV, 2010.
- BRINCKMAN, Maree; BUNTINX, Frank; MULS, Erik; ZEEGERS, Maurice P. Use of selenium in chemoprevention of bladder cancer. The lancet oncology 7.9 (2006): 766-774.

A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO**

BROCK, Ethan J; JI, Kyungmin; Shah, Seema; MATTINGLY, Raymond R.; SLOANE, Bonnie F. In vitro models for studying invasive transitions of ductal carcinoma in situ. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, v. 24, p. 1-15, 2018.

LATORRE, A. O. et al. Selenium reverses *Pteridium aquilinum*-induced immunotoxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n.2, p. 464-470, 2011.

LIMA, L. G.; DOMINGUES, J. L. Uso do selênio na produção de bovinos. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 4, n. 4, p. 462-474, 2007.

MEYDANI, Simin Nikbin; BLUMBERG, Jeffrey B. Vitamin E and the immune response. In: *Nutrient modulation of the immune response*. CRC Press, 2020. p. 223-238.

MOREIRA JÚNIOR, Carlos Almeida; OLIVEIRA, Eduardo V.; CARDOSO, Caio A.; MIRANDA, Marcos P. B.; GUEDES, Natália A.; BURAK, Diego L.; PFISTER, James A.; NUNES, Louisiane C. Suplementação com doses crescentes de selênio associado à vitamina E no tratamento de bovinos com hematúria enzoótica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 44, p. e07349, 2024.

PESSOA, Gilson Antonio; SILVA, Jerbeson Hoffman; LIMA, Vanessa de; GUZZON, Barbara; MAINIERI, Alana; SOGARI, Gustavo; PAESE, Milana; MARIAN, Jonatan Molling; LANIUS, Willian. Intoxicação crônica por *Pteridium aquilinum* em bovinos no nordeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 26, n. 1, 2019.

RIBEIRO, Debora da Silva Freitas; SOTO-BLANCO, Benito. Intoxicação por plantas do gênero *Pteridium* (Dennstaedtiaceae) em animais de produção. 2020.

SILVA, J. F. Selênio, atividade biológica e sua relação com o câncer: uma revisão de literatura. *Nutrivisa*, v. 2, n. 1, p. 33-40, 2015.

SILVA, Maria Aparecida da; SOUSA, Dyeime Ribeiro da; MADUREIRA, Ana Paula; NUNES, Louisiane de Carvalho. Caracterização histopatológica de bexigas associadas à hematúria enzoótica bovina. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 34, n. 4, p. 319-326, 2012.

YAMADA, Kiyoyuki; OJIKI, Makoto; KIGOSHI, Hideo. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Natural Product Reports*, v. 24, n. 4, p. 798-813, 2007.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) editais: nº 21/2018 - Universal (TO137/2019) e nº 04/2022 Programa de Apoio aos Programas de Pós-Graduação Capixaba Emergentes (PROAPEM).