

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Faculdade de Medicina

Universidade de Coimbra

2013



Avaliação dos efeitos imunomoduladores da alimentação  
no BALB, num modelo experimental de cancro de mama  
induzido por 1,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)

Pedro Filipe Martins de Melo Ferreira

Orientadores:

Professor Doutor António Silvério Cabrita

Mestre Dr<sup>a</sup>. Ana Calado Lopes

# **Avaliação dos efeitos imunomoduladores da alimentação no BALT, num modelo experimental de cancro de mama induzido por 1,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)**

Ferreira, P<sup>(1)</sup>, Calado, A<sup>(2)</sup>, Cabrita, AS<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Pedro Ferreira\*

\* Estudante do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra, Portugal

<sup>(2)</sup> Ana Calado\*

Assistente de Anatomia Patológica na Escola Universitária Vasco da Gama

<sup>(3)</sup> António Silvério Cabrita\*

\* Professor e Diretor do serviço de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

*Endereço:*

Pedro Ferreira – pedrof@live.com.pt

Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Av. Bissaya Barreto, Bloco de Celas, 3000-075 Coimbra, Portugal

## Índice

Resumo.....	p 3
Introdução e Objetivos.....	p 4
Materiais e Métodos.....	p 8
Resultados.....	p 12
Discussão.....	p 25
Conclusões.....	p 29
Agradecimentos.....	p 30
Bibliografia.....	p 31
Anexos.....	p 37

## Resumo

*Introdução:* O sistema respiratório tem a capacidade de metabolizar os xenobióticos que chegam tanto pelo ar como pela corrente sanguínea. Estes podem desempenhar um papel importantíssimo na alteração celular e carcinogénese. O dimetilbenzantraceno (DMBA) é um destes compostos carcinogénicos e com comprovados efeitos de inibição do sistema imunitário. O BALT é um dos locais indutores da resposta antigénica e a modulação desta resposta reveste-se de interesse quanto aos seus potenciais efeitos sistémicos e em particular a nível da cavidade oral. *Objectivos:* O objetivo deste trabalho é identificar, avaliar e concluir quanto aos potenciais efeitos imunomoduladores da alimentação, por avaliação do BALT, num modelo experimental de cancro de mama induzido por DMBA em grupos de ratos Sprague-Dawley sujeitos a diferentes planos dietéticos e inferir quanto às possíveis implicações destes efeitos para a saúde oral. *Materiais e Métodos:* A 168 animais, divididos em 7 grupos sendo um controlo e seis com administração do carcinogénio DMBA e planos dietéticos diferentes. Após o sacrifício e a necrópsia, foram observadas ao microscópio ótico 168 preparações histopatológicas de tecido pulmonar, e o BALT avaliado aplicando histopatologia com gradação semi-quantitativa quanto aos folículos e centros germinativos, área interfolicular, células apoptóticas, células plasmáticas, macrófagos pigmentados e HEV proeminentes. *Resultados:* O grupo sujeito a uma dieta de restrição calórica apresentou consistentemente parâmetros de resposta imunológica mais elevados, seguido do grupo alimentado com dieta mediterrânica e o grupo com dieta suplementada com feijão. Parâmetros mais diminuídos foram observados no grupo com dieta suplementada com azeite seguido do grupo sujeito apenas ao carcinogénio e alimentado com ração “padrão”. *Conclusões:* Os dados obtidos parecem indicar um efeito imunomodulador da dieta no BALT, apontando para uma maior influência estimulatória da fibra alimentar e restrição calórica em relação aos outros alimentos estudados, e um efeito inibidor com o azeite.

## Palavras-chave

BALT; MALT; Imunomodulação; Nutrição; Dieta; Cancro; DMBA

## Introdução

O sistema respiratório tem uma grande área de interface entre o meio interno e o meio externo. Como tal está biologicamente preparado para inativar e processar agentes patogénicos químicos, físicos e biológicos. Os mecanismos não-específicos de defesa estão presentes e ativos antes do contacto direto com as partículas patogénicas. São exemplos de mecanismo não-específicos: a filtração de partículas na cavidade nasal, a adsorção de vapores químicos, as respostas reflexas às mudanças na ventilação, o transporte mucociliar e tosse e a fagocitose por macrófagos alveolares e intravasculares, entre outros. Já os mecanismos específicos de defesa são a resposta imunológica iniciada após a entrada de microrganismos como vírus e bactérias patogénicas. Neste âmbito, distinguem-se (1) a imunidade humoral, mediada por linfócitos B que produzem anticorpos eficazes na opsonização e neutralização de microrganismos extracelulares e toxinas e (2) a imunidade celular, mediada por linfócitos T capazes de reconhecer e destruir células infetadas por microrganismos intracelulares eliminando deste modo os múltiplos focos de infeção<sup>1-3</sup>.

No sistema respiratório o tecido linfoide encontra-se na forma nodular e difusa. Entre as células epiteliais da mucosa respiratória, encontram-se linfócitos T e na lâmina própria da mucosa encontram-se linfócitos B e T em organização folicular e difusa que constituem o *Nasal Associated, Lymphoid Tissue* (NALT), presente na cavidade nasal e nasofaringe e o *Bronchus Associated Lymphoid Tissue* (BALT). Num plano mais organizado encontram-se os gânglios linfáticos regionais ao pulmão<sup>1</sup>.

Os tecidos linfoides associados aos brônquios foram primeiramente descritos por Bienenstock em 1973 como agregados de linfócitos, localizados na submucosa brônquica<sup>4-6</sup>. Atualmente, reconhece-se o BALT como uma estrutura organizada em folículos com linfócitos B e zona interfolicular com linfócitos T. Fazem ainda parte do BALT as vénulas de endotélio alto (HEV) e um linfoepitélio sobrejacente<sup>7-10</sup>. Existem também células foliculares dendríticas no BALT, cuja função é apresentar antígenos aos linfócitos B<sup>11</sup>, assim como fornecer sinais coestimulatórios que aumentam a sua ativação e a ainda a proliferação de centros germinativos<sup>12,13</sup>. As células T por sua vez, são capazes de ativar os linfócitos B para produzirem IgA, muito relevante na resposta imunitária das mucosas, local prevenindo a aderência e entrada de bactérias patogénicas para o organismo<sup>1,14-19</sup>. Ainda que a distribuição de BALT ao longo do trato respiratório seja aleatória, encontra-se consistentemente presente em redor da

bifurcação da árvore brônquica entre uma artéria e um brônquio/bronquíolo. Esta localização mais sujeita a fenómenos de deposição de bactérias de vírus potencia a exposição destas etiologias ao sistema imunitário<sup>20-22</sup>. A hematologia laboratorial não traduz a atividade do BALT, pelo que a sua avaliação é feita por histopatologia adjuvada de semiquantificação<sup>20</sup>.

A aplicação de protocolos experimentais em imunotoxicologia requer o uso de diferentes espécies como modelos animais, e ainda que em muitos casos a informação possa ser extrapolada entre espécies, existem numerosas e significativas diferenças que importa considerar para obter bons resultados. Este ponto reveste-se de particular importância neste campo, sendo muitas vezes difícil avaliar como diferenças entre espécies, em termos da estrutura e funcionamento do sistema imunitário, influenciam a necessária extrapolação para a espécie humana. É fundamental não cair na tendência de assumir que todos os modelos animais são imunologicamente semelhantes ao rato e que este é imunologicamente semelhante ao humano<sup>4</sup>.

De acordo com a definição mais atual, o BALT foi descrito em coelhos, ratos Sprague-Dawley, cobaios, ratinhos, cães e galinhas. Em humanos foi descrito como focos difusos de tecido linfóide subepitelial nos brônquios. A quantidade de BALT é também significativamente diferente, sendo mais exuberante no coelho e rato, menos presente no homem e em quantidade intermédia em ratinhos e cobaios<sup>4,20,23-25</sup>. Nos humanos, a frequência de BALT é extremamente baixa em pessoas com mais de 20 anos mas pode tornar-se proeminente em situações patológicas. O seu desenvolvimento foi associado não apenas a estimulação antigénica extrínseca mas também a alterações da resposta imunitária<sup>23,25-30</sup>.

A área da imunotoxicologia tem constantemente avaliado e as metodologias para a avaliação de xenobióticos no sistema imunitário. A histopatologia com gradação semi-quantitativa do tecido linfóide ou *Lymphoid Enhanced Histopathology* (EH) consiste na avaliação e gradação separada dos compartimentos dos órgãos linfóides, níveis de zero a quatro, para identificar alterações tanto no sentido do aumento como da diminuição da quantidade de células, de folículos linfóides ou de centros germinativos<sup>31-33</sup>. Esta metodologia permite inferir acerca dos estimuladores versus inibidores no sistema imunitário; identificar os locais ou compartimentos afetados nos órgãos ou tecidos; fornecer informação acerca da suposta população celular afetada; e caracterizar as relações dose-resposta dos efeitos imunomoduladores<sup>32</sup>.

A EH implica uma correta obtenção e processamento dos tecidos, avaliação e comparação com a patologia clínica, determinação e consideração do peso corporal e dos diferentes órgãos, o uso de critérios apropriados para a classificação da gravidade, e consideração de outros fatores como lesões espontâneas ou induzidas em órgãos não linfáticos, fatores ambientais, estado de saúde geral do animal, nutrição, carga antigénica, idade, sexo, estado hormonal, e fatores de stress<sup>33</sup>. Assim, há a necessidade de um vasto conhecimento acerca da estrutura, função e histologia dos órgãos, das suas diferenças entre espécies, e uma visão alargada da complexa e dinâmica natureza do sistema imunitário, incluindo a forma como os diferentes sistemas de órgãos interagem entre si<sup>32,34-36</sup>.

Embora perdendo em relação a métodos de análise funcional, a EH possui um nível de exatidão razoável na identificação de compostos imunomoduladores se executada de forma rigorosa, permitindo a deteção de alterações dos tecidos e limitando os falsos positivos. No entanto, a sua eficácia depende também e em grande medida, da experiência e treino do patologista e da gravidade aparente das lesões presentes<sup>32,37,38</sup>.

EH não é normalmente apropriada em estudos crónicos pois pode levar a resultados confusos, resultantes dos normais efeitos da idade nos órgãos linfoides, que podem interferir na avaliação dos tecidos. Pode, no entanto, ser usada com validade em estudos de curta duração ou subcrónicos para avaliação inicial ou quando existe um potencial efeito imunomoduladores<sup>32,33,39</sup>. Os principais aspetos a considerar em EH do tecido linfoide são os folículos linfoides, os centros germinativos, a área interfolicular e as vénulas de endotélio alto<sup>32</sup>.

O sistema respiratório tem a capacidade de metabolizar os xenobióticos que chegam tanto pelo ar como pela corrente sanguínea. Estes podem desempenhar um papel importantíssimo na alteração celular e carcinogénese. É o caso dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos quimicamente inertes que podem necessitar de ativação por enzimas para formar metabolitos com capacidade de interagir com o ácido desoxirribonucleico (ADN), para iniciar a transformação celular<sup>40</sup>. Para além desta ação direta na indução de neoplasias, é possível que este efeito carcinogénico esteja também relacionado com os seus comprovados efeitos de inibição do sistema imunitário<sup>1</sup>. Um destes compostos, o dimetilbenzantraceno (DMBA), é carcinogénico no

rato, e especialmente útil quando se pretende a formação tumoral em estudos sobre o cancro da mama, do estômago, do pulmão e do tecido linfoide<sup>41</sup>.

O objetivo deste trabalho é identificar, avaliar e concluir quanto aos potenciais efeitos imunomoduladores da alimentação, por avaliação do BALT, num modelo experimental de cancro de mama induzido por 1,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) em grupos de ratos Sprague-Dawley sujeitos a diferentes planos dietéticos. Pretende-se também inferir quanto às possíveis implicações destes efeitos para a saúde oral.

## **Materiais e Métodos**

O material para histopatologia de BALT foi gentilmente cedido pela Professora Doutora Paula Pereira. Os métodos que se apresentam estão simplificados a partir das suas publicações.

### **A. Material**

168 Ratos Sprague Dawley fêmea inicialmente com 42 dias de idade distribuídos aleatoriamente em sete grupos. Os animais foram mantidos em 42 gaiolas em grupos de quatro, em sala à temperatura de 25 °C e 60 a 65% de humidade, com regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão.

A todos os grupos, com exceção do grupo I, considerado grupo controlo, aos 50 dias de idade foram administrados com 20 mg de DMBA dissolvido em 1 ml de azeite e através de uma sonda gástrica, para indução de cancro de mama.

A água foi fornecida aos animais de acordo com as suas necessidades, sendo renovada diariamente. A experiência teve a duração de 150 dias para todos os grupos. A dieta foi diferente entre os grupos como se detalha em seguida:

- No **grupo I** foi administrada uma Alimentação “padrão” (300 Kcal/100g de peso de ração).
- No **grupo II** foi administrado 20 mg de DMBA em 1ml de azeite para cada animal por sonda intragástrica. O valor energético desta ração foi de 300 Kcal/100 g de peso de ração.
- No **grupo III** a alimentação “padrão” foi suplementada com feijão (misturou-se 40 g de feijão “Padrão Tarreste” sob a forma liofilizada, a 1 kg de ração padrão) mais administração de carcinógeno - 20 mg de DMBA em 1ml de azeite para cada animal por sonda intragástrica. Nesta ração o valor calórico foi de 341 Kcal/100 g, das quais 41 Kcal provêm do feijão.

- No **grupo IV**, a alimentação “padrão” foi suplementada com azeite (50 ml de azeite por kg de ração “padrão”) mais administração de carcinogénio - 20 mg de DMBA em 1ml de azeite para cada animal por sonda intragástrica. Nesta ração o valor calórico foi de 341 Kcal/100 g, das quais 41 Kcal provêm do azeite.

- No **grupo V**, a alimentação foi rica em fibra bruta (teor de fibra 4 vezes superior ao da ração “padrão”) mais administração de carcinogénio - 20 mg de DMBA em 1 ml de azeite para cada animal por sonda intragástrica. O valor energético desta ração foi de 250 Kcal/ 100 g de peso de ração.

- No **grupo VI**, a alimentação rica em fibra bruta (teor de fibra 4 vezes superior ao da ração “padrão”) foi suplementada com feijão e azeite (misturou-se 19,95 g de feijão “Padrão Tarreste” sob a forma liofilizada e 25 ml de azeite a 1kg de ração rica em fibra bruta) mais administração de carcinogénio - 20 mg de DMBA em 1ml de azeite para cada animal por sonda intragástrica. Nesta ração o valor calórico foi de 291 Kcal/100 g, das quais 20,5 Kcal provêm do feijão e 20,5 Kcal provêm do azeite.

- No **grupo VIII**, a alimentação “padrão” suplementada de uma refeição do tipo mediterrânico (22 g de batata, correspondendo a 100 g antes da liofilização + 32 g de sardinha, correspondendo a 120 g antes da liofilização + 4,3 g de tomate, correspondendo a 50 g antes da liofilização + 3,5 g de pimento, correspondendo a 50g antes da liofilização + 0,196 de cebola, correspondendo a 8 g antes da liofilização + azeite cru na proporção de 2,18 ml (2 g) a 1 kg de ração “padrão”) mais administração de carcinogénio - 20 mg de DMBA em 1ml de azeite para cada animal por sonda intragástrica. Nesta ração o valor calórico foi de 341 Kcal/100 g, das quais 41 Kcal provêm da refeição do tipo mediterrânico.

Tabela I- Resumo das diferentes dietas aplicadas a cada grupo

GRUPOS	CARCINOGENIO	DIETA
I	-	Padrão
II	+	Padrão
III	+	Padrão + feijão
IV	+	Padrão + azeite
V	+	Padrão + fibra
VI	+	Padrão + feijão + azeite
VII	+	Padrão + dieta mediterrânica

## B. Métodos

O sacrifício dos animais sobreviventes foi efetuado pelo método de sobredosagem de anestésico, individualmente, ao fim de 150 dias. Aquando do sacrifício foi feita nova colheita de 1 ml de sangue/animal, para a realização de determinações analíticas.

A necrópsia completa foi efetuada em todos os animais sacrificados. Todos os órgãos com alterações macroscópicas foram colhidos para estudo em microscopia ótica. Em todos os animais foram pesquisados gânglios linfáticos e colhidos para histopatologia de rotina fragmentos dos pulmões, dos rins, do fígado, do baço, do pâncreas, de gordura abdominal e de gânglios linfáticos<sup>42</sup>.

Neste estudo foram observadas ao microscópio ótico 168 preparações histopatológicas de tecido pulmonar, obtidas de 125 animais distintos, correspondendo

a: 45 do grupo I, 37 do grupo II, 16 do grupo III, 18 do grupo IV, 21 do grupo V, 13 do grupo VI e 18 do grupo VII.

Em cada observação foram identificados e avaliados os folículos e centros germinativos (CG) quanto ao seu número (Nº) e tamanho (Tam.), a zona interfolicular quanto ao seu tamanho, e em ambas a quantidade de linfócitos presentes. Foi ainda avaliada a presença de células apoptóticas (CA), células plasmáticas (CP), macrófagos pigmentados (MP) e HEV proeminentes. A terminologia usada foi descritiva e objetiva, de acordo com as recomendações para a avaliação histopatológica de tecidos linfoides, sendo cada parâmetro classificado como “normal” (0), “aumento” (números positivos) ou “diminuição” (números negativos), e de forma “mínima” (1), “ligeira” (2), “moderada” (3) ou “marcada” (4). Segue-se a análise descritiva dos resultados obtidos.

## Resultados

**Tabela II – Registo semi-quantitativo das alterações do BALT no grupo I**

Grupo I			Folículos					Área interfolicular		Número aumentado de:			
Código da preparação			Nº	Tam.	Nº Linf.	Nº CG	Tam. CG	Tam.	Nº Linf.	CA	CP	MP	HEV
221	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
222	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
222	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
223	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
223	O5	B1	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	0
224	O5	A1	0	0	0	0	0	2	3	0	1	0	2
224	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
225	O5	A1	0	0	0	0	0	1	1	0	2	1	0
225	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
226	O5	A1	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0
226	O5	B1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
227	O5	A1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1	2
227	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
228	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
228	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
229	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
229	O5	B1	2	3	2	0	0	3	3	1	1	1	0
230	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
230	O5	B1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	0
231	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
231	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
232	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
232	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
233	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
233	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
234	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
234	O5	B1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
235	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
235	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
236	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
236	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
237	O5	A1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0
237	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
238	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
238	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
239	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
239	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
240	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
240	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
241	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
241	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
242	O5	A1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0
242	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
243	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
243	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0

**Tabela III – Registo semi-quantitativo das alterações do BALT no grupo II**

Grupo II			Folículos					Área Interfolicular		Número aumentado de:			
Código da preparação			Nº	Tam.	Nº Linf.	Nº CG	Tam. CG	Tam.	Nº Linf.	CA	CP	MP	HEV
156	O5	A1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
156	O5	B1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
157	O5	A1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
157	O5	B1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
244	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
244	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
245	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
245	O5	B1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	1	0
246	O5	A1	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	1	0
246	O5	B1	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	1	0
247	O5	A1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
247	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
248	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
248	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
249	O5	A1	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	2	0
249	O5	B1	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	1	0
250	O5	A1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0
250	O5	B1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0
251	O5	B1	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	1	0
252	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	1	0
252	O5	B1	0	0	0	0	0	-2	-3	0	0	1	0
253	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	1	0
253	O5	B1	0	0	0	0	0	-3	-3	0	0	1	0
254	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	1	0
254	O5	B1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0
255	O5	A1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0
255	O5	B1	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	1	0
256	O5	A1	0	0	0	0	0	-3	-2	0	0	1	0
256	O5	B1	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	1	0
257	O5	A1	0	0	0	0	0	0	-3	0	0	1	0
257	O5	B1	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	1	0
258	O5	A1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	2	0
258	O5	B1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	1	0
259	O5	A1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	1	0
259	O5	B1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	2	0

**Tabela IV – Registo semi-quantitativo das alterações do BALT no grupo III**

Grupo III			Folículos					Área interfolicular		Número aumentado de:			
Código da preparação			Nº	Tam.	Nº Linf.	Nº CG	Tam. CG	Tam	Nº Linf.	CA	CP	MP	HEV
339	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	0	0
340	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
341	O5	A1	0	0	0	0	0	-1	-2	0	2	3	0
342	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
349	O5	B1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0
355	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
356	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
358	O5	A1	0	0	0	0	0	3	4	0	0	3	0
359	O5	A1	0	2	2	3	3	2	2	0	0	3	0
400	O5	A1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	2	0
403	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
404	O5	A1	0	0	0	0	2	0	0	2	0	1	0
407	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0

**Tabela V – Registo semi-quantitativo das alterações do BALT no grupo IV**

Grupo IV			Folículos					Área Interfolicular		Número aumentado de:			
Código da preparação			Nº	Tam.	Nº CG	Tam. CG	Nº Linf.	Tam.	Nº Linf	CA	CP	MP	HEV
300	O5	A1	0	0	0	0	0	-3	-3	0	0	2	0
301	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	0	0
302	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	2	0
303	O5	A1	0	0	0	0	0	-3	-3	0	2	2	0
304	O5	A1	0	0	0	0	0	-1	-3	0	0	0	0
305	O5	A1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0
306	O5	A1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0
307	O5	A1	0	0	0	0	0	-3	-3	0	2	2	0
308	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	0	0
309	O5	A1	0	0	0	0	0	-3	-3	0	0	2	0
310	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-3	0	0	2	0
311	O5	A1	0	0	0	0	0	-3	-3	0	0	0	0
312	O5	A1	0	0	0	0	0	3	3	0	3	0	0
313	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	0	0
314	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
315	O5	A1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0
316	O5	A1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	3	0
317	O5	A1	0	0	0	0	0	-2	-2	0	0	1	0

**Tabela VI - Registo semi-quantitativo das alterações do BALT no grupo V**

Grupo V			Folículos					Área Interfolicular		Número aumentado de:			
Código da preparação			Nº	Tam.	Nº Linf.	Nº CG	Tam. CG	Tam.	Nº Linf.	CA	CP	MP	HEV
318	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
319	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
320	O5	A1	2	3	2	2	2	4	4	2	0	2	0
321	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
322	O5	A1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	2	2
323	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
324	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
325	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
326	O5	A1	2	3	3	0	2	3	3	3	0	2	0
327	O5	A1	3	3	3	3	3	2	2	3	0	2	0
328	O5	A1	2	2	2	2	2	2	2	0	0	2	0
329	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
330	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
331	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
332	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
333	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
334	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
335	O5	A1	2	2	2	2	2	2	2	3	0	2	0
336	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
337	O5	A1	0	0	0	2	2	2	2	3	0	2	0
338	O5	A1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0

**Tabela VII - Registo semi-quantitativo das alterações do BALT no grupo VI**

Grupo VI			Folículos					Área Interfolicular		Número aumentado de:			
Código da preparação			Nº	Tam.	Nº Linf.	Nº CG	Tam. CG	Tam.	Nº Linf.	CA	CP	MP	HEV
348	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0
398	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
399	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
399	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0
401	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
401	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
408	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0
409	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
410	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
411	O5	A1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0
412	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
413	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
414	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0

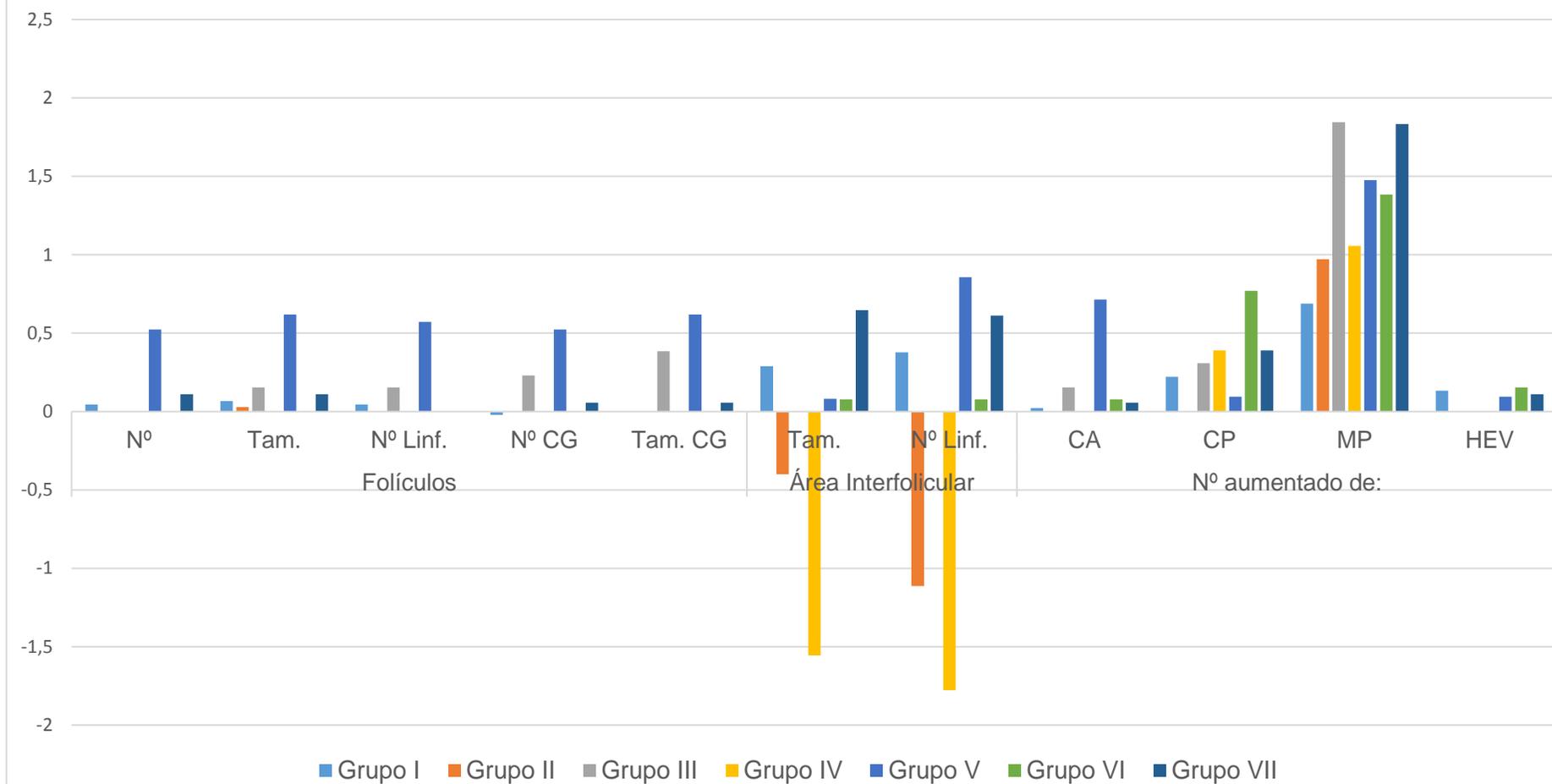
**Tabela VIII - Registo semi-quantitativo das alterações do BALT no grupo VII**

Grupo VII			Folículos					Área Interfolicular		Número aumentado de:			
Código da preparação			<i>Nº</i>	<i>Tam.</i>	<i>Nº Linf.</i>	<i>Nº CG</i>	<i>Tam. CG</i>	<i>Tam.</i>	<i>Nº Linf.</i>	<i>CA</i>	<i>CP</i>	<i>MP</i>	<i>HEV</i>
343	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
346	O5	A1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	3	0
396	O5	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0
397	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
397	O5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
402	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
415	O5	A1	1	1	0	0	0	3	3	0	0	2	1
416	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
417	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0
418	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
419	O5	A1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
420	O5	A1	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	2	0
421	O5	A1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1
422	O5	A1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	2	0
423	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
424	O5	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0
425	O5	A1	0	0	0	0	0	2	2	0	3	0	0
426	O5	A1	0	0	0	1	1	2	2	0	0	0	0

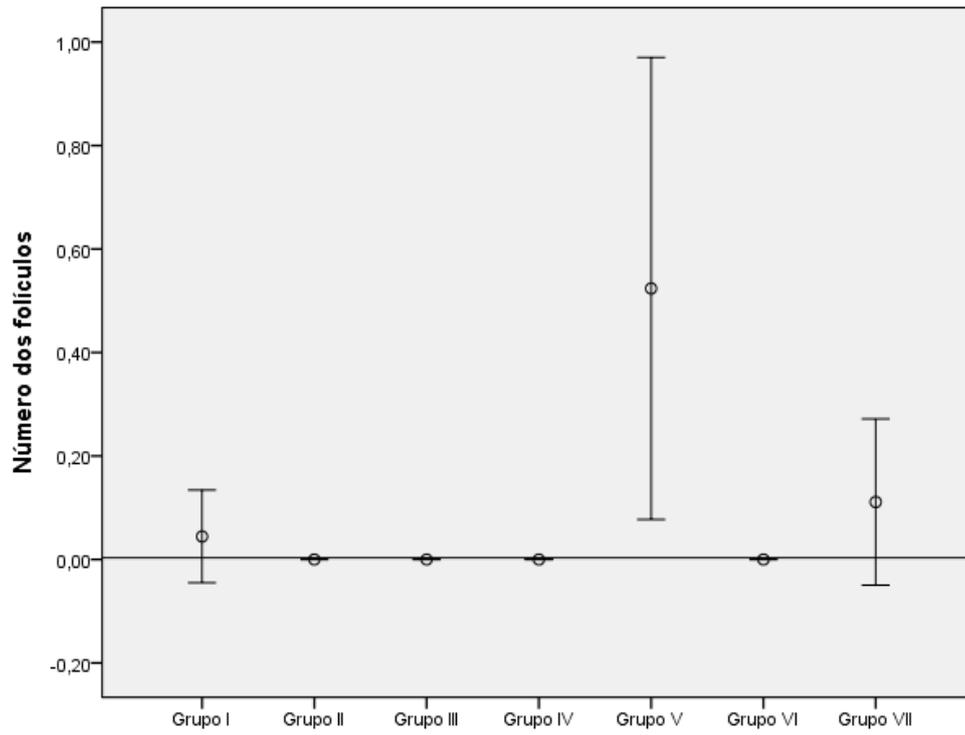
**Tabela IX – Valores médios das variáveis estudadas para os diferentes grupos**

Grupos	Folículos					Área Interfolicular		Número aumentado de:			
	Nº	Tam.	Nº Linf.	Nº CG	Tam. CG	Tam.	Nº Linf.	CA	CP	MP	HEV
<i>Grupo I</i>	0,0444	0,0667	0,0444	-0,0222	0	0,2889	0,3778	0,0222	0,2222	0,6889	0,1333
<i>Grupo II</i>	0	0,0286	0	0	0	-0,4	-1,1143	0	0	0,9714	0
<i>Grupo III</i>	0	0,1538	0,1538	0,2308	0,3846	0	0	0,1538	0,3077	1,8462	0
<i>Grupo IV</i>	0	0	0	0	0	-1,5556	-1,7778	0	0,3889	1,0556	0
<i>Grupo V</i>	0,5228	0,619	0,5714	0,5238	0,619	0,0809	0,8571	0,7142	0,0952	1,4762	0,0952
<i>Grupo VI</i>	0	0	0	0	0	0,0769	0,0769	0,0769	0,7692	1,3846	0,1538
<i>Grupo VII</i>	0,1111	0,1111	0	0,0556	0,0556	0,6471	0,6111	0,0556	0,3889	1,8333	0,1111

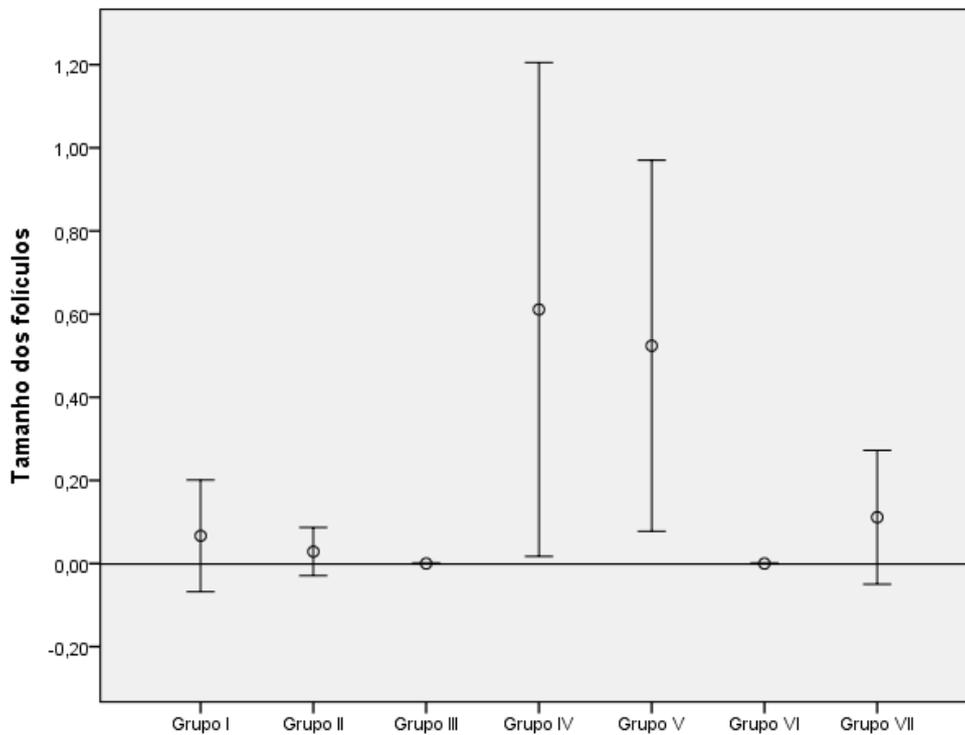
Gráfico 1 - Valores médios das variáveis estudadas para os diferentes grupos



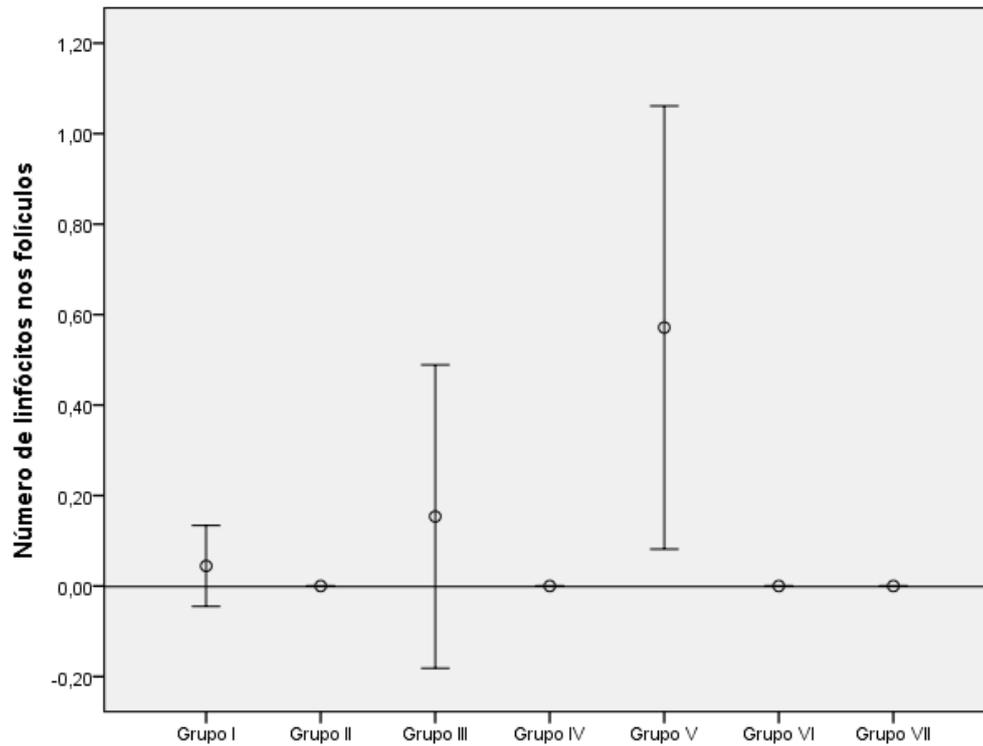
**Gráfico 2** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Número dos folículos”



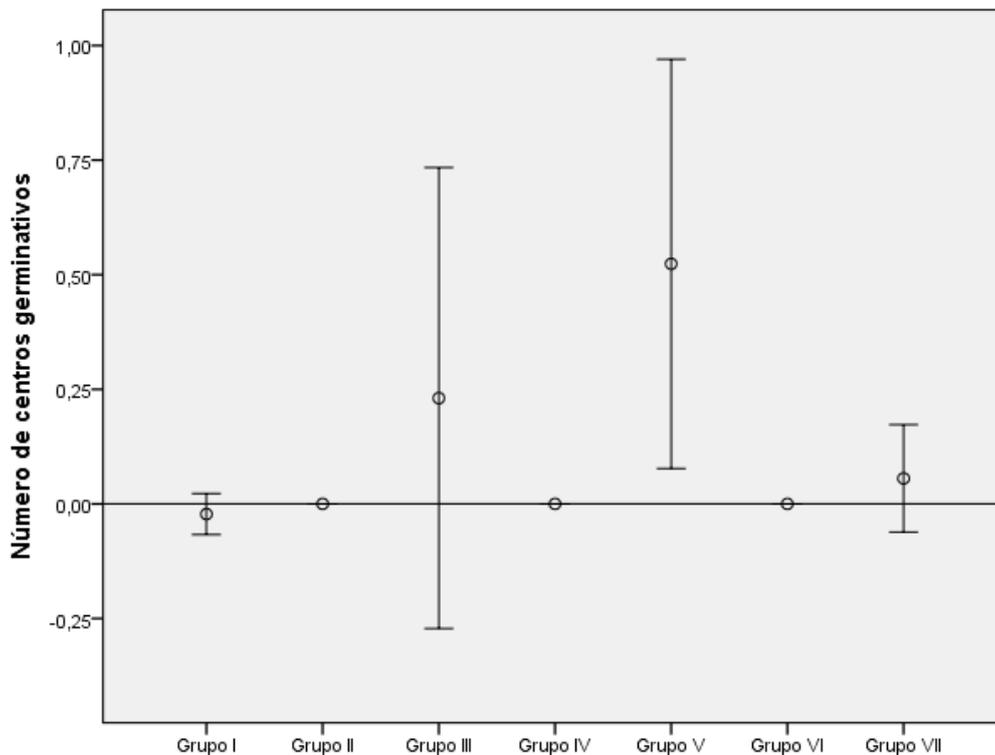
**Gráfico 3** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Tamanho dos folículos”



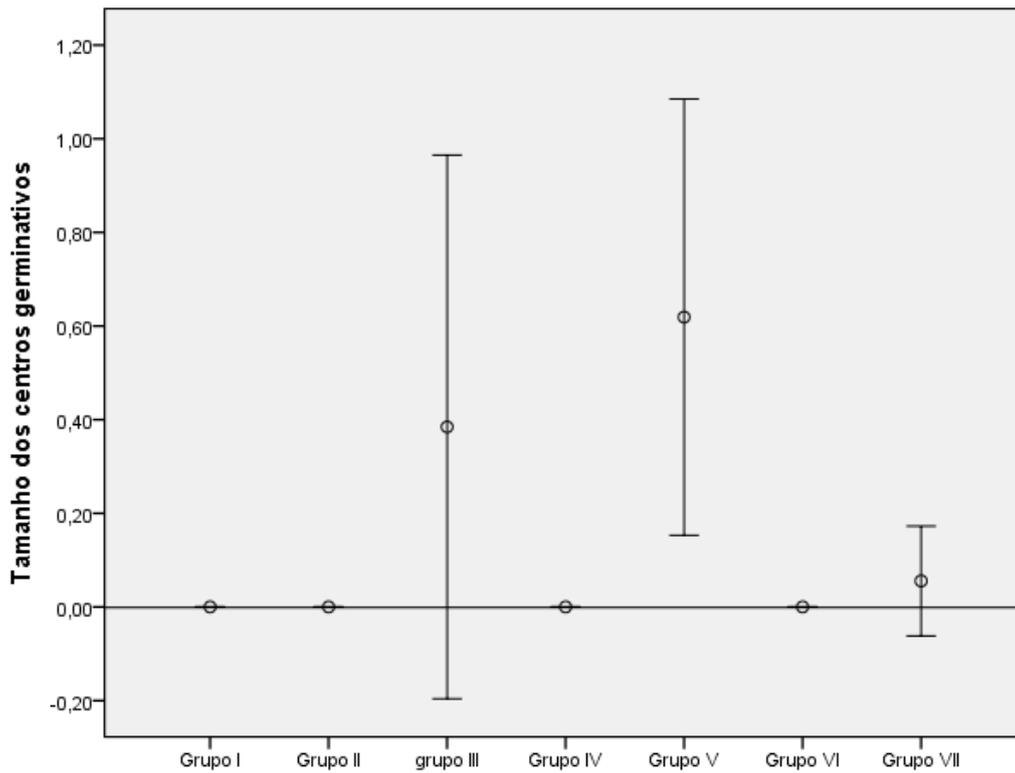
**Gráfico 4** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Número dos linfócitos nos folículos”



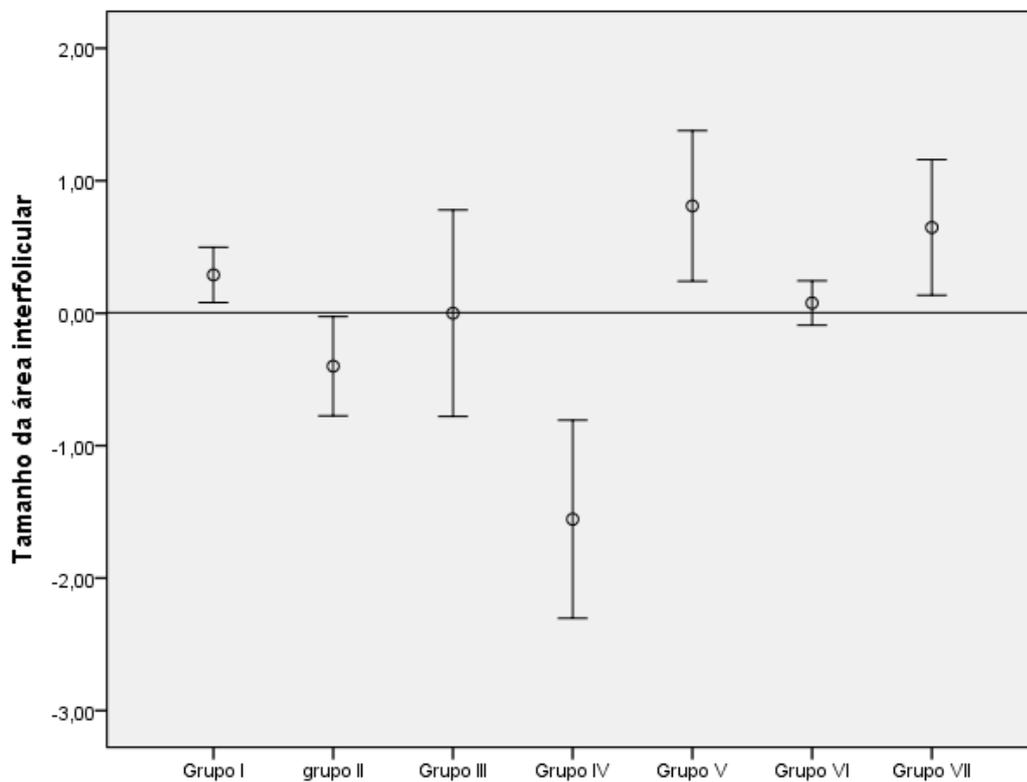
**Gráfico 5** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Número de centros germinativos”



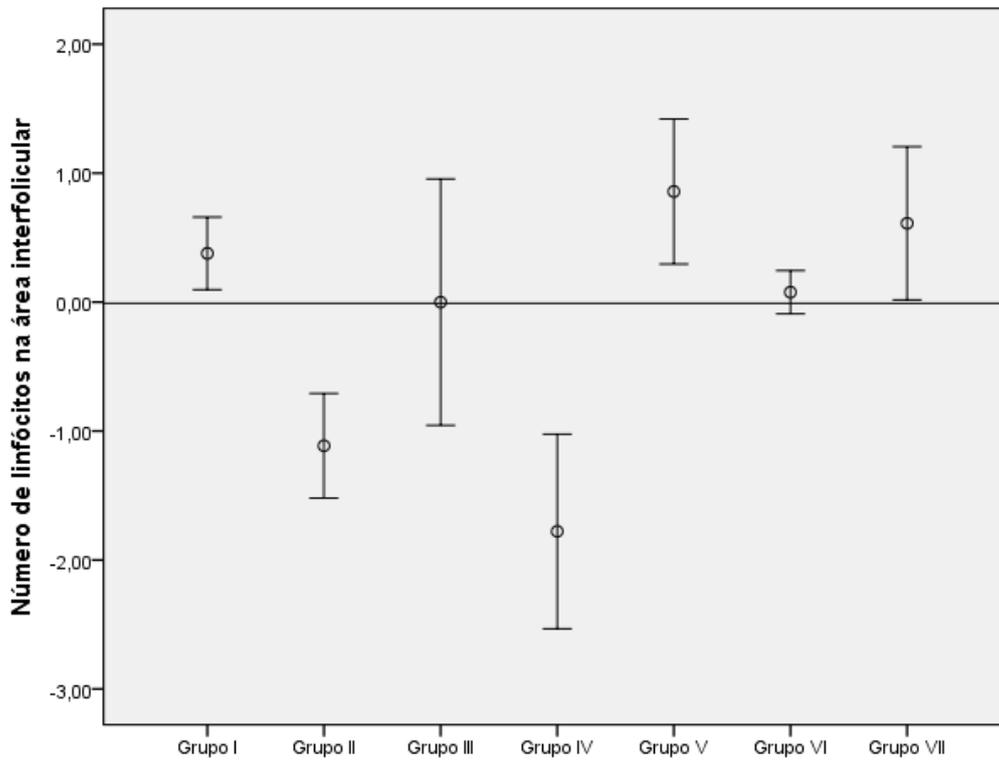
**Gráfico 6** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Tamanho de centros germinativos”



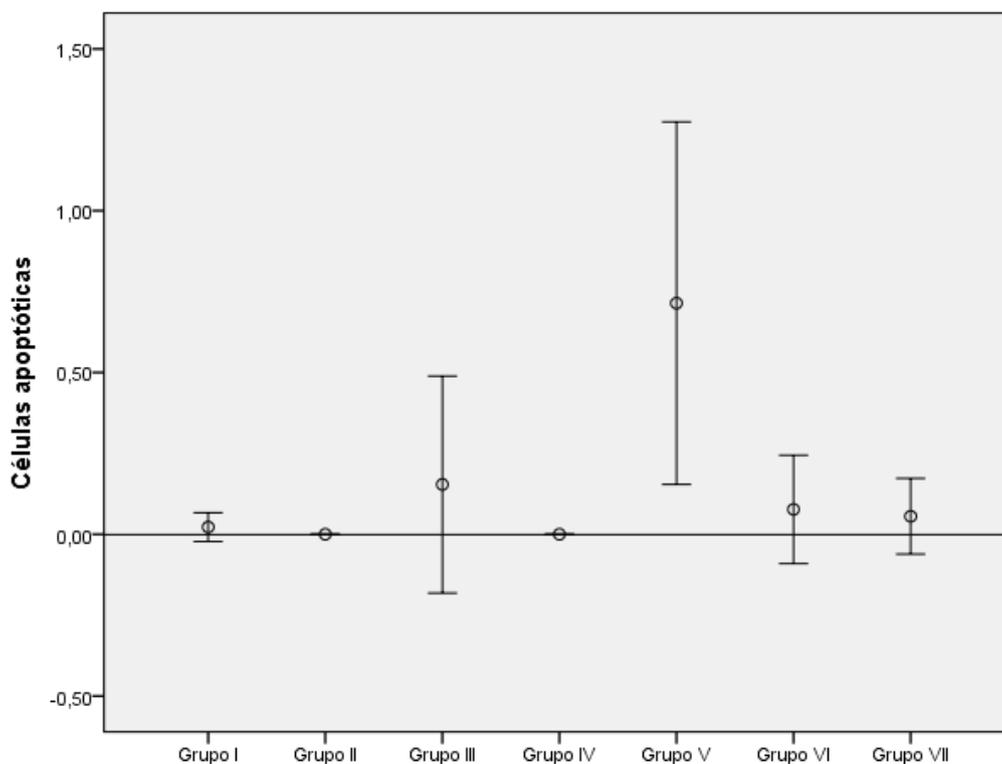
**Gráfico 7** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Tamanho da área interfolicular”



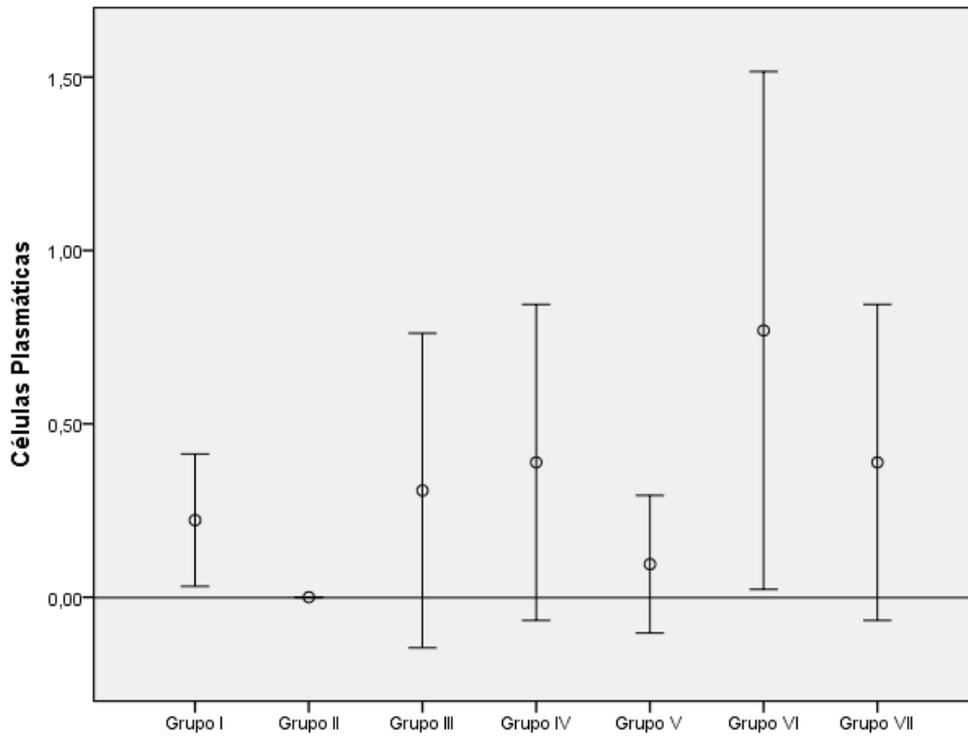
**Gráfico 8** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Número de linfócitos da área interfolicular”



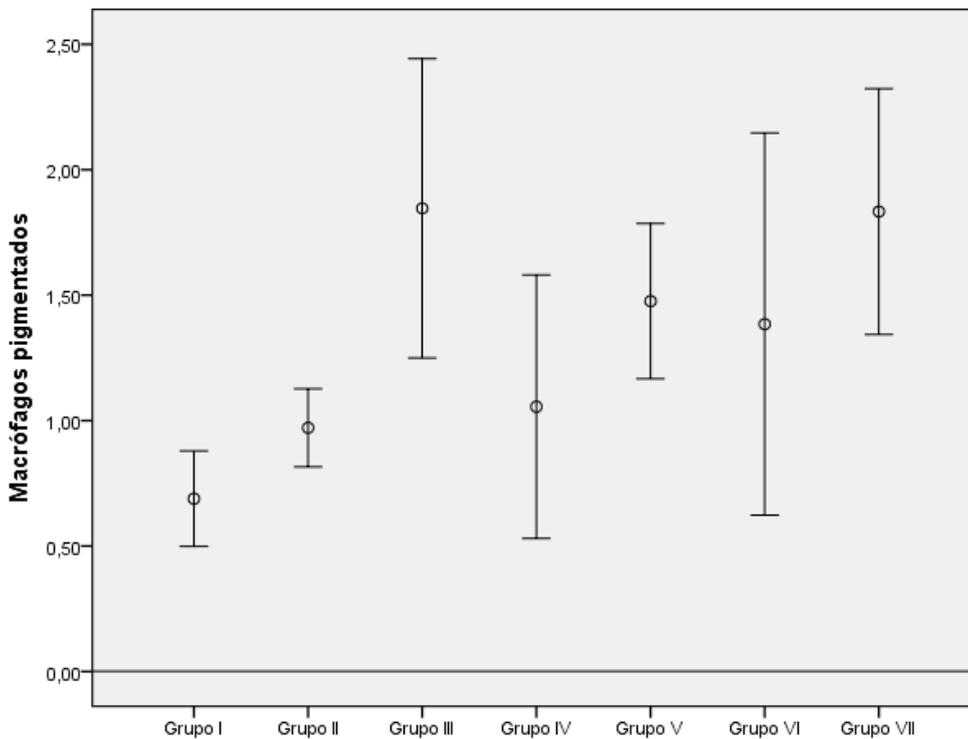
**Gráfico 9** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Número de células apoptóticas”



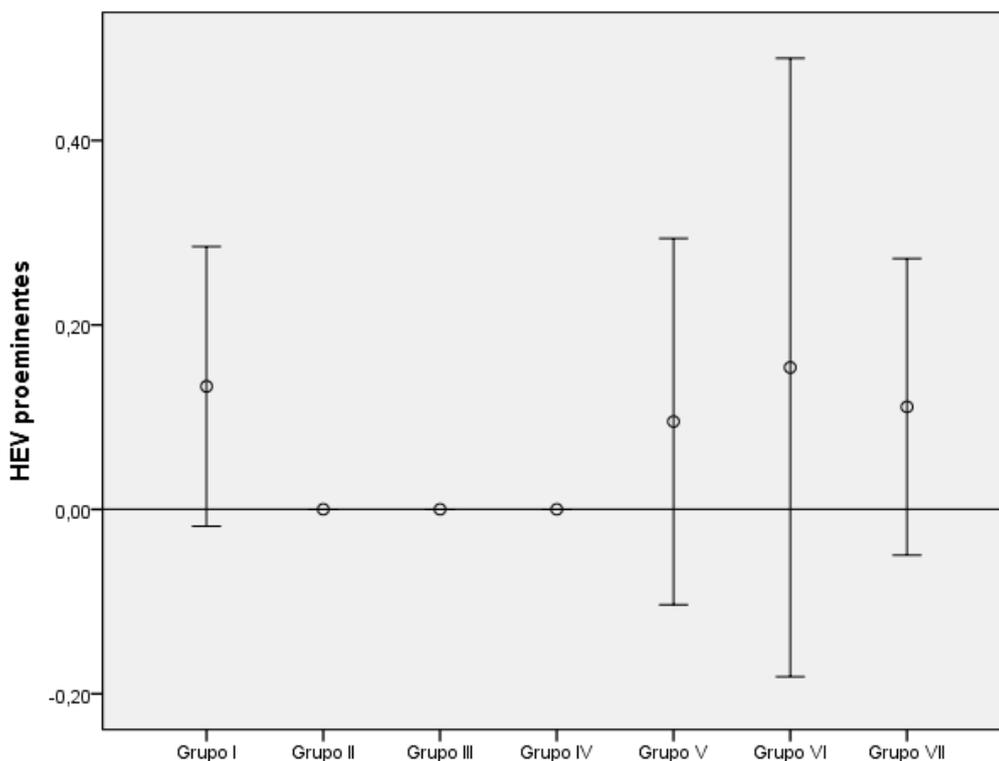
**Gráfico 10** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Número de células plasmáticas”



**Gráfico 11** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Macrófagos pigmentados”



**Gráfico 12** – Valores médios e intervalos de confiança para um nível de confiança de 95% para a variável “Número de HEV proeminentes”



Os gráficos anteriores (do gráfico 2 ao gráfico12) representam a média e o seu intervalo de confiança, com um nível de confiança de 95%, para cada variável. A falta de um intervalo no gráfico ocorre para variáveis cujos valores verificados foram sempre de zero, como indicado nas tabelas II a VIII, representando observação “normal” desse parâmetro. As maiores diferenças encontram-se entre os grupos II e V. Os restantes intervalos são maioritariamente sobreponíveis, não permitindo assim afirmar a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

## Discussão

Doll e Peto estimaram que 30% dos câncros no Homem podem estar relacionados com a dieta<sup>43</sup>, sendo que o consumo de determinados alimentos promove a sua ocorrência, enquanto que o consumo de outros terá efeitos protetores. Embora estes efeitos da nutrição no cancro sejam claros, a evidência é limitada quanto ao efeito específico de alimentos ou nutrientes, apresentando ainda resultados inconsistentes<sup>44, 45</sup>.

A resposta imunitária aos mecanismos do cancro pretende a caracterização imunogénica dos antígenos específicos expressos pelo tumor, processo que ocorre principalmente por uma resposta dos linfócitos B para produzir níveis de anticorpos específicos eficazes contra o crescimento tumoral. No entanto, a expressão antigénica é frequentemente demasiado baixa para induzir uma resposta apropriada<sup>46</sup>. Sabe-se que um dos fatores que permite influenciar esta resposta é alteração da dieta, ainda que não muitos estudos se tenham debruçado sobre os efeitos dos nutrientes essenciais na imunovigilância do desenvolvimento tumoral durante a carcinogénese<sup>47</sup>.

Neste trabalho, foi o grupo V (restrição calórica) que apresentou consistentemente parâmetros de resposta imunológica mais elevados (Figura 5), parecendo ir ao encontro dos diversos estudos que comprovam a associação entre a restrição calórica e a diminuição do risco oncológico. Vários estudos em animais com restrição da dieta encontram muito menos incidência de cancro quando comparada com animais alimentados *ad libitum*, considerando assim o excesso de calorias um importante fator de risco<sup>48,49,50</sup>.

De forma contrária, o grupo II, indicou um certo grau de imunossupressão, com diminuição aparente dos parâmetros da área interfolicular (Figura 2), com destaque para a redução do número de linfócitos. Isto era esperado e justificável pela exposição ao DMBA, de acordo com a sua capacidade de inibição do sistema imunitário por necrose celular<sup>1</sup>.

Relativamente ao grupo III, sujeito à dieta suplementada com feijão, este mostrou alterações positivas, com valores consistentemente superiores aos ligeiros aumentos obtidos no grupo de controlo, ao nível dos folículos (Figura 3), células plasmáticas e macrófagos pigmentados. Estes últimos estão envolvidos na fagocitose de células

apoptóticas, apresentação antigénica e regulação dos centros germinativos<sup>51</sup>. Este resultado deve-se possivelmente à riqueza deste alimento em fibra alimentar, sendo assim consistente com o observado no grupo V.

No grupo IV, suplementado com azeite, observou-se uma diminuição dos parâmetros avaliados, em concordância com os resultados do grupo II, mas de forma mais acentuada, nomeadamente quanto ao tamanho da área interfolicular (Figura 4). Parece assim indicar um efeito imunossupressor mais importante comparativamente com o efeito do DMBA apenas. Vários estudos em animais demonstram este efeito de supressão (bem como benefício em desordens de natureza inflamatória) sem, no entanto, comprometer a resposta imunitária ou exacerbar a suscetibilidade a agentes patogénicos. Contrastando com estes achados, o efeito supressor da função imunitária parece não se verificar em humanos saudáveis<sup>52,53</sup>.

O grupo VI, com alimentação suplementada com fibra, feijão e azeite, apresentou maioritariamente valores normais, apenas com um aumento do número de células plasmáticas e macrófagos pigmentados. Este resultado parece ser consistente com os efeitos observados nos grupos sujeitos a dieta suplementada com estes alimentos individualmente. É então de supor que os efeitos positivos observados para o feijão e fibra sejam “anulados” pela aparente imunossupressão derivada do carcinogénico e do azeite.

Por último, o grupo VII, sujeito a uma dieta do tipo mediterrâneo, indicou um aumento ligeiro dos parâmetros observados, mais relevante na área interfolicular e no aumento do número de macrófagos pigmentados. Este aumento é superior de forma consistente aos valores encontrados para o grupo VI. Tendo em conta o efeito aparente do azeite, também presente nesta dieta, é fácil supor que os restantes componentes adicionados (batata, sardinha, tomate, pimento e cebola) têm, no seu conjunto, uma ação de imunomodulação positiva no BALT. Atualmente acredita-se que os suplementos isolados não obtêm os mesmos benefícios para a saúde do que uma dieta completa, por o suplemento isolado poder não se comportar da mesma maneira relativamente ao que é a sua ação num conjunto mais alargado de alimentos<sup>54</sup>. A dieta mediterrânica, caracterizada por grande consumo de alimentos de origem vegetal, peixe, azeite, e poucas proteínas de origem vegetal, tem sido muito estudada devido à baixa incidência de cancro no geral em países mediterrânicos. Estima-se que adoção desta dieta nos países ocidentais possa reduzir em 25% a incidência do cancro do cólon

e do reto, 10% da incidência de cânceros na próstata, pâncreas e endométrio e 15% da incidência do cancro da mama<sup>55</sup>.

Nos anos 60 foi comprovada a presença de moléculas de imunoglobulina na saliva<sup>56</sup>. Sabe-se agora que as duas principais classes de anticorpos presentes são a IgG, vinda da circulação sanguínea e que entra na cavidade oral no líquido crevicular, pelo epitélio do sulco gengival; e a IgA secretada (SIgA), produzida pelas glândulas salivares<sup>57</sup>. Este tipo de IgA, é um produto da imunidade adaptativa e sofre assim maiores variações em quantidade, quando comparada com outras proteínas salivares<sup>58</sup>.

Os tecidos de BALT são locais chamados indutores onde existe apresentação antigénica e ativação de linfócitos B que migram através do sangue periférico para os locais efetores<sup>20,59</sup>. Nestes, presentes em todas as mucosas, dá-se depois a secreção de IgA, com importantes funções na prevenção da entrada de substâncias potencialmente patogénicas no organismo<sup>1</sup>.

Não é claro que estruturas de MALT são as mais importantes para a indução da resposta imunitária a microrganismos orais e antigénios aéreos, expressa por subsequente produção de IgA salivar, mas está comprovado, tanto em estudos com animais como humanos, que os linfócitos B, após ativados, migram do *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (GALT) para as glândulas salivares. Mais recentemente, demonstrou-se também a importância do *Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue* (NALT), em que se incluem as adenóides e amígdalas nos humanos, enquanto local indutor de linfócitos que migram para as glândulas salivares. Embora se assumam que os linfócitos B de cada tipo de MALT sigam vias preferenciais para os locais de secreção, esta imunidade mucosa é comum a todo o organismo, sendo seguro presumir que o BALT desempenhe igualmente um importante papel na indução da resposta imunitária ao nível da cavidade oral<sup>57</sup>.

A relação dos níveis de IgA na saliva com a saúde oral e sistémica tem sido alvo de investigação, embora com resultados pouco conclusivos<sup>60-62</sup>. Ainda assim, e de forma mais relevante para a área da Medicina Dentária, alguns estudos em cárie dentária parecem sugerir uma relação inversa entre a atividade da IgA salivar e a suscetibilidade à cárie<sup>57</sup>. Em 2011, Parisotto *et al*, encontraram um risco maior de cárie associado a menores níveis de IgA salivar em crianças entre os 3 e os 4 anos de idade<sup>63</sup>.

Relativamente à periodontite, vários estudos mostraram uma relação positiva com a concentração dos níveis de IgA na saliva<sup>64</sup>. Estes resultados podem no entanto ser devidos a uma maior estimulação à produção de IgA pela acumulação de placa bacteriana e aumento do número de bactérias deglutidas, o que vai ativar os linfócitos B no MALT<sup>57</sup>. Um outro estudo não demonstrou efeitos da doença periodontal nos níveis de IgA mas concluiu que o fumo do tabaco pode provocar uma diminuição destes níveis na saliva<sup>65</sup>.

Uma das principais dificuldades do método utilizado neste trabalho prende-se com a natureza dinâmica do sistema imunitário, existindo um potencial para se verificar um grande alcance do que pode ser considerado “normal”. Isto é mais relevante ainda nos tecidos expostos a antigénios da dieta. Só a cuidadosa comparação desta variação dentro do normal em grupos controlo permite evitar falsos positivos nestes tecidos avaliados pela EH<sup>32</sup>. Esta metodologia foi seguida por ser razoavelmente eficaz na identificação inicial de tecidos alterados por potenciais efeitos imunomoduladores<sup>32,37,38</sup>, exatamente o que se pretendia verificar. Parecendo os resultados obtidos confirmar esse efeito, recomenda-se futuramente a aplicação de técnicas mais especializadas, como a imuno-histoquímica e morfometria<sup>31</sup>, seguidas de análise estatística sólida para comprovar e concluir acerca destes efeitos.

## **Conclusões**

Dentro das limitações deste trabalho, os dados obtidos parecem indicar um efeito imunomodulador da dieta no BALT. Os resultados apontam para uma maior influência estimulatória da fibra alimentar em relação aos outros alimentos estudados, e um efeito inibidor com o azeite.

Os resultados obtidos, em conjunto com a evidência disponível, permitem deduzir um possível efeito positivo na saúde oral após estimulação do MALT e em particular do BALT, com repercussões ao nível da secreção de IgA na saliva.

A análise estatística demonstra que a alimentação pode estimular o BALT neste modelo experimental. No entanto, o aumento consequente de IgA salivar não fez parte dos métodos e no trabalho de futuro é pertinente quantificar a sua secreção num modelo de avaliação dietética.

## **Agradecimentos**

- Ao Sr. Professor Doutor António Silvério Cabrita pelo conhecimento transmitido ao longo destes 5 anos, bem como o apoio e insistência durante a realização deste estudo;

- À Mestre Dr<sup>a</sup>. Ana Calado, pelo esforço incansável, disponibilidade permanente e apoio constante até ao último minuto;

- À Professora Doutora Paula Pereira, pelo material gentilmente cedido, sem o qual este trabalho não teria sido possível;

- À Dr<sup>a</sup>. Juliana Pego, pela colaboração essencial na obtenção das fotos das preparações histopatológicas observadas;

- Ao Mário Martins, colega de sempre, pelo conhecimento e cooperação crucial e indispensável;

- À Catarina Vaz, pela eterna paciência e amizade infalível em todos os momentos deste percurso;

- Ao serviço de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e seus colaboradores, por fornecer os meios para a realização do protocolo deste trabalho.

## Bibliografia

1. Wanda M. Haschek, C.G.R., Matthew A. Wallig, *Chapter 6 Respiratory system*, in *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, 2010, Elsevier Inc.
2. Haschek, W.M., Witschi, H.P., and Nikula, K. (2002). Respiratory system. In *Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., and Wallig, M.A. eds), 2nd edn, pp. 3–83. Academic Press, San Diego, CA
3. Renne, R.A., Gideon, K.M., Harbo, S.J., Staska, L.M., and Grumbein, S.L. (2007). Upper respiratory tract lesions in inhalation toxicology. *Toxicol. Pathol.*, 35, 163–169
4. Haley, P. J. (2003). Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, 188(1), 49–71.
5. Bienenstock, J., Johnston, N., Perey, D.Y.E., 1973a. Bronchial and lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab. Invest.* 28, 686-692.
6. Bienenstock, J., Johnston, N., Perey, D.Y.E., 1973b. Bronchial lymphoid tissue. II. Functional characteristics. *Lab. Invest.* 28, 693-698.
7. Halle, S., Dujardin, H. C., Bakocevic, N., Fleige, H., Danzer, H., Willenzon, S., Suezer, Y., et al. (2009). Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 206(12), 2593–601.
8. Foo, S. Y., & Phipps, S. (2010). Regulation of inducible BALT formation and contribution to immunity and pathology, 3(6). doi:10.1038/mi.2010.52
9. Pankow, W. & von Wichert, P. M cell in the immune system of the lung. *Respiration* 54, 209 – 219 ( 1988 )
10. Corr, S. C., Gahan, C. C. & Hill, C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 2 – 12 ( 2008 ).
11. Suzuki, K., Grigorova, I., Phan, T. G., Kelly, L. M. & Cyster, J. G. Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* 206, 1485 – 1493 ( 2009 ).
12. van der Brugge-Gamelkoorn, G. J., van de Ende, M. B. & Sminia, T. Non-lymphoid cells of bronchus-associated lymphoid tissue of the rat in situ and in suspension. With special reference to interdigitating and follicular dendritic cells. *Cell Tissue Res.* 239, 177 – 182 ( 1985 ).
13. Kosco-Vilbois, M. H., Gray, D., Scheidegger, D. & Julius, M. Follicular dendritic cells help resting B cells to become effective antigen- presenting cells:

- induction of B7/BB1 and upregulation of major histocompatibility complex class II molecules . J. Exp. Med. 178 , 2055 – 2066 ( 1993 ).
14. Bienenstock J: Gut and bronchus associated lymphoid tissue: an overview. *Adv Exp Med Biol.* 1982;149:471–477.
  15. Harris M: Pulmonary lymphoproliferative disorders and related conditions. In: Hasleton PS, ed. *Spencer's Pathology of the Lung*, 5th ed. New York: McGraw-Hill Health Professions Divisions; 1996:1111–1129.
  16. Hasleton P, Curry, A: Anatomy of the lung. In: Hasleton PS, ed. *Spencer's Pathology of the Lung*, 5th ed. New York: McGraw-Hill Health Professions Divisions; 1996:1–44.
  17. Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman JP, Sibille Y: Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J* 2001, 18:571–588.
  18. Colby T: Lymphoproliferative disease In: Dail and Hammers' *Pulmonary Pathology*, 3rd ed. New York: Springer-Verlag; 2004.
  19. Laga AC, Allen TC, Cagle PT: Bronchus In: Cagle PT, ed. *Color Atlas and Text of Pulmonary Pathology*, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008
  20. Cesta, M. F. (2006). Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicologic pathology*, 34(5), 599–608.
  21. Elmore, S. a. (2006). Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicologic pathology*, 34(5), 687–96
  22. Bánfi, A., Tizslavicz, L., Székely, E., Peták, F., Tóth-Szüki, V., Baráti, L., Bari, F., et al. (2009). Development of bronchus-associated lymphoid tissue hyperplasia following lipopolysaccharide-induced lung inflammation in rats. *Experimental lung research*, 35(3), 186–97.
  23. Pabst R, Gehrke I. Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals including man? *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:131–5.
  24. Mestas, J., & Hughes, C. C. W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(5), 2731–8.
  25. Hiller, a S., Tschernig, T., Kleemann, W. J., & Pabst, R. (1998). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and larynx-associated lymphoid tissue (LALT) are found at different frequencies in children, adolescents and adults. *Scandinavian journal of immunology*, 47(2), 159–62.

26. Sato A, Chida K, Iwata M, Hayakawa H. Study of bronchus-associated lymphoid tissue in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:473–8.
27. Meuwissen HJ, Hussain M. Bronchus-associated lymphoid tissue in human lung: correlation of hyperplasia with chronic pulmonary disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1982;23:548–61.
28. Richmond I, Pritchard GE, Ashcroft T, Avery A, Corris PA, Walters EH. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers. *Thorax* 1993;48:1130–4.
29. Tschernig T, Kleemann WJ, Pabst R. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the lungs of children who had died from sudden infant death syndrome and other causes. *Thorax* 1995;50: 658–60.
30. Pabst R. Is BALT a major component of the human lung immune system? *Immunol Today* 1992;3:119–22
31. Haley, P., Perry, R., Ennulat, D., Frame, S., Johnson, C., Lapointe, J. M., Nyska, A., Snyder, P., Walker, D., and Walter, G. (2005). STP position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. *Toxicol Pathol* 33, 404–7; discussion 408.
32. Elmore, S. a. (2012). Enhanced histopathology of the immune system: a review and update. *Toxicologic pathology*, 40(2), 148–56.
33. Maronpot, R. R. (2006). A monograph on histomorphologic evaluation of lymphoid organs. *Toxicologic pathology*, 34(5), 407–8.
34. Odio, M., Brodish, A., and Ricardo, M. J., Jr. (1987). Effects on immune responses by chronic stress are modulated by aging. *Brain Behav Immun* 1, 204–15.
35. Levin, S., Semler, D., and Ruben, Z. (1993). Effects of two weeks of feed restriction on some common toxicologic parameters in Sprague–Dawley rats. *Toxicol Pathol* 21,1.
36. Gopinath, C. (1996). Pathology of toxic effects on the immune system. *Inflamm Res* 45, Suppl 2, S74–S8.
37. Germolec, D. R., Kashon, M., Nyska, A., Kuper, C. F., Portier, C., Kommineni, C., Johnson, K. A., and Luster, M. I. (2004). The accuracy of extended histopathology to detect immunotoxic chemicals. *Toxicol Sci* 82, 504–14.
38. Germolec, D. R., Nyska, A., Kashon, M., Kuper, C. F., Portier, C., Kommineni, C., Johnson, K. A., and Luster, M. I. (2004). Extended histopathology in immunotoxicity testing: interlaboratory validation studies. *Toxicol Sci* 78 (1), 107–15.

39. Luster, M.I., Munson, A. E., Thomas, P.T., Holsapple, M.P., Fenters, J.D., White, K. L., Jr., Lauer, L. D., Germolec, D. R., Rosenthal, G. J., and Dean, J.H. (1988). Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam Appl Toxicol* 10, 2–19.
40. Flint, M., McCarty, K., Jenkins, F., Conrads, T., Sun, M., & Baum, A. (2011). Psychological stress accelerates the onset of tumour formation and alters the type and location of tumours in a DMBA mouse carcinogenesis model. *Stress and Health*, 27(3), e129–e138.
41. Tedardi, M. V., Oliveira, K. D., Avanzo, G. U., Rangel, M. M. M., Avanzo, J. L., Fukumasu, H., Rao, K. V. K., et al. (2013). Chemical carcinogenesis by 7, 12-dimethylbenzanthracene in balb / c mice, 7(Suppl 2). doi:10.1186/1753-6561-7-S2-P46
42. Pereira, P, Alimentos *versus* nutrients característicos da alimentação do tipo mediterrânico e sua influência no cancro da mama, Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2007, p.57-67.
43. Doll, R., and Peto, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66: 1191–1308, 1981.
44. Uauy, R., & Solomons, N. (2005). International Conference on Diet , Nutrition , and Cancer Diet , Nutrition , and the Life-Course Approach to Cancer Prevention 1 , 2, 2934–2945.
45. Gonzalez, C. a. (2007). Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence. *British Journal of Nutrition*, 96(S1), S42–S45.
46. Arlen, M., & Arlen, P. (2013). Optimizing the immune system to achieve control of the metastatic malignant lesion. *Journal of Cancer*, 4(5), 427–32.
47. Poirier, A, Stages in carcinogenesis: alteration by diet, *Am J Clin Nutr*, 1987;45:185-91.
48. Divisi, D., Di Tommaso, S., Salvemini, S., Garramone, M., & Crisci, R. (2006). Diet and cancer. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, 77(2), 118–23.
49. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007
50. Sugimura, T. (2000). Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, 21(3), 387–95

51. Smith, JP, Burton, GF, Tew, JG, Szakal, AK. (1998). Tingible Body Macrophages in Regulation of Germinal, *Developmental Immunology*, 1998, Vol. 6, pp. 285-294.
52. Puertollano MA, Puertollano E, Alvarez de Cienfuegos G, de Pablo Martínez MA, Olive oil, immune system and infection, *Nutr Hosp*. 2010 Jan-Feb;25(1):1-8
53. Ozyilkkan, O., Colak, D., Akcali, Z., & Basturk, B. (2005). Olive: fruit of peace against cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 6(1), 77–82
54. Martinez-Gonzalez, M. a, & Estruch, R. (2004). Mediterranean diet, antioxidants and cancer: the need for randomized trials. *European Journal of Cancer Prevention*, 13(4), 327–335.
55. Trichopoulou, a, Lagiou, P., Kuper, H., & Trichopoulos, D. (2000). Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 9(9), 869–73.
56. Ellison SA, Mashimo PA, Mandel ID. Immunochemical studies of human saliva. I. The demonstration of serum proteins in whole and parotid saliva. *J Dent Res* 1960; 39: 892-8.
57. Brandtzaeg, P. (2013). Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *Journal of oral microbiology*, 5, 1–24.
58. Rudney JD, Kajander KC, Smith QT. Correlations between human salivary levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase and secretory immunoglobulin A with different stimulatory states and over time. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 765-71.
59. Brandtzaeg P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. *Immunol Invest* 2010; 39: 303-55.
60. Brandtzaeg P. The oral secretory immune system with special emphasis on its relation to dental caries. *Proc Finn Dent Soc* 1983; 79: 71-84.
61. Russell MW, Mestecky J. Potential for immunological intervention against dental caries. *J Biol Buccale* 1986; 14: 159-75.
62. Brandtzaeg P. Immunology of inflammatory periodontal lesions. *Int Dent J* 1973; 23: 438-54.
63. Parisotto TM, King WF, Duque C, Mattos-Graner RO, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M, et al. Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. *Caries Res* 2011; 45: 377-85.
64. Taubman MA, Smith DJ. Significance of salivary antibody in dental disease. *Ann NY Acad Sci* 1993; 694: 202-15.

65. Olayanju OA, Rahamon SK, Joseph IO, Arinola OG. Salivary immunoglobulin classes in Nigerian smokers with periodontitis. *World J Biol Chem* 2012; 3: 180-3.

## Anexo I – Quadros de estatística descritiva por variável

### Número de folículos

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
DMBA_num_fol	35	,00	,00	,0000	,00000	,000
Feijao_num_fol	13	,00	,00	,0000	,00000	,000
Azeite_num_fol	18	,00	,00	,0000	,00000	,000
Fibra_num_fol	21	,00	3,00	,5238	,98077	,962
FibraAzeiteFeijao_num_fol	13	,00	,00	,0000	,00000	,000
DietaMedi_num_fol	18	,00	1,00	,1111	,32338	,105
Control_num_fol	45	,00	2,00	,0444	,29814	,089
Valid N (listwise)	13					

### Tamanho dos folículos

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
Control_size_fol	45	,00	3,00	,0667	,44721	,200
DMBA_size_fol	35	,00	1,00	,0286	,16903	,029
Feijao_size_fol	13	,00	2,00	,1538	,55470	,308
Azeite_size_fol	18	,00	,00	,0000	,00000	,000
Fibra_size_fol	21	,00	3,00	,6190	1,16087	1,348
FibraAzeiteFeijao_size_fol	13	,00	,00	,0000	,00000	,000
DietaMedi_size_fol	18	,00	1,00	,1111	,32338	,105
Valid N (listwise)	13					

### Número de linfócitos nos folículos

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
Control_NL	45	,00	2,00	,0444	,29814	,089
DMBA_NL	35	,00	,00	,0000	,00000	,000
Feijao_NL	13	,00	2,00	,1538	,55470	,308
Azeite_NL	18	,00	,00	,0000	,00000	,000
Fibra_NL	21	,00	3,00	,5714	1,07571	1,157
FibraAzeiteFeijao_NL	13	,00	,00	,0000	,00000	,000
DietaMedi_NL	18	,00	,00	,0000	,00000	,000
Valid N (listwise)	13					

**Número de centros germinativos**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
Control_GC_N	45	-1,00	,00	-,0222	,14907	,022
DMBA_GC_N	35	,00	,00	,0000	,00000	,000
Feijao_GC_N	13	,00	3,00	,2308	,83205	,692
Azeite_GC_N	18	,00	,00	,0000	,00000	,000
Fibra_GC_N	21	,00	3,00	,5238	,98077	,962
FibraAzeiteFeijao_GC_N	13	,00	,00	,0000	,00000	,000
DietaMedi_GC_N	18	,00	1,00	,0556	,23570	,056
Valid N (listwise)	13					

**Tamanho dos centros germinativos**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
Control_GC_S	45	,00	,00	,0000	,00000	,000
DMBA_GC_S	35	,00	,00	,0000	,00000	,000
Feijao_GC_S	13	,00	3,00	,3846	,96077	,923
Azeite_GC_S	18	,00	,00	,0000	,00000	,000
Fibra_GC_S	21	,00	3,00	,6190	1,02353	1,048
FibraAzeiteFeijao_GC_S	13	,00	,00	,0000	,00000	,000
DietaMedi_GC_S	18	,00	1,00	,0556	,23570	,056
Valid N (listwise)	13					

**Tamanho da área interfolicular**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
Control_Interfol_size	45	,00	3,00	,2889	,69486	,483
DMBA_Interfol_size	35	-3,00	1,00	-,4000	1,09006	1,188
Feijao_Interfol_size	13	-2,00	3,00	,0000	1,29099	1,667
Azeite_Interfol_size	18	-3,00	3,00	-1,5556	1,50381	2,261
Fibra_Interfol_size	21	,00	4,00	,8095	1,24976	1,562
FibraAzeiteFeijao_Interfol_size	13	,00	1,00	,0769	,27735	,077
DietaMedi_Interfol_size	17	,00	3,00	,6471	,99632	,993
Valid N (listwise)	13					

**Número de linfócitos na área interfolicular**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
Control_Interfol_NL	45	-1,00	3,00	,3778	,93636	,877
DMBA_Interfol_NL	35	-3,00	1,00	-1,1143	1,18251	1,398
Feijao_Interfol_NL	13	-2,00	4,00	,0000	1,58114	2,500
Azeite_Interfol_NL	18	-3,00	3,00	-1,7778	1,51679	2,301
Fibra_Interfol_NL	21	,00	4,00	,8571	1,23635	1,529
FibraAzeiteFeijao_Interfol_NL	13	,00	1,00	,0769	,27735	,077
DietaMedi_Interfol_NL	18	-2,00	3,00	,6111	1,19503	1,428
Valid N (listwise)	13					

**Células apoptóticas**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Control_Apo_C	45	,00	1,00	,0222	,14907
DMBA_Apo_C	35	,00	,00	,0000	,00000
Feijao_Apo_C	13	,00	2,00	,1538	,55470
Azeite_Apo_C	18	,00	,00	,0000	,00000
Fibra_Apo_C	21	,00	3,00	,7143	1,23056
FibraFeijaoAzeite_Apo_C	13	,00	1,00	,0769	,27735
DietaMedi_Apo_C	18	,00	1,00	,0556	,23570
Valid N (listwise)	13				

**Células plasmáticas**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Control_Plasma_C	45	,00	3,00	,2222	,63564
DMBA_Plasma_C	35	,00	,00	,0000	,00000
Feijao_Plasma_C	13	,00	2,00	,3077	,75107
Azeite_Plasma_C	18	,00	3,00	,3889	,91644
Fibra_Plasma_C	21	,00	2,00	,0952	,43644
FibraFeijaoAzeite_Plasma_C	13	,00	3,00	,7692	1,23517
DietaMedi_Plasma_C	18	,00	3,00	,3889	,91644
Valid N (listwise)	13				

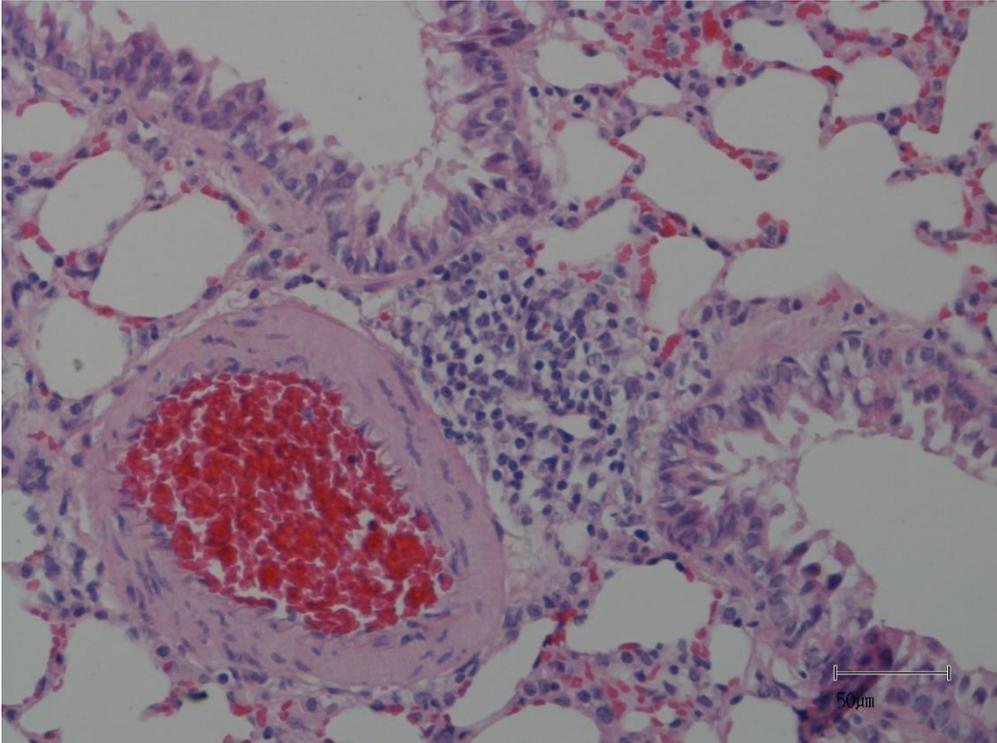
**Macrófagos pigmentados**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
Control_Pigm_Macro	45	,00	2,00	,6889	,63325	,401
DMBA_Pigm_Macro	35	,00	2,00	,9714	,45282	,205
Feijao_Pigm_Macro	13	,00	3,00	1,8462	,98710	,974
Azeite_Pigm_Macro	18	,00	3,00	1,0556	1,05564	1,114
Fibra_Pigm_Macro	21	,00	2,00	1,4762	,67964	,462
FibraFeijaoAzeite_Pigm_Macro	13	,00	3,00	1,3846	1,26085	1,590
DietaMedi_Pigm_Macro	18	,00	3,00	1,8333	,98518	,971
Valid N (listwise)	13					

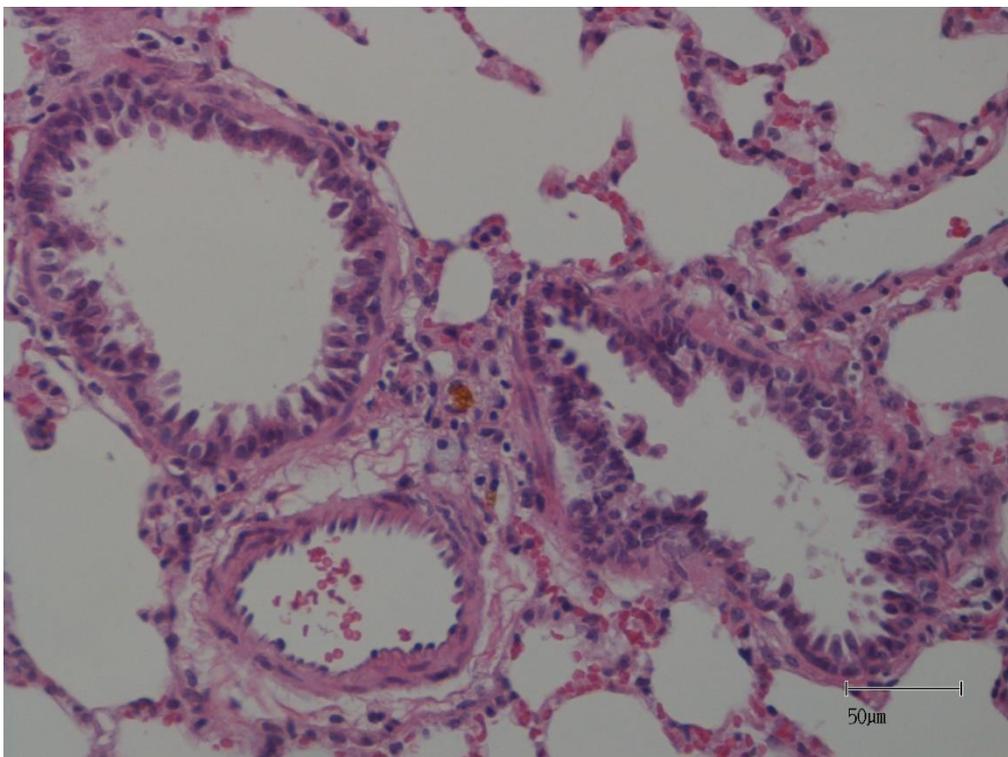
**HEV proeminentes**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Control_Proem_HEV	45	,00	2,00	,1333	,50452
DMBA_Proem_HEV	35	,00	,00	,0000	,00000
Feijao_Proem_HEV	13	,00	,00	,0000	,00000
Azeite_Proem_HEV	18	,00	,00	,0000	,00000
Fibra_Proem_HEV	21	,00	2,00	,0952	,43644
FibraFeijaoAzeite_Proem_HEV	13	,00	2,00	,1538	,55470
DietaMedi_Proem_HEV	18	,00	1,00	,1111	,32338
Valid N (listwise)	13				

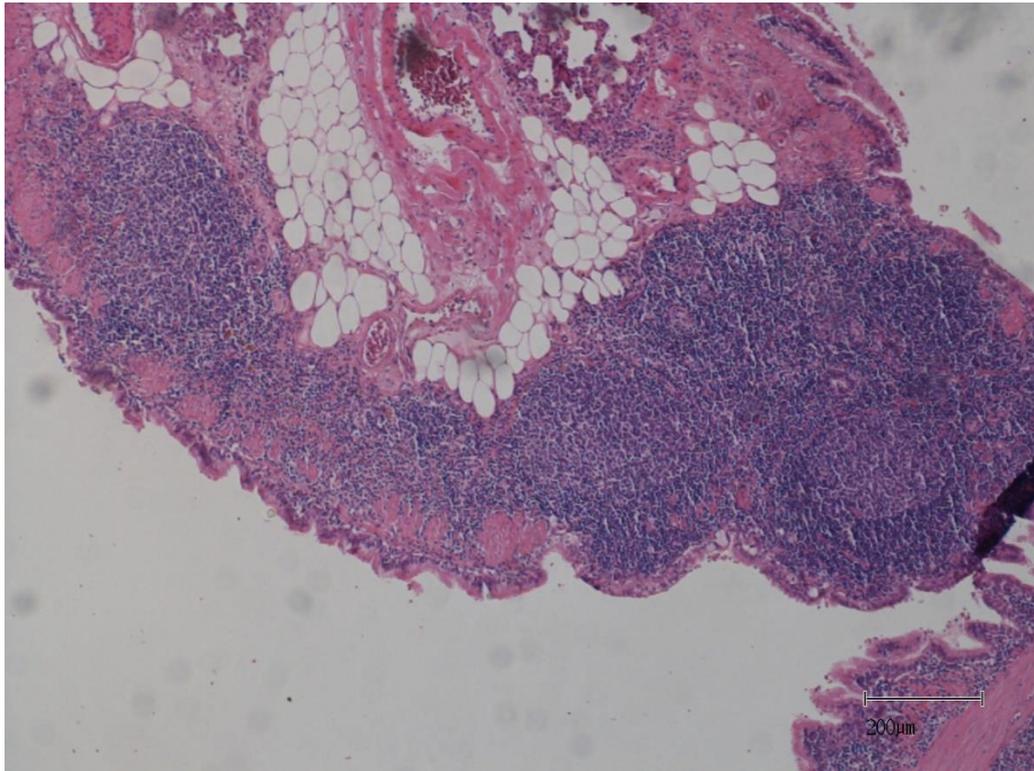
**Anexos II** – Registo fotográfico de algumas das preparações histológicas observados ao microscópio ótico com alterações exemplificativas mais relevantes.



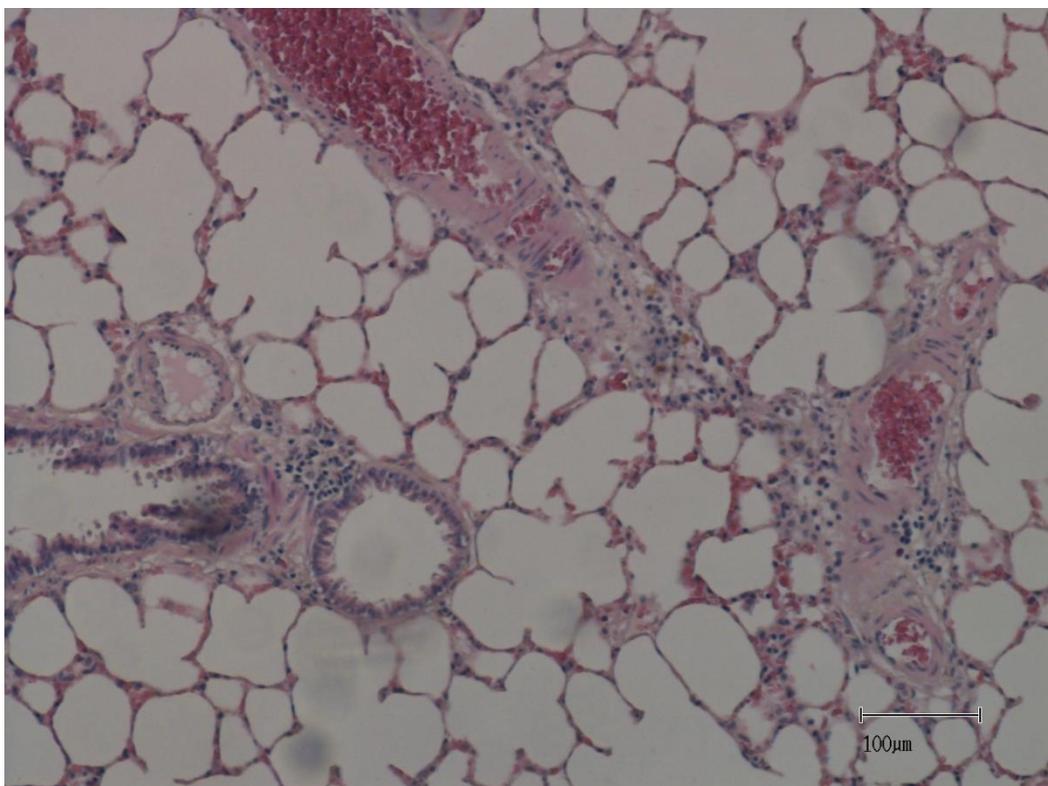
**Figura 1** - Preparação histológica 221 A1 (Grupo I) – BALT normal. Notar a sua localização habitual entre uma artéria e um bronquíolo.



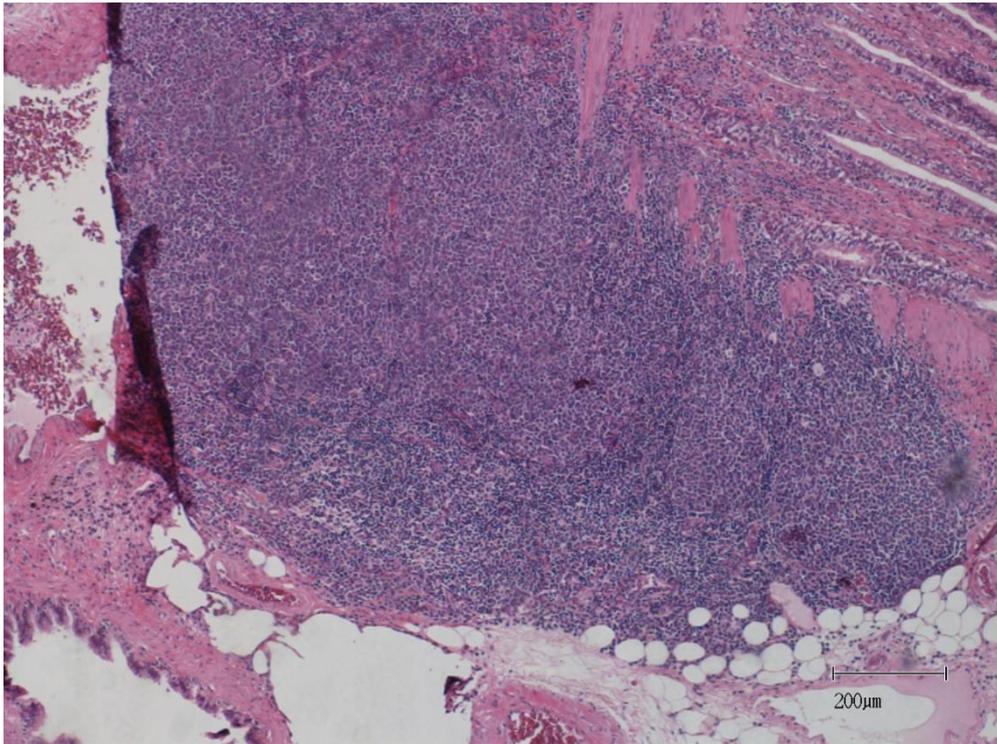
**Figura 2** - Preparação histológica 252 B1 (Grupo II) – diminuição moderada do número de linfócitos na área interfoliocular e presença de um macrófago pigmentado.



**Figura 3** - Preparação histológica 359 A1 (Grupo III) – aumento ligeiro do tamanho folicular e do número de linfócitos. Presença marcada dos centros germinativos.



**Figura 4** - Preparação histológica 300 A1 (Grupo IV) – diminuição moderada do número de linfócitos e do tamanho da área interfollicular.



**Figura 5** - Preparação histológica 327 A1 (Grupo V) – aumento marcado do tamanho e número de linfócitos foliculares e do número e tamanho dos centros germinativos presentes

