

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-TUMORAL DE ABRINA EM TUMOR
MAMÁRIO MURINO E SUA INFLUÊNCIA NO SISTEMA IMUNE

DJAMILE CORDEIRO DE MATOS

**ARARAQUARA – SP
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-TUMORAL DE ABRINA EM TUMOR
MAMÁRIO MURINO E SUA INFLUÊNCIA NO SISTEMA IMUNE

DJAMILE CORDEIRO DE MATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

**ARARAQUARA – SP
2012**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M425e Matos, Djamile Cordeiro de
Estudo da atividade anti-tumoral de Abrina em tumor mamário murino e sua influência no sistema imune / Djamile Cordeiro de Matos. – Araraquara, 2012
124 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

1. Câncer de mama. 2. Abrina. 3. Citocinas. 4. Células imunes.
5. Apoptose. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara com auxílio de bolsa e auxílio à pesquisa FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Aos meus pais,
Vania e Everardo,
e meu namorado,
Fábio com meu eterno
agradecimento,
carinho e amor.

" Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados,
capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer é algo que só depende de nossa
vontade e perseverança."

Albert Einstein

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Imunologia Clínica, pela oportunidade oferecida.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro na forma de auxílio regular à pesquisa e bolsa de doutorado, que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, pelo constante entusiasmo, pela orientação recebida, como também pela amizade demonstrada durante o desenvolvimento desse trabalho, sempre me dando apoio quando eu desanimava com alguma tarefa.

À Profa. Dra. Ana Paula Ulian pelo apoio dado cedendo as instalações do laboratório para que eu pudesse isolar a abrina, por fornecer a pulchelina para a minha pesquisa e pelas importantes sugestões fornecidas.

À Profa. Dra. Ana Cristina Moreira pela ajuda no isolamento das proteínas, que sem essa ajuda eu não teria conseguido isolá-las sozinha e, provavelmente, eu não teria sido capaz de realizar satisfatoriamente este trabalho.

À Livia, Marisa e Lucas sem cuja ajuda eu não teria conseguido realizar o presente trabalho. Obrigada por tudo, gente, do fundo do meu coração. Sem vocês me ajudando, não sei o que teria sido de mim.

À Aline meu agradecimento pela ajuda no isolamento de células dendríticas e no citômetro de fluxo.

Aos meus queridos pais, Vania e Everardo, por terem sempre estado ao meu lado apoiando-me em todas as minhas decisões e dando-me todo o carinho e amor. Minha eterna gratidão a vocês por serem pais tão especiais e queridos. Melhores pais eu não poderia pedir a Deus.

Ao Fábio Bonavides que sempre me forneceu seu ombro para chorar nos momentos de desespero, que sempre ouviu meus desabaços e me aconselhou a respeito de tudo. Obrigada, vc foi meu pilar nos últimos momentos do doutorado.

Aos meus amigos e colegas do laboratório por todo apoio e companheirismo no tempo que passamos juntos. Estando ao meu lado tanto nas brincadeiras como no trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
Capítulo 1	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 – Câncer de mama	20
2.2 – Sistema Imune no câncer	21
2.3 – <i>Abrus precatorius</i> L.	24
3. OBJETIVOS	31
3.1 – Geral	31
3.2 – Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 – Origem da amostra	32
4.2 – Etapa química	32
4.2.1 – Obtenção do extrato bruto de <i>A. precatorius</i>	32
4.2.2 – Purificação da abrina	32
4.3- Animais	33
4.4- Grupo de estudo	33
4.5- Testes biológicos <i>in vivo</i>	34
4.5.1- Inoculação das células tumorais	34
4.5.2- Inoculação intratumoral das substâncias	34
4.5.3- Obtenção dos tumores e avaliação do crescimento tumoral	35
4.5.4- Análise histológica dos tumores	35
4.5.5- Análise da angiogênese pelo sistema de gradação para angiogênese por microscopia (MAGS)	35
4.5.6. Determinação de células produtoras de citocinas em cortes histológicos do tumor	36

4.6- Testes biológicos <i>in vitro</i>	37
4.6.1- Obtenção das células do exsudato peritoneal	37
4.6.2- Cultura de macrófagos e obtenção do sobrenadante	38
4.6.3- Obtenção de linfócitos esplênicos	38
4.6.4- Cultura de células esplênicas e obtenção do sobrenadante	39
4.6.5- Obtenção e diferenciação de células dendríticas a partir da medula óssea e obtenção de sobrenadante de cultura	39
4.6.6- Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal	40
4.6.7- Avaliação da viabilidade celular de linfócitos esplênicos	41
4.6.8- Avaliação da viabilidade celular em células LM3	41
4.6.9- Caracterização fenotípica de células imunes por citometria de fluxo	42
4.6.10 – Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	43
4.6.11- Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	44
4.6.12- Determinação de citocinas	44
4.6.13- Detecção de apoptose e necrose pelas metodologias TUNEL e anexina V	46
4.7- Análise dos resultados	47
5. RESULTADOS	48
5.1- Isolamento das proteínas	48
5.2- Avaliação da taxa de inibição do crescimento tumoral	48
5.3- Análise da angiogênese pelo sistema de gradação para angiogênese por microscopia (MAGS)	50
5.4- Determinação de células produtoras de citocinas em cortes histológicos de tumor	53
5.5- Viabilidade celular de macrófagos em presença das substâncias em estudo	55
5.6- Viabilidade celular de linfócitos esplênicos em presença das substâncias em estudo	57
5.7- Viabilidade celular de células tumorais (LM3) em presença das substâncias em estudo	59

5.8- Caracterização fenotípica de macrófagos, subpopulações de linfócitos, células NK e células dendríticas	60
5.9- Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos estimulados com as substâncias em estudo	65
5.10- Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos e células dendríticas estimulados com as substâncias em estudo	67
5.11- Determinação de citocinas	69
5.12- Detecção de apoptose e necrose pelas metodologias tunel e Anexina V	87
6. DISCUSSÃO	91
7. CONCLUSÕES	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
Capítulo 2	115
Artigo "Immunological response in mice bearing LM3 breast cancer tumor undergoing Pulchellin treatment"	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso dos tumores após eutanásia dos animais e extração.	50
Tabela 2 – Valores de IC ₅₀ das substâncias para as células LM3 após 24 e 48h de cultura.	59
Tabela 3 – Percentual de expressão de receptores celulares em dendríticas diferenciadas expostas às substâncias em estudo por 24h.	60
Tabela 4 – Percentual de expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão em células peritoneais CD11b ⁺ obtidas dos diferentes grupos experimentais.	62
Tabela 5 – Percentual de expressão de moléculas co-estimulatórias em células esplênicas CD11c ⁺ obtidas dos diferentes grupos experimentais.	63
Tabela 6 – Percentual de expressão de receptores celulares em células esplênicas CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ e Treg obtidas dos diferentes grupos experimentais.	64
Tabela 7 – Percentual de expressão de receptores celulares em células esplênicas NK1.1 ⁺ , CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ obtidas dos diferentes grupos experimentais.	65
Tabela 8 – Produção de óxido nítrico em cultura de células dendríticas expostas às substâncias em estudo.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fotos das flores, frutos, sementes e da planta <i>Abrus precatorius L.</i>	25
Figura 2: Alinhamento esquemático das RIPs representando uma comparação entre suas estruturas primárias.	27
Figura 3: Média dos volumes dos tumores.	49
Figura 4: Microscopia tumoral.	51
Figura 5: Gradação para angiogênese nos tumores por microscopia (MAGS).	52
Figura 6: Avaliação da angiogênese tumoral.	53
Figura 7: Viabilidade celular de macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos em presença das substâncias em estudo.	56
Figura 8: Viabilidade celular de linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos em presença das substâncias em estudo.	58
Figura 9: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.	66
Figura 10: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.	68
Figura 11: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12(p40) e TGF- β por células dendríticas expostas às substâncias em estudo.	70
Figura 12: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.	72
Figura 13: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-6 por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.	74
Figura 14: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de	76

IL-12(p40) por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.

Figura 15: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos. 78

Figura 16: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-4 por linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos. 80

Figura 17: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-10 por linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos. 82

Figura 18: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IFN- γ por linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos. 84

Figura 19: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de TGF- β por linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos. 86

Figura 20: Determinação de células apoptóticas pela técnica de Anexina V. 88

Figura 21: Determinação de células apoptóticas pela técnica de TUNEL. 90

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Graus celsius
µg/kg	Micrograma por quilograma
µl	Microlitro
Mm	Micrômetro
ANOVA	Análise de variância
APCs	Antigen-presenting cells
Células CCRF-CEM	Células leucêmicas humanas
Células HPB-ALL	Células de leucemia linfocítica aguda de sangue periférico humano
Células MDSC	Células supressoras derivadas de mieloides
Células MOLT-4	Células de Leucemia Linfoblástica.
Células NK	Células natural killers
Células PEC	Peritoneal exsudate cells
Células T _H 1	T helper 1 cells
Células T _H 2	T helper 2 cells
Células Treg	Células T reguladoras
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CO ₂	Gás carbônico
Cys	Cysteine
DCs	Dendritic cells
DNA	Deoxyribonucleic acid
DO	Densidade óptica
EUA	Estados Unidos da America
G	Grama
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
H	Horas
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IC ₅₀	Concentração inibitória 50
iDCs	Imature dendritic cells
IFN-γ	Interferom gama

IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDA	Quilodaltons
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAGS	Microscopic angiogenesis grading system
MEM	Minimum Essencial Medium
mg/kg	Miligrama por quilograma
MHC II	Major histocompatibility complex class II
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide
NaOH	Hidróxido de sódio
ng/ml	Nanograma por mililitro
Nm	Nanômetro
NMuMG	Normal mouse mammary gland epithelial cells
NO	Óxido nítrico
PBS-T	PBS, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20
PSer	Phosphatidylserine
RCM	Receptores colinérgicos muscarínicos
RE	Retículo endoplasmático
RIPs	Ribosome inactivating proteins
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (culture medium)

rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAM	Tumor associated macrophages
TGF- β	Transforming growth factor beta
TIL	Tumor-infiltrating T lymphocytes
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling
UNICAMP	Universidade de Campinas
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VEGF	Vascular endothelial growth factor

RESUMO

O termo “câncer” corresponde ao conjunto de cerca de 100 doenças que têm em comum uma divisão celular desordenada invadindo os tecidos e órgãos, podendo metastatizar para outras regiões do corpo. Os tumores de mama e de colo do útero são os tipos mais frequentes no sexo feminino, e as estimativas para 2012, no Brasil, são de 52.680 e 17.540 novos casos, respectivamente. Abrina, obtida de sementes de *Abrus precatorius* é uma proteína inativadora de ribossomos (RIPs) do tipo 2, compostas por duas cadeias peptídicas, uma apresentando atividade enzimática N-glicosidase e a outra atividade lectínica com afinidade a β -D-galactose. Neste estudo, avaliamos o potencial antitumoral contra o câncer de mama de abrina em um modelo de câncer mamário murino já estabelecido em nosso laboratório, concomitante à avaliação dos efeitos imunológicos do tumor e da proteína testada no animal. Para isso avaliamos a partir dos tumores e células do sistema imunológico retirados dos animais do estudo, o percentual de inibição do crescimento e angiogênese tumorais, o percentual de células imunes e de células apoptóticas no peritônio e baço, a produção de citocinas e mediadores químicos produzidos pelas células imunes. Com base nos resultados obtidos, observou-se que o tratamento com abrina (7,5 μ g/kg) apresentou eficácia similar ao da droga padrão pois apresentou infiltrado inflamatório misto dentro tumor, percentuais de inibição de crescimento e de angiogênese tumorais, e de células NK e NKT esplênicas similares ao tratamento padrão (doxorubicina - 6mg/kg); em contrapartida apresentou menor quantidade de macrófagos peritoneais e células dendríticas esplênicas ativadas, células T CD8⁺ citotóxicas e células T regs (CD25⁺Foxp3⁺), e maior percentual de células T CD4⁺, maior produção de H₂O₂, IL-1 β , IL-6 e IL-12 por células peritoneais e IL-10, IFN- γ e TGF- β por linfócitos esplênicos. Porém, apresentou maior percentual de células produtoras de IL-6, IL-10 e TGF- α , e menor de IL-4 no tecido conjuntivo peritumoral que o grupo que recebeu doxorubicina. A presença de galactose não afetou a citotoxicidade de abrina em macrófagos e linfócitos, mas afetou significativamente em células tumorais LM3 e o potencial de inibição de crescimento tumoral.

PALAVRAS-CHAVE: câncer de mama, abrina, citocinas, células imunes, apoptose.

ABSTRACT

The word "Cancer" corresponds to a group with about 100 diseases which have in common a disordered cell division, resulting in tissues and organs invasion and also metastasis to other body regions. Breast and cervix tumours are the most common type in women and, in Brazil, the estimates for 2012 are of 52,680 and 17,540 new cases respectively. Abrin is obtained from *Abrus precatorius* seeds being type 2 ribosome inactivating protein (RIP) composed of two peptide chains, one of them possessing N-glycosylase enzyme activity and the other a lectinic activity with affinity for β -D-galactose. In the present work, the antitumour potencial of abrin against breast cancer was evaluated employing a murine breast cancer model already established in our laboratory and concomitantly determining the immunologic effects of the tumour and the protein in mice. From tumours and immune cells isolated from mice belonging to the different experimental groups, the tumour growth inhibition rate and angiogenesis were determined, the percentage of immune and apoptotic cells in the peritoneum and spleen, and also the production of immunologic mediators by immune cells. Based on the results it was found that treatment with abrin (7.5 μ g/kg) was as effective as the standard drug (doxorubicin - 6 mg/kg) considering that inflammatory tumour infiltrate, tumour growth inhibition and angiogenesis rate, as well as splenic NK and NKT cells percentage were similar. However, abrin-treated animals had a lower percentage of cytotoxic CD8⁺ and Treg (CD25⁺Foxp3⁺) cells as well as activated peritoneal macrophages and splenic dendritic cells accompanied by a higher percentage of CD4⁺ T cells and increased production of H₂O₂, IL-1 β , IL-6 and IL-12 by peritoneal macrophages and IL-10, IFN γ and TGF- β by splenic lymphocytes. Moreover, abrin-treated animals presented a higher percentage of IL-6, IL-10 and TGF- α and lower of IL-4 immune producer cells inside tumour than doxorubicin-treated animals. The presence of β -D-galactose did not affect abrin cytotoxicity when in culture with macrophages or lymphocytes, but significantly decreased its cytotoxicity on LM3 tumour cells *in vitro* and abrin's potencial for inhibiting tumour growth *in vivo*.

Key-words: breast cancer, abrin, cytokines, immune cells, apoptose.

CAPÍTULO 1

1- INTRODUÇÃO

O termo “câncer” corresponde ao conjunto de cerca de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo metastatizar para outras regiões do corpo (INCA, 2008).

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres nos Estados Unidos e a segunda causa de morte entre todos os cânceres. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 52.680 novos casos de câncer de mama são estimados para 2012, e em 2008, foram registradas 11.969 mortes em mulheres devido ao câncer de mama (INCA, 2012). O câncer de mama provavelmente é o tipo mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, sobretudo pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal (INCA, 2008).

Diversos trabalhos têm utilizado a linhagem de adenocarcinoma de mama murino LM3 tanto em experimentos *in vitro* (DI VENOSA et al., 2005) como *in vivo* (CASAS et al., 2008; CARNEVALE et al., 2007; QUAGLINO et al., 2007; FISZMAN et al., 2006). A linhagem LM3 é obtida a partir de cultura primária de adenocarcinoma de mama murino (M3) em camundongos Balb/c (BAL DE KIER JOFFÉ et al., 1983) e expressam constitutivamente altas concentrações de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) em comparação com células do epitélio mamário murino normal, NMuMG (ESPAÑOL et al., 2002).

No organismo, as células tumorais são confrontadas com células do sistema imunológico em cada etapa da malignidade, por exemplo, no interior do tumor, nas circulações sanguínea e linfática e em lesões metastáticas (VAN GINDERACHTER et al., 2006). O sistema imune é uma complexa rede de células e mediadores altamente efetiva e dinâmica que protege o hospedeiro de patógenos. Contudo, o sistema imune deve distinguir o próprio de estruturas não-próprias, mas também entre antígenos externos prejudiciais e inócuos para prevenir respostas imunes não-essenciais e auto-destrutivas (JONULEIT, SCHMITT, 2003). Embora a inflamação atue como uma defesa adaptativa do hospedeiro contra infecções ou lesões, e é primariamente um processo auto-limitante, a resolução inadequada de respostas inflamatórias frequentemente conduz a doenças crônicas incluindo câncer (JACKSON, EVERS, 2006; SCHOTTENFELD, BEEBE-DIMMER, 2006).

Medicina alternativa é frequentemente usada para prevenir ou tratar muitas doenças humanas incluindo o câncer. De acordo com Ernest e Cassileth (1999), terapias alternativas são muito populares e sua prevalência na população geral é de 40% no Reino Unido, 50% na Austrália e 65% na Alemanha. Em países asiáticos, africanos e sul-americanos, a prevalência de métodos alternativos, especialmente fitoterapia pode ser maior que nos países mencionados acima devido ao amplo uso da medicina tradicional (KANENO et al., 2004).

A espécie sub-arbustiva brasileira *Abrus precatorius* (jequiriti) pertence à família Papilionoideae, tribo Abrae e ao gênero *Abrus* (MOTA, 1997). A partir das sementes desta planta obtêm-se abrina. Ela é uma proteína inativadora de ribossomos (RIPs) do tipo II, possuindo duas cadeias peptídicas unidas por ponte dissulfídicas, sendo que uma das cadeias possui atividade enzimática N-glicosidase, e a outra cadeia, possui atividade lectínica.

Abrina é conhecida há quase um século e tem sido usada como uma potente imunotoxina desde os primeiros dias da imunologia até o final do século XIX (WU et al., 2010). Diversos relatos têm documentado que abrina é mitogênica, antitumoral e agente imunopotencializador, e acredita-se que sua habilidade de inibir síntese proteica adota mecanismos alternativos de ativação de apoptose celular, mas apesar disso, ela é menos tóxica para células normais do que para células tumorais (LIU, PECK, LIN, 2012).

Neste trabalho procuramos através de testes *in vivo* verificar o potencial antitumoral de abrina em modelo murino de câncer de mama, observando os efeitos desses tratamentos no sistema imune dos camundongos portadores de tumor através de dosagem de NO, H₂O₂ e citocinas, verificação de percentual das principais células imunes (células dendríticas, macrófagos, linfócitos e células NK) no baço, peritônio ou tumor, e de percentual de células PEC e esplênicas apoptóticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- CÂNCER DE MAMA

Neoplasia é definida como uma massa anormal de tecido cujo crescimento está desordenado, apresenta certo grau de autonomia e aumenta de tamanho, de forma mais ou menos constante, em uma determinada extensão sua autonomia não é completa e depende criticamente do hospedeiro para sua nutrição e suprimento sanguíneo (KUMAR, CONTRAN, ROBBINS, 1994).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 52.680 novos casos de câncer de mama são estimados para 2012, e em 2008, foram registradas 11.969 mortes em mulheres devido ao câncer de mama (INCA, 2012). O câncer de mama provavelmente é o tipo mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, sobretudo pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal (INCA, 2008).

Nos EUA, excluindo os cânceres de pele, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, sendo aproximadamente 1 em 3 cânceres diagnosticados e é a segunda causa de morte por câncer em mulheres. Estimou-se aproximadamente 230.480 novos casos de câncer de mama invasivo e 39.520 mortes nos EUA para o ano de 2011 (DESANTIS et al., 2011).

A linhagem LM3, originada a partir de cultura primária de adenocarcinoma de mama murino (M3) em BALB/c (BAL DE KIER JOFFÉ et al., 1983), foi obtida no Instituto H. Roffo, em Buenos Aires - Argentina. Elas expressam constitutivamente altas concentrações de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) em comparação com células do epitélio mamário murino normal, NMuMG (ESPAÑOL et al., 2002). Estudos com células LM3 e LM2, mostraram que as LM3, capazes de metástase espontânea ao pulmão, produzem mais óxido nítrico do que as LM2, incapazes de metástase espontânea, e que elas foram menos sensíveis à citotoxicidade mediada por NO-exógeno (EIJÁN et al, 1998).

Diversos modelos experimentais, utilizando linhagens de células tumorais humanas ou murinas, têm sido usados na pesquisa de novos medicamentos para o tratamento dos mais diversos tipos de cânceres. Casas et al., em 2008, compararam células LM3 e os clones destas células resistentes a ALA-DPT quanto a habilidade

de crescerem como tumores primários subcutâneos. Eles injetaram subcutaneamente 10^5 a 10^6 células/0,2ml no flanco esquerdo de camundongos Balb/c e mediram o volume tumoral toda semana para estabelecer a taxa de crescimento. Neste experimento observaram que o aparecimento de tumor diminuiu quando utilizou-se os clones resistentes comparado a linhagem LM3, além disso, quando injetou-se subcutaneamente 10^5 células LM3 nos camundongos, 30% dos camundongos desenvolveram tumores, enquanto nenhum tumor foi desenvolvido nos clones resistentes. Quando aumentaram a quantidade injetada para 5×10^5 células, 100% dos animais apresentaram tumor para células LM3, 60 e 30% para os clones, e quando aumentaram para 10^6 células, 100% dos animais injetados com células LM3 e o clone 4 desenvolveram tumores, assim como somente 60% dos animais que foram injetados com clone 8.

2.2- SISTEMA IMUNE NO CÂNCER

O sistema imune exerce tanto efeitos inibidores como estimuladores nos tumores mamários, e o balanço desses efeitos pode profundamente influenciar o crescimento tumoral (KORKAYA, LIU, WICHA, 2011). Mudanças no sistema imune causadas pelo câncer envolvem eventos tanto ao nível de resposta imune celular como humoral.

Células do sistema imune inato incluem células dendríticas (DCs), células natural killer (NK), granulócitos, células supressoras derivadas de mieloides (MDSC), macrófagos e monócitos, os precursores dos macrófagos. Estas células estão presentes na glândula mamária normal e executam importante papel para a função deste tecido, porém elas estão em maior número em tecidos neoplásicos, tais como tumores de mama (KEES, EGEBLAD, 2011).

Os macrófagos são importantes células apresentadora de antígenos. Eles executando um papel de destaque na defesa do hospedeiro, pois formam a primeira linha de defesa e atuam como importantes células acessórias nas respostas imunes adaptativas. Quando ativados, os macrófagos produzem diferentes citocinas inflamatórias e expressam diversos receptores de superfície específicos (CD), que tem um importante papel na sinalização e adesão das células (WACHÉ, et al.,

2009). Moléculas de adesão são necessárias para diferenciação e movimentação de leucócitos, sendo CD11b (antígeno de macrófago, Mac-1) parte da família das integrinas, que é a mais importante família de moléculas de adesão envolvidas na movimentação de monócitos/macrófagos (HAYASHI et al., 2008).

Os macrófagos ativados classicamente (M1) são caracterizados por sua habilidade de liberar grandes quantidades de citocinas pro-inflamatórias (IL-12, TNF), espécies reativas do nitrogênio (RNS) e espécies reativas do oxigênio (ROS), alta expressão de MHC II e moléculas co-estimulatórias, eficiente apresentação de antígenos e atividade microbicida e tumoricida. Em contrapartida, os macrófagos alternativamente ativados (M2) têm fenótipo de baixa expressão de IL-12 e alta expressão de IL-10, receptor de IL-1 e IL-1RA. Em geral, macrófagos M2 participam de polarização de respostas T_H2 , eliminação de parasitas, diminuição da inflamação, promoção de remodelagem tecidual, angiogênese, progressão tumoral e funções imunoreguladoras (BISWAS, MANTOVANI, 2010). Frequentemente, os macrófagos associados a tumor (TAM) são macrófagos M2 embora pesquisadores relatem que essa rígida binarização pode não ser apropriada e que existe um espectro de fenótipos de macrófagos associados a tumor (LEVANO, JUNG, KENNY, 2011).

As células dendríticas (DC) são células apresentadoras de antígeno (APCs) especializadas derivadas da medula óssea. Elas não só são capazes de processar e apresentar antígenos para ativar linfócitos T “naive”, mas elas também regulam a natureza da resposta de células T obtida, determinando se ele conduz a tolerância ou para respostas de células T efetoras Th1 ou Th2 (SHORTMAN, LAHOUD, CAMINSCHI, 2009). As DCs existem em duas formas distintas fenotipicamente. As DCs imaturas (iDCs) são capazes de circular através de tecidos periféricos e mostrar antígenos solúveis e possivelmente células necróticas ou apoptóticas (GROLLEAU-JULIUS et al., 2008). Essas células dendríticas expressam poucas moléculas co-estimulatórias e são responsáveis por manter tolerância de células T a antígenos próprios (STEINMAN, BANCHEREAU, 2007). Uma vez que as DCs começam a processar e apresentar antígenos, elas “amadurecem” para uma forma mais ramificada caracterizada pela reduzida capacidade de ingerir antígenos e ela aumenta a capacidade co-estimulatória a células T, estimulando respostas a antígenos estranhos (STEINMAN, BANCHEREAU, 2007; GROLLEAU-JULIUS et al., 2008). Diversos estudos revelam que células dendríticas associadas a tumor geralmente possuem fenótipo imaturo caracterizado por alta expressão de CD1a e

baixa expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40 (LAPTEVA et al., 2009).

As células T helper tipo 1 e T helper tipo 2 se referem aos subtipos de células T CD4⁺ $\alpha\beta$ TCR dependente do estímulo efetor dominante (O'GARRA, ARAI, 2000). Essa diferenciação é dependente das citocinas produzidas pelas células imunológicas. As Th1 produzem interferon- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e são eficientes na eliminação de patógenos intracelulares, via ativação de macrófagos. As células Th2 liberam interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) que ativam a imunidade humoral e são secretadas de maneira acentuada na presença de antígenos persistentes (RENGARAJAN, SZABO, GLIMCHER, 2000). Mais recentemente foram descobertas outras subpopulações de células T, como as células Th17 que seletivamente produzem IL-17, mas que também podem produzir outras citocinas como IL-9, IL-10, IL-21, IL-22 e, em humanos, IL-26; outra subpopulação é composta pelas células T reguladoras (Tregs) com funções imunossupressoras e expressam fator de transcrição Foxp3, que podem ser células T reguladoras naturais (nTreg) derivadas do timo, ou células T reguladoras induzidas (iTreg) originadas de células T CD4⁺ virgens na periferia (HIRAHARA et al., 2011).

Em condições patológicas, como o câncer, a distribuição de subpopulações de células T pode ser reorganizada e/ou as células T podem ser funcionalmente desativadas. Embora o tecido tumoral seja o centro da regulação imune no câncer, outros compartimentos imunes podem ser patofisiologicamente influenciados. Fahmi e colaboradores (2010) observaram que em modelo de tumor mamário quimicamente induzido, houve maior aumento na quantidade de células T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25^{hi}, CD4⁺Foxp3⁺, CD8⁺Foxp3⁺ e células NKT encontrado foi no baço, então nos linfonodos adjacentes ao tumor ou na fração enriquecida de linfócitos do tumor. No câncer, o baço pode ser o órgão alvo para migração de células T CD4⁺ expressando receptor CD62L na qual elas servem como células indutoras de supressão com produção de TGF- β para induzir principalmente células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (NOMA et al., 2005).

2.3- *Abrus precatorius* L.

Abrus precatorius L., também chamado jequiriti, é uma trepadeira delgada e perene que se enlaça ao redor de árvores, arbustos e sebes. Não tem órgãos especiais de fixação. Folhas são glabras com longos internódulos. Tem um galho delgado e um tronco cilíndrico enrugado com uma casca marrom com textura esfumaçada. Folhas alternadas compostas paripenadas com estípulas. Cada folha tem um tamanho de 5 a 10 cm. Carrega de 20 a 24 ou mais folíolos, cada um sendo 1,2 a 1,8 cm de comprimento, oblongas e obtusas. É áspera em ambos finais, glabra no topo e suavemente hirsuta abaixo. Flores são pequenas e de cor violeta pálido com um talo curto, arranjado em ramalhete. O ovário tem uma placentação marginal. O fruto, que é um legume, é achatado, alongado e forma-truncada com uma ponta deflexa aguda tem em torno de 3 a 4,5 cm de comprimento, 1,2 de largura e textura sedosa. A vagem ondula para trás quando aberta para revelar sementes suspensas. Cada fruto contém de 3 a 5 sementes de forma oval, em torno de 0,6 cm de comprimento. Elas são usualmente de cor escarlate brilhante com uma esfumaçada textura lustrosa, e uma mancha preta no topo (**Figura 1**) (FERNANDO, 2007).

Esta planta é encontrada em regiões razoavelmente secas em elevações baixas. Cresce em climas tropicais e todas as áreas tropicais e sub-tropicais. A parte tóxica desta planta são as sementes das quais são extraídas a abrina, uma potente proteína tóxica.



Figura 1. Fotos das flores, frutos, sementes e da planta *Abrus precatorius* L. (CITY OF CORAL SPRINGS, 2008).

Do jequiriti pode-se obter uma proteína inativadora de ribossomos tipo II, chamada abrina. Esta é composta por duas cadeias peptídicas: cadeia A, com atividade enzimática, e cadeia B, com atividade lectínica (capacidade de ligar-se a carboidratos). Essas duas cadeias são ligadas por uma ponte dissulfídica formada entre os resíduos Cys 247 da cadeia A e Cys 8 da cadeia B. Abrina possui quatro isoformas (a, b, c, e d) isoladas (LIN et al., 1981, 1982), sendo este fato confirmado por McPherson e Rich (1973) quando observaram em cristais de abrina quatro moléculas proteicas numa unidade assimétrica, sendo que esses cristais difrataram a uma resolução de 3 Å. Além disso, Tahirov e colaboradores (1994) observaram uma única molécula numa unidade assimétrica que difratou a uma resolução de 2,1 Å.

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) são proteínas de plantas que inativam ribossomos de células eucarióticas. Essa denominação é usada somente para proteínas contendo domínios rRNA N-glicosidases, pois existem outras proteínas que podem inativar os ribossomos (p.ex. RNases ou proteases) por outros mecanismos, mas não são RIPs (PEUMANS, HAO, VAN DAMME, 2001).

As proteínas inativadoras de ribossomos são membros de uma classe de lectinas, chamadas quimerolectinas. Estas são caracterizadas por possuírem, além do sítio de ligação a carboidratos, um domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica que age independentemente do domínio ligante de açúcar (MOREIRA, 1998).

Segundo Mundy e colaboradores (1994), as RIPs podem ser classificadas em 3 tipos de acordo com suas propriedades físicas e estruturais (**Figura 2**):

- RIPs tipo I: são enzimas monoméricas, de massa molecular entre 25 kDa e 30 kDa (LING, LIU, WAG, 1994), com um domínio RNA N-glicosidase que não possuem uma cadeia ligante a glicoconjugados e apresentam baixa citotoxicidade. Algumas delas podem entrar na célula através de mecanismos passivos, tais como, pinocitose de fase-flúida. Exemplos: saporina (*Saponaria officinalis*) e a PAP (CAVALLARO, 1995);
- RIPs tipo II: são proteínas heterodiméricas compostas de duas cadeias polipeptídicas, de massa molecular em torno de 60 kDa (LING; LIU; WAG, 1994). A cadeia A é a porção com atividade enzimática de remover um resíduo de adenina de um "loop" exposto da sub-unidade 28S do RNA ribossomal, com isso inibindo a síntese proteica (OLSNES, 2004). A cadeia B é uma cadeia

lectínica (STIRPE et al., 1978). A cadeia B pode ligar-se a glicoproteínas ou glicoconjugados presentes na superfície celular (STEEVES et al., 1999) mediando o transporte da cadeia A para o citosol, onde terá acesso aos ribossomos. Exemplos: abrina, ricina e pulchelina (BEAUMELLE, ALAMI, HOPKINS, 1993).

- RIPs tipo III: são proteínas sintetizadas como precursoras inativas (proRIPs) que requerem um processamento proteolítico entre os aminoácidos envolvidos na formação do sítio ativo. As RIPs deste grupo foram caracterizadas no milho e na cevada (BASS et al., 1992).

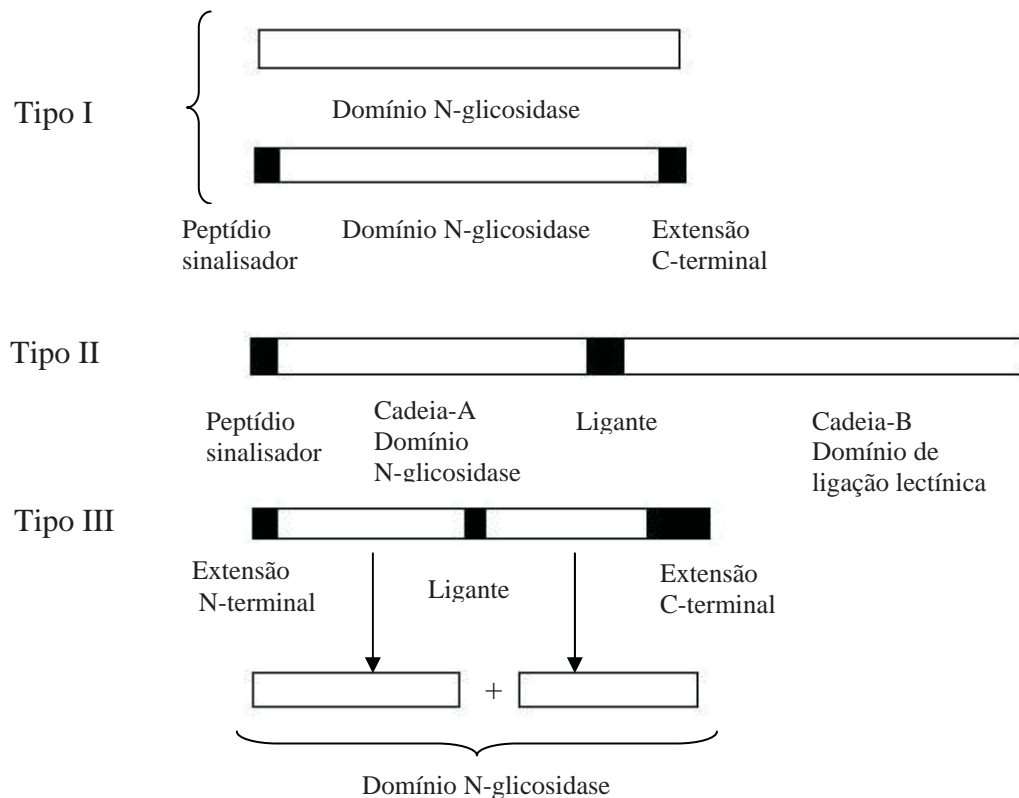


Figura 2. Alinhamento esquemático das RIPs representando uma comparação entre suas estruturas primárias (NIELSEN, BOSTON, 2001).

A comparação da sequência de aminoácidos de RIPs tipo I e tipo II revela notáveis similaridades entre cadeias-A de RIPs tipo I e RIPs tipo II, tão bem quanto entre as cadeias-B de diferentes RIPs tipo II. Uma análise acurada indica que a similaridade da sequência entre as regiões amino-terminal e a central das RIPs é muito maior que aquela das sequências carboxil-terminal (HARTLEY, CHADDOCK, BONNESS, 1996).

Geralmente, a estrutura terciária de diferentes RIPs é bem conservada, como demonstrado pelo fato que os traços α -carbono de muitas RIPs são virtualmente sobreponíveis. Existem, contudo, algumas diferenças principais, especialmente na região terminal-carboxila e estruturas circulares de superfície. Essas diferenças podem explicar as diferenças na atividade e especificidade do substrato das diferentes RIPs (PEUMANS, HAO, VAN DAMME, 2001).

RIPs tipo II devem sua atividade de ligação a carboidratos à cadeia-B, que contém dois ou possivelmente três sítios de ligação (FRANKEL et al., 1996; STEEVES et al., 1999). Devido à extrema toxicidade de ricina e abrina, RIPs tipo II são usualmente associadas com proteínas altamente tóxicas (BARBIERI, BATTELLI, STIRPE, 1993). Contudo, RIPs tipo II mostram marcantes diferenças em citotoxicidade. Ricina, por exemplo, causa 50% de morte celular em concentrações abaixo de 1ng/ml, enquanto que RIP tipo II do fruto do sabugueiro (*Sambucus nigra* L.) não mostram efeito a 1mg/ml (BATTELLI et al., 1997).

As RIPs tipo II têm a capacidade de ligar-se a glicoproteínas e glicolípídeos na superfície celular, sendo endocitadas por diferentes processos, clatrina dependentes ou independentes, direcionando as moléculas para vesículas endossomais, onde podem ser encaminhadas para uma rota seguinte, dependendo da natureza do receptor, e serem conduzidos a vários destinos (BARBIERI, BATTELLI, STIRPE, 1993). Esses endossomas podem chegar ao complexo de Golgi, e depois as proteínas são encaminhadas ao lúmen do retículo endoplasmático (RE), onde as duas cadeias polipeptídicas são separadas por dissulfeto isomerase (SPOONER et al., 2004). A cadeia A livre no lúmen do RE pode ser interpretada como um polipeptídeo não-complexado e enviada ao citosol pelo sistema de controle de qualidade do RE (LORD, ROBERTS, 1998). Mais especificamente, as RIPs tipo II são retro-translocadas utilizando a via de degradação associada ao RE usualmente seguida por proteínas não-enoveladas, que no citosol são poliubiquitinadas e

degradadas por proteases, no complexo proteassoma (TSAI, YE, RAPOPORT, 2002).

Lin e colaboradores (1982) testaram as 4 isoformas da abrina (a, b, c, e d) contra células de Sarcoma 180. Observaram que a abrina-a era um inibidor potente do crescimento e biossíntese de proteína, enquanto que a abrina-b teve uma baixa eficiência na inibição do crescimento tumoral *in vitro*, isto podendo ser atribuído à sua instabilidade molecular.

Narayanan, Surolia e Karande (2004) reportaram que o sinal para apoptose é acionado aproximadamente 2 horas após a inibição da síntese proteica. Esta via apoptótica induzida por abrina é dependente de caspase-3 e independente de caspase-8 e envolve danos ao potencial de membrana mitocondrial com produção de espécies reativas de oxigênio. A supra-expressão do proto-oncogene 2 de células B de leucemia linfocítica bloqueia esta via apoptótica.

Ohba e colaboradores (2004) ao testarem abrina-a em culturas de diferentes linhagens de células leucêmicas observaram que abrina-a induzia apoptose por diferentes mecanismos, dependendo da linhagem celular. Em células Jurkat, seguiu-se a via convencional – translocação de Pser na superfície celular, ativação de caspase e fragmentação de DNA. Em células CCRF-CEM, iniciou-se com translocação de Pser na superfície celular e fragmentação de DNA sem qualquer indução de atividade de caspase. Em MOLT-4, iniciou-se e caracterizou-se com exposição de Pser e ativação de caspase, mas sem progredir para fragmentação de DNA. Em HPB-ALL, exposição de Pser foi insignificante, a atividade de caspase aumentou acentuadamente, mas fragmentação de DNA não foi detectada.

Outros estudos mostram que em células Jurkat T humanas, abrina de forma dose-dependente aumenta a expressão da proteína supressora de tumor, proibitina. Além disso, abrina induziu significativamente a expressão da proteína Bax, bem como a ativação de caspase 3 e poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), enquanto que a redução de proibitina por RNA de interferência específico retardou apoptose ativada por abrina através de genes pro-apoptóticos (LIU, PECK, LIN, 2012).

Abrina, quando administrada em dose não tóxica (1,25 µg/kg de animal) intraperitonealmente por 5 dias consecutivos em camundongos, foi capaz de ativar o sistema imune e mecanismos efetores tumorocidas através da estimulação da proliferação de linfócitos esplênicos e do timo, aumento da atividade de células NK do baço de animais normais e animais portadores de tumor, aumento da atividade

citotóxica celular dependente de anticorpo e da atividade citotóxica mediada por complemento dependente de anticorpo (RAMNATH, KUTTAN, KUTTAN, 2006)

Ramnath, Kuttan e Kuttan (2002) demonstraram que abrina (7,5 µg/kg de animal) quando administrada intralesionalmente ou intraperitonealmente em dias alternados por 10 dias foi efetiva na redução da massa do tumor sólido induzido por células de linfoma ascítico de Dalton (DLA) e de carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC).

3- OBJETIVOS

3.1 - Geral

- Avaliar a ação antitumoral e imunopotenciadora da administração intratumoral de abrina contra o tumor de mama murino e possível inibição dos efeitos da abrina pela galactose.

3.2 - Específicos

- Avaliar a taxa de inibição do crescimento dos tumores tratados com abrina, abrina acrescida de galactose, doxorrubicina e PBS;
- Verificar da presença de angiogênese em cortes histológicos tumorais;
- Identificar células imunes infiltrantes no tumor produtoras de citocinas por imunohistoquímica;
- Caracterizar fenotipicamente macrófagos peritoneais e as subpopulações de linfócitos esplênicos por citometria de fluxo;
- Determinar a toxicidade da abrina na presença ou ausência de β -D-galactose, e doxorrubicina sobre células do exsudato peritoneal, linfócitos murinos e células tumorais de mama;
- Avaliar a produção de H_2O_2 e NO pelos macrófagos estimulados com abrina, abrina acrescida de β -D-galactose e doxorrubicina;
- Avaliar a produção de NO pelas células dendríticas estimuladas com abrina, abrina acrescida de β -D-galactose e doxorrubicina;
- Determinar a produção das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e TGF- β por macrófagos peritoneais, linfócitos esplênicos e células dendríticas estimulados com abrina, abrina acrescida de β -D-galactose e doxorrubicina;
- Verificar a presença de apoptose e necrose em macrófagos e linfócitos.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Origem da amostra

A toxina abrina foi extraída das sementes de *Abrus precatorius*. As sementes de *Abrus precatorius* foram fornecidas pelo pesquisador Dr. Renato de Azevedo Moreira, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

4.2- Etapa química

O processo de obtenção da abrina foi realizado sob a supervisão das professoras doutoras Ana Paula Ulian de Araújo do Instituto de Física de São Carlos – USP, e Ana Cristina de Oliveira Moreira da Universidade de Fortaleza – UNIFOR, Fortaleza, Ceará.

4.2.1- Obtenção do extrato bruto de *A. precatorius*

As sementes foram desprovidas da casca e depois moídas. Em seguida, a farinha das sementes foi delipidada por maceração em acetona. Foram pesados 10g da farinha e 100 ml de NaCl 0,15M adicionados a mistura e foi deixada sob agitação constantemente por 3 horas. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 12.000 x g, durante 20 minutos a 4°C e, em seguida, filtradas em papel de filtro qualitativo, sendo, então, denominadas de Extrato bruto.

4.2.2- Purificação da abrina

O extrato bruto foi aplicado a uma coluna de galactomanana, obtida de *Adenantha pavonina L.*, estabilizada com solução fisiológica, e equilibrada com NaCl 0,15M. A fração não retida (pico I) foi eluída com a solução de equilíbrio. Para

a eluição da fração retida, pico II, tampão glicina-HCl 0,1M, pH 2,6, foi utilizado. A concentração de proteínas eluídas foi estimada por medida da absorbância em 280 nm utilizando espectrofotômetro. As frações retidas foram dialofiltradas em centriprep 10 (Millipore). A absorbância das amostras foi detectada em espectrofotômetro utilizando filtro de 280nm. As amostras, dialisadas e concentradas, foram filtradas com membranas de 0,2 µm para esterilizar as soluções e então, acondicionadas em freezer -20° C para posterior utilização. A pureza das proteínas foi confirmada por eletroforese em SDS-PAGE seguindo o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970).

4.3- Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas de Balb/c, pesando entre 18-25g, procedentes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP, São Paulo. Estes animais foram mantidos em gaiolas em grupos de 5, com condições estáveis de ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar) e ciclos de 12 horas com e sem luz. Os animais receberam água e ração (Purina) esterilizadas, *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (parecer no. 40/2008).

4.4- Grupos de estudo

Os animais foram distribuídos em 5 animais por grupo:

Grupo I: controle tumoral – foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de PBS.

Grupo II: foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de abrina 7,5µg/kg

Grupo III: foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de Doxorubicina 6mg/kg

Grupo IV: foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de abrina 7,5µg/kg e β-D-galactose 0,2M

Grupo V: foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de β-D-galactose 0,2M

Grupo VI: animais normais – sem indução de tumor e tratamento

4.5- *Testes biológicos in vivo*

4.5.1. **Inoculação das células tumorais**

A linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino LM3, foi gentilmente cedida pela Dra. Elisa Bal Kier Joffé, do Instituto de oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina. Esta linhagem celular foi obtida de subculturas primárias de adenocarcinoma murino de células mamárias de fêmeas de camundongo Balb/c. A linhagem tumoral de adenocarcinoma murino LM3 foi mantida em cultura através de repiques, três vezes por semana, em meio MEM (Minimum Essential Medium, Gibco), acrescentando-se 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma). A suspensão celular foi ajustada a 5×10^6 células/ml e foram inoculados 200µl subcutaneamente no lado direito do abdome (CASAS et al., 2008).

4.5.2. **Inoculação intratumoral das substâncias**

A inoculação das substâncias em estudo foi baseada na técnica utilizada por Lopes (2008). Abrina (7,5 µg/kg) na presença e ausência de β-D-galactose 0,2M, doxorubicina (6 mg/kg), β-D-galactose 0,2M e PBS foram inoculados nos tumores dos animais 1 vez. Cada animal foi inoculado, de acordo com as especificações dos grupos de estudo, por via intratumoral. A inoculação de 0,1 ml foi feita após 20 dias da realização da indução tumoral, ou quando o tumor estava com aproximadamente 5 mm de comprimento.

4.5.3. Obtenção dos tumores e avaliação do crescimento tumoral

O peso dos camundongos e o tamanho do tumor foram acompanhados e medidos até o tumor atingir o tamanho de 5 mm. Sete dias após o fim do tratamento, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

Em seguida, os tumores foram removidos e pesados e o volume foi medido. O volume do tumor foi determinado pela medida do maior diâmetro (a) e do menor diâmetro (b) do tumor e foi calculado de acordo com a fórmula (SAWAOKA et al, 1999):

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = 0.5 \times a \times b^2$$

A taxa de inibição também foi calculada utilizando-se a fórmula a seguir:

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = (1,0 - \text{volume do tumor do grupo tratado} / \text{volume do tumor do grupo controle}) \times 100\%$$

4.5.4. Análise histológica dos tumores

Os tumores removidos dos animais de estudos foram fixados em parafina. Cortes histológicos de 7-10 μm foram realizados com auxílio de um micrótomo, sendo estes cortes fixados em lâminas, que foram coradas com eosina e hematoxilina. As lâminas foram então analisadas e fotografadas com auxílio de microscópio com captura de imagem (Nikon Eclipse E200).

4.5.5. Análise da angiogênese pelo sistema de gradação para angiogênese por microscopia (MAGS)

O sistema de gradação para angiogênese por microscopia (MAGS) foi desenvolvido seguindo a técnica de Brem, Contran e Folkman (1972). A vasoproliferação (KnN), a hiperplasia de células endoteliais (KeE) e a citologia endotelial (KxX) foram observadas em microscópio óptico em cortes de 4 μm do tecido tumoral mamário fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno

e embebidos em parafina, e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina usando um aumento de 500 vezes. A pontuação foi calculada como:

$$\text{MAGS} = \text{KnN} + \text{KeE} + \text{KxX}.$$

A vasoproliferação (KnN) possui um valor máximo de 40, com Kn representando a constante para o microscópio, de valor 1 em aumento máximo, e N sendo o número de capilares vistos sob o aumento de 500 vezes em cada campo. A hiperplasia de células endoteliais (KeE) possui valor máximo de 30, sendo Ke = 3, e E foi o número de células alinhadas na seção transversal do capilar, com valor máximo de 10. A citologia endotelial (KxX) teve um valor máximo de 30; X teve um valor entre 0 e 5 indicando a aparência histológica das células endoteliais na zona de hiperplasia; e Kx foi uma constante de valor 6. A graduação MAGS calculada por esta fórmula variou entre 0 e 100.

4.5.6. Determinação de células produtoras de citocinas em cortes histológicos do tumor

Os tumores de 3 camundongos de cada grupo foram removidos após o sacrifício dos animais. Os tumores foram fixados em formaldeído, lavados por 24h em água corrente e conservados em álcool 70% até o momento da impregnação em parafina. A partir dos tumores impregnados em parafinas foram obtidos cortes histológicos de 4 µm de espessura que foram colocados em lâminas silanizadas. As cortes foram submetidos ao processo de desparafinização e re-hidratação com banhos em xilol, álcool e água. Em seguida, realizou-se a recuperação antigênica utilizando-se panela de pressão (calor úmido) em solução de tampão citrato 10 mM pH 6,0 biotinizados (Vector Laboratories, CA, USA). Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase tecidual endógena por meio de passagem em peróxido de hidrogênio 0,3% em água. Visando reduzir as ligações inespecíficas com o anticorpo, os cortes foram incubados em solução de leite desnatado em pó MOLICO[®] (Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba, São Paulo - Brasil) a 1% em PBS. Depois utilizou-se kit de bloqueio Avidin/Biotin (Vector Laboratories, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os cortes foram incubados "overnight", em temperatura ambiente, com anticorpos, produzidos em coelhos, anti-mouse para as citocinas IL-2 (0,1 µg/ml), IL-4 (0,2 µg/ml), IL-6 (0,1 µg/ml), IL-10 (0,1 µg/ml), TNF-α

(0,2 µg/ml) e IFN-γ (0,2 µg/ml), e anti-humano para TGF- α (0,2 µg/ml) (PEPROTECH, México) diluídos em PBS, para controle negativo, um corte escolhido aleatoriamente foi incubado com PBS. Os tecidos foram tratados com anticorpo de cabra anti-anticorpo de coelho biotilado (21 µg/ml) (Vector Laboratories, CA, USA), depois com reagente VECTASTAIN® e com DAB (Vector Laboratories, CA, USA) (aproximadamente 2 minutos). Os tecidos foram contracorados com hematoxilina de Harris por 50 segundos. Em seguida os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol. A montagem das lâminas foi realizada utilizando VectaMount (Vector Laboratories, CA, USA). As células coradas em marrom foram contadas em 10 campos de visão sob aumento de 400 vezes utilizando microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). As lâminas foram avaliadas por duas pessoas em momentos diferentes, sendo os resultados confrontados e quando houve discrepâncias dos resultados, as lâminas foram revisadas conjuntamente pelos dois avaliadores.

4.6- Testes biológicos in vitro

4.6.1. Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais dos diferentes grupos, após quatro dias de tratamento dos tumores, foram inoculados com 3 ml de tioglicolato de sódio a 3% (Difco Lab. LTDA) três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂. Estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (Veco) e o peritônio exposto. Foram então inoculados com 5 ml de PBS, pH 7,2, gelado, na cavidade abdominal e uma massagem foi aplicada para estimular a liberação das células. O líquido resultante foi colhido com agulha e transferido para um tubo cônico estéril de 15 ml (Corning, Inc.) e centrifugado a 400 g por 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). O sedimento celular foi lavado três vezes com 3 ml de PBS, sendo ressuscitado após a última lavagem em 1 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol a 2x10⁻⁵ M, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 U/ml, L-glutamina 2 mM e 5% de soro fetal bovino (Cutilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C)

para a contagem de células em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). A concentração de células foi ajustada para 5×10^6 células para a realização dos testes.

4.6.2. Cultura de macrófagos e obtenção do sobrenadante

As células obtidas do exsudato peritoneal foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/ml em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado 1,0 ml dessa suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Thermo Electron Hepa Class 100). Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640-C.

Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado 1 ml de abrina ou doxorrubicina em concentrações que demonstraram viabilidade celular acima de 80% em macrófagos, ou 500 μl de abrina nas concentrações citadas acima e 500 μl de galactose 0,2M, ou 1ml de galactose 0,2 M, como controle do açúcar, ou 1 ml de LPS a 10 $\mu\text{g/ml}$, como controle positivo ou somente RPMI-1640-C, como controle de células. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO_2 (Thermo Electron Hepa Class 100) por mais 24 h.

Após esta incubação, os sobrenadantes obtidos das placas de culturas foram centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich Universal 32R Alemanha) a 4°C , durante 10 min a 7800g. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados e estocados em freezer a -80°C até o momento da determinação das citocinas.

4.6.3- Obtenção das células esplênicas

Os animais dos diferentes grupos foram eutanasiados e tiveram o peritônio exposto conforme descrito acima. O peritônio foi aberto para a extração do baço. O baço foi macerado em malha de nylon em uma placa de Petri estéril contendo 3 ml de RPMI-1640-C, gelado, para a liberação das células. O conteúdo da placa foi aspirado por seringa para obtenção de uma suspensão celular homogênea. As

células foram então transferidas para tubo cônico estéril de 15 ml e centrifugadas em RPMI-1640-C três vezes a 400 g por 5 min. Após a última lavagem as células foram novamente ressuspensas em mais 1 ml de meio RPMI-1640-C em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão com azul de Trypan a 0,04%. As suspensões celulares foram então ajustadas para a concentração de 5×10^6 células/ml para realização dos testes.

4.6.4- Cultura de células esplênicas e obtenção do sobrenadante

A suspensão celular contendo as células esplênicas foi ajustada a 5×10^6 células/ml, obtidas como descrito no item anterior, distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades, 1 ml por cavidade e acrescentadas de 1ml de abrina ou doxorubicina em concentrações que demonstraram viabilidade celular acima de 80% em linfócitos, ou 500 μ l de abrina nas concentrações citadas acima e 500 μ l de galactose 0,2 M, ou 1ml de galactose 0,2 M e 500 μ l de meio RPMI-C, como controle do açúcar, ou 1 ml do estímulo (concanavalina A-ConA- na concentração de 0,5 μ g/ml) ou somente meio de cultura nos controles de células. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ por 24 h. Após esta incubação, as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada Hettich Universal 32R (Alemanha) a 4°C durante 10 min a 1500 g. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados e estocados a -80°C para posterior dosagem de citocinas.

4.6.5- Obtenção e diferenciação de células dendríticas a partir da medula óssea e obtenção de sobrenadante de cultura

Foi empregada a metodologia descrita em Talmor e colaboradores (1998). Células da medula óssea (1×10^6 células/ml) obtidas de fêmur e tíbia de ambas as pernas posteriores de animais saudáveis foram pipetadas em placa de 6 poços e cultivadas por 7 dias com 30 ng/ml de GM-CSF e 10 ng/ml de IL-4 a 37°C com 5% de CO₂. O meio foi trocado todos os dias sendo acrescentados os estímulos nos dias 3 e

5 de cultura. Células não aderentes foram coletadas e utilizadas no dia 7. As células dendríticas assim obtidas foram cultivadas por 24h em presença de abrina 25 ng/ml na presença ou ausência de β -D-galactose 0,2M ou doxorubicina 30 μ g/ml. LPS 10 μ g/ml foi utilizado como controle positivo, e somente meio RPMI-C como controle negativo. A partir do sobrenadante desta cultura foram dosados óxido nítrico pela técnica de Green e colaboradores (1982), e IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10 e TGF- β através da técnica de ELISA.

4.6.6- Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal

Foi empregada para a determinação da viabilidade celular a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que se baseia na verificação da atividade e integridade mitocondrial, interpretada como uma medida de viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Esta metodologia baseia-se na redução do sal de MTT por enzimas microsomais e também pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis. O produto dessa redução são cristais de formazana, insolúveis e de cor púrpura, acumulando-se nas células devido a sua incapacidade de atravessar a membrana celular. O álcool isopropílico por sua vez, foi utilizado para a solubilização da formazana, produzindo uma solução homogênea que possibilita a medição da densidade óptica em espectrofotômetro UV/Visível.

Foram utilizadas suspensões de PEC, obtidas dos animais pertencentes aos grupos de estudo, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/ml. 100 μ l dessas suspensões foram adicionados em placas de 96 cavidades (Corning), 100 μ l da abrina ou doxorubicina em diferentes concentrações, ou 50 μ l de abrina nas concentrações citadas acima e 50 μ l de β -D-galactose 0,2M, ou 50 μ l de β -D-galactose 0,2M e 50 μ l de RPMI-C, ou 100 μ l LPS a 10 μ g/ml ou somente o meio de cultura RPMI-1640. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 5% de CO₂. Após esse período, foram adicionados sobre a cultura celular, 100 μ l de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) (Across Organics) a 0,5 mg/ml em RPMI-1640. A placa foi então incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após este

período, o conteúdo da placa foi vertido e 100 µl de álcool isopropílico (Mallinckrodt) foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazana formados. Somente células e meio de cultura RPMI-1640-C foram utilizados como controle, equivalendo a 100% de viabilidade dos macrófagos. A leitura foi feita em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) a 540nm com filtro de referência a 620nm.

4.6.7- Avaliação da viabilidade celular de linfócitos esplênicos

Alíquotas de 100 µl das suspensões de linfócitos, obtidas na concentração, conforme item 4.6.3, foram adicionadas em placas de 96 cavidades para cultivo de tecidos (Corning, Inc., EUA). Aos linfócitos foram adicionados 100µl de abrina ou doxorubicina, em diversas concentrações, ou 50µl de abrina nas mesmas concentrações e 50µl de β-D-galactose 0,2M, ou 50µl de β-D-galactose e 50µl de RPMI-C, ou 100µl Conconavalina A 0,5µg/ml, ou somente meio de cultura.

A incubação foi feita em estufa a 37°C, com tensão de 7,5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA) por 24h. A seguir, foram adicionados 20µl de uma solução concentrada de MTT (5mg/ml em meio RPMI 1640)/cavidade e incubou-se por mais 3 horas em estufa a 37°C, com tensão de 7,5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Após esse procedimento, as placas foram centrifugadas a 800g durante 10 minutos a 10°C em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha), os sobrenadantes foram retirados por aspiração com auxílio de uma micropipeta, transferidos para outra placa. Às células foram adicionados 100µL de álcool isopropílico (Mallinckrodt, México) em cada cavidade. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems, Finlândia) em comprimento de onda de 570nm (BAUTISTA, ACOSTA, TOLEDO, 2000).

4.6.8- Avaliação da viabilidade celular em células LM3

A avaliação da atividade da abrina sobre o crescimento celular foi realizada utilizando-se linhagem tumoral murina LM3 (adenocarcinoma de mama).

A linhagem celular foi mantida em meio de cultura MEM (Minimum Essencial Medium, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma) e 4µg/ml de gentamicina, em estufa a 37°C com atmosfera úmida e tensão constante de 7,5% de CO₂ (Forma Scientific). Foram realizados repiques celulares 3 vezes por semana. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco), utilizando-se corante Azul de Tripán a 0,04% em PBS e ajustado a uma concentração de 5×10^4 células/ml em meio MEM.

O crescimento tumoral foi quantificado pela capacidade das células vivas reduzirem o MTT. Foram adicionados 200µl das linhagens tumorais em placas de 96 cavidades, Corning. Após 24 horas de incubação a 37°C e 7,5% de CO₂, 200µl da solução de abrina ou doxorrubicina em diferentes concentrações, ou 100µl de abrina nas concentrações acima e 100µl de β-D-galactose a 0,2M, ou 100µl de β-D-galactose a 0,2M e 100 β-D-galactose a 0,2M de MEM, ou 200µl de meio MEM foram adicionados, e as placas foram incubadas por mais 24 e 48 horas. Após esse período, foram adicionados sobre a cultura celular, 100 µl de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico (MTT) (Across Organics) a 0,5 mg/ml em meio MEM. Após três horas, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100µl de álcool isopropílico (Mallinckrodt) foram adicionados a cada cavidade da placa para solubilizar os cristais de formazana formados. Somente células e meio de cultura foram utilizados como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade das células tumorais. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finlândia), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

4.6.9- Caracterização fenotípica de células imunes por citometria de fluxo

A caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos T e células dendríticas oriundos do baço foi realizada empregando metodologia usada por Monnazzi (2007), utilizando os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11c, anti-I-Ad/I-Ed, anti-NK1.1, anti-CD25, anti-Foxp3, anti-CD80 e anti-CD86 conjugados a fluorocromos. A fenotipagem de macrófagos peritoneais foi realizada utilizando a

mesma metodologia adaptada aos macrófagos utilizando os anticorpos anti-CD11b, anti-CD54, anti-CD80 e anti-CD86 conjugado a fluorocromos. A caracterização fenotípica das células dendríticas diferenciadas expostas às substâncias em estudo foi realizada com a mesma metodologia utilizando os anticorpos anti-CD11c, anti-I-Ad/I-Ed, anti-CD80 e anti-CD86 conjugado a fluorocromos.

4.6.10- Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari (1980) e adaptado por Pick e Mizel, em 1981. As células do exsudato peritoneal dos animais foram obtidas como descrito no item 4.6.1 e ajustadas à concentração de 2x10⁶ células/ml em solução completa de vermelho de fenol constituída de 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho de fenol e peroxidase de raiz forte, tipo II (0,01 mg/ml, Sigma). Alíquotas de 100 µl foram adicionadas em placas de cultura de tecido de fundo plano contendo 96 cavidades (Corning, Inc.) e acrescentadas de 25 µl de abrina ou doxorrubicina em concentrações que demonstrarem viabilidade celular acima de 80% em macrófagos e 25 µl de solução vermelho de fenol, ou 25 µl de abrina nas concentrações acima citadas e 25µl de galactose 0,2 M, ou 25 µl de galactose 0,2 M e 25 µl de solução vermelho de fenol, como controle do açúcar. Foram adicionados às células 50 µl de Zimozan 5mg/ml, como controle positivo, ou somente solução vermelho de fenol, como controle de células. As placas foram incubadas por 1 h em estufa a 37°C em atmosfera úmida com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de NaOH 5N (Sigma). A seguir, foi feita leitura em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finlândia), com filtro de 620nm. As amostras foram ensaiadas em triplicata. Os resultados foram expressos em nmols de H₂O₂/ml, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H₂O₂ em tampão de vermelho de fenol.

4.6.11- Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células através da reação de diazotização com o reagente de Griess [composto de 1 g de sulfanilamida (Merck), 0,1 g de dicloro N(1-naftil) etilenodiamina (Merck), 2,5 ml de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p. 100 ml, conforme descrito por Green e colaboradores (1982).

As células do exsudato peritoneal dos animais foram obtidas como descrito no item 4.6.1 e ajustadas à concentração de 5×10^6 células/ml em RPMI-C. Alíquotas de 100 μ l foram adicionadas para placas de cultura de tecido de fundo plano contendo 96 cavidades (Corning, Inc.) e acrescentadas de 50 μ l de abrina ou doxorubicina (100 μ l) em concentrações que demonstrarem viabilidade celular acima de 80% em macrófagos e 50 μ l de PBS, ou 50 μ l de abrina nas concentrações acima citadas e 50 μ l de galactose 0,2 M, ou 100 μ l de galactose 0,2 M, como controle do açúcar. Foram adicionados às células 100 μ l de LPS a 10 μ g/ml, como controle positivo ou somente RPMI-C, como controle de células. As placas foram incubadas por 24 h em estufa a 37°C em atmosfera úmida com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Alíquotas de 50 μ l de cada amostra foram transferidas para outra placa de cultura de células não estéril, contendo 96 cavidades de fundo planas (Corning, Inc.) e acrescentadas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada com filtro de 540 nm em espectrofotômetro (Microplate Reader, Multiskan Ascent, Labsystems). As concentrações de NO liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecidas, com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio e os valores foram expressos em μ mols de nitrito/mL.

4.6.12- Determinação de citocinas

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12(p40), TNF- α foram quantificados nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais (item 4.6.2), IL-4, IFN- γ , IL-10 e TGF- β foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células de

esplênicas (item 4.6.4), através do teste imunoenzimático ELISA de captura. Para isso foi utilizado o Kit BD OptEIA (BD Pharmigen) de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 cavidades (Corning, Inc.) foram adsorvidas com anticorpos de captura, monoclonal, anti-citocina de camundongo (100 μ l por cavidade), na concentração adequada para cada citocina em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5, (IFN- γ , TGF- β e IL-1 β) ou tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,5 (IL-6, IL-4, IL-10, IL-12 e TNF- α). As placas foram incubadas “overnight” à temperatura de 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com 300 μ l de PBS, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T), bloqueadas com 200 μ l/cavidade de PBS com 10% de soro fetal bovino e incubadas à temperatura ambiente por 60 minutos. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Após a última lavagem foram adicionados a cada cavidade 100 μ l do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas 5 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 μ l/cavidade de anticorpo monoclonal (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina e estreptavidina-HRP, diluído à concentração adequada para cada citocina em PBS com 10% soro fetal bovino. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas 5 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 μ l/cavidade do substrato tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (BD Pharmigen™ Substrato Reagente TMB) e incubadas novamente à temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro. A reação foi interrompida adicionando-se 50 μ l de H₂SO₄ 2N a cada cavidade. A absorbância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro UV/Visível para microplacas (Miltiskan Ascent, Labsystems), e as concentrações de cada citocina foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/ml.

4.6.13- Detecção de apoptose e necrose pelas metodologias tunel e anexina V

A detecção de apoptose em células PEC e células esplênicas obtidas dos animais pertencentes aos grupos experimentais foi realizada mediante duas metodologias, dentre elas o TUNEL e coloração pela anexina V.

A técnica de TUNEL é baseada na ligação específica de deoxinucleotidil transferase (TdT) para a porção terminal 3'-OH do DNA fragmentado. Esta técnica pode ser analisada por microscopia fluorescente, citometria de fluxo ou imunohistoquímica. Ela não é específica para apoptose, pois indica clivagem de DNA por qualquer forma de morte celular e células necróticas também podem ser coradas por esta técnica. Anexina V é baseada na observação que durante indução de apoptose, fosfatidilsetina (PS) é translocada da camada interna para a camada externa da membrana plasmática. Anexina V é uma proteína que se liga com alta afinidade a fosfatidilserina. Esta técnica tem a vantagem pelo uso de anexina-biotinilada, que pode marcar células em todos os estágios de apoptose medida por citometria de fluxo. A desvantagem é que pode marcar tanto células necróticas como apoptóticas, sendo isso compensado pelo uso conjunto de anexina V com iodeto de propídio para diferenciar entre os dois (HUERTA et al., 2007).

4.6.13.1. TUNEL

O TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) foi realizado através de um kit de ensaio de TUNEL (BD Pharmigen) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram lavadas em PBS e fixadas com paraformaldeído a 1% a 4°C por 45 minutos. As células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado por centrifugação a 300 xg por 5 minutos. As células foram ressuspensas em álcool 70% "ice cold" e mantidas a -20°C por 30 minutos. As células foram lavadas 2 vezes com tampão de lavagem por centrifugação a 300 xg por 5 minutos. Os tubos testes foram acrescidos de solução de marcação de DNA e incubados por 60 minutos a 37°C. Foi adicionado 1 ml de tampão de Rinse aos tubos e estes foram centrifugados a 300 xg por 5 minutos. As células foram ressuspensas em solução de coloração de anticorpo e incubadas no escuro a T.A. por 30 minutos. Finalmente foi adicionado tampão de coloração PI/RNase e os tubos foram incubados no escuro a T.A. por 30 minutos. As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACScanto, BD Pharmingen).

4.6.13.2. ANEXINA V

Para detecção de apoptose pela coloração da anexina V, que se liga à fosfatidilserina expressa na superfície celular das células em processo apoptótico, utilizando o kit I de detecção de apoptose Anexina V – FITC (BD Pharmigen).

As células foram ajustadas à concentração de 1×10^6 células/ml em PBS gelado, sendo acrescentado 1ml da suspensão celular a cada tubo de citometria. As células foram centrifugadas a 300 xg por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 100 μ l de tampão de ligação. Foram, então, adicionados 5 μ l de anexina V-FITC (Anexina V ligada a FITC) e 5 μ l PI (Iodeto de Propídio) a cada tubo teste e incubadas por 15 minutos, no escuro a T.A. No momento da leitura, foram adicionados 400 μ L de tampão de ligação a cada tubo e as células analisadas por citometria de fluxo (FACScanto, BD Pharmingen). Todos os testes foram realizados com os devidos controles nos diferentes grupos experimentais.

4.7. Análise dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat aplicando-se análise de variância (ANOVA) com determinação do nível de significância para $p < 0,05$ e através de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados usando cinco animais e cada determinação foi executada em triplicata. Os gráficos foram confeccionados por intermédio do programa estatístico ORIGIN 8.0.

5. RESULTADOS

5.1- *Isolamento das proteínas*

No isolamento da abrina obteve-se solução pura em PBS, na concentração 9,13 mg/ml. A D.O. da abrina apresentou o valor de 1,24 em comprimento de onda de 280nm (ISHIGURO, et al., 1964).

Observamos que a proteína ao ser tratada com 2-mercaptoetanol e aplicada no gel de eletroforese SDS-PAGE, mostrou-se em duas bandas no gel, correspondendo às duas cadeias polipeptídicas, uma de 30 kDa e 33 kDa, correspondendo as cadeias A e B, respectivamente.

5.2- *Avaliação da taxa de inibição do crescimento tumoral*

Os animais foram inoculados com as células LM3 no flanco esquerdo. Quando os tumores alcançaram tamanho de 5mm foi iniciado o tratamento. Foi realizado 1 tratamento utilizando abrina (7,5 µg/kg) na presença e ausência de β-D-galactose 0,2M, ou doxorubicina (6 mg/kg), ou galactose 0,2M. Os animais foram eutanasiados após sete dias do tratamento. Após o sacrifício, os tumores foram removidos, medidos e pesados.

Foi observado maior tamanho tumoral nos animais que receberam somente galactose em relação aos animais que receberam PBS (**Figura 3**). Os tumores dos animais que receberam doxorubicina (droga padrão) apresentaram menor tamanho que os animais que receberam abrina acrescida ou não de galactose. O tratamento com abrina acrescida de galactose induziu uma menor redução do tamanho tumoral, e o tratamento com galactose isoladamente induziu um aumento significativo do tamanho do tumor aproximado em relação ao grupo controle. Resumindo, o tamanho do tumor foi maior com: galactose > PBS> abrina/galactose > abrina> doxorubicina.

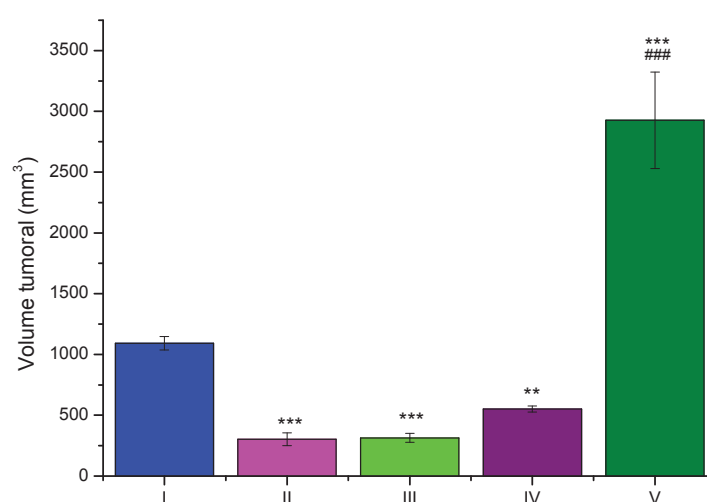


Figura 3: Média dos volumes dos tumores. Os tumores de animais do grupo PBS - controle tumor (I), abrina 7,5µg/kg (II), doxorrubicina 6mg/kg (III), abrina 7,5µg/kg acrescida de galactose 0,2 M (IV), galactose 0,2 M (V) foram retirados, após o sacrifício dos animais, e medidos com paquímetro digital (Mitutoyo). Os volumes dos tumores foram calculados através da fórmula, $\text{mm}^3 = 0.5 \times \text{maior diâmetro (mm)} \times \text{menor diâmetro}^2(\text{mm})$. A média foi calculada através do volume de tumores de 4 animais de cada grupo. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo I (controle tumoral), e ### $p < 0,001$ em relação ao grupo IV (droga padrão - doxorrubicina).

Em relação ao peso dos tumores avaliado após remoção destes, os tumores dos animais que receberam abrina acrescida de galactose e que receberam doxorubicina foram os que apresentaram menor peso, enquanto que os que receberam galactose foram os de maior peso (**Tabela 1**).

Tabela 1: Peso dos tumores após eutanasia dos animais e extração.

Grupos	Peso (g)
I	1,08 ± 0,11
II	0,83 ± 0,23
III	0,39 ± 0,18
IV	0,91 ± 0,25
V	2,75 ± 0,93

Valores expressos em média ± desvio padrão correspondendo ao peso de tumores de 5 animais de cada grupo.

5.3- Análise da angiogênese pelo sistema de gradação por microscopia (MAGS)

Quando se analisou macroscopicamente os tumores pertencentes aos grupos experimentais, observou-se que esses tem tendência a serem elípticos podendo crescer aderindo ao músculo na perna ou de forma isolada, ou seja, invadindo-o ou sem penetrar a fáscia muscular. Observou-se grande quantidade de vasos sanguíneos na parte externa dos tumores. No interior dos tumores foram observadas regiões centrais de coloração mais escura (arroxeadas) formando-se cavidade contendo líquido escuro nos tumores maiores.

Microscopicamente, observou-se que o tumor é um tumor invasivo, tendo ele invadido tecido adiposo, muscular estriado e vascular (veias). Os grupos I e II (controle tumor e abrina, respectivamente) apresentaram tecido linfóide invadido pelo tumor. Todos os grupos, exceto os grupos abrina e doxorubicina apresentaram

padrão de infiltrado inflamatório do tipo crônico com intensidade moderada, nos grupos abrina e doxorubicina, alguns tumores apresentaram padrão misto e outros crônicos, sendo de intensidade leve a moderada. Os tumores apresentam área central com intensa necrose (**Figura 4**).

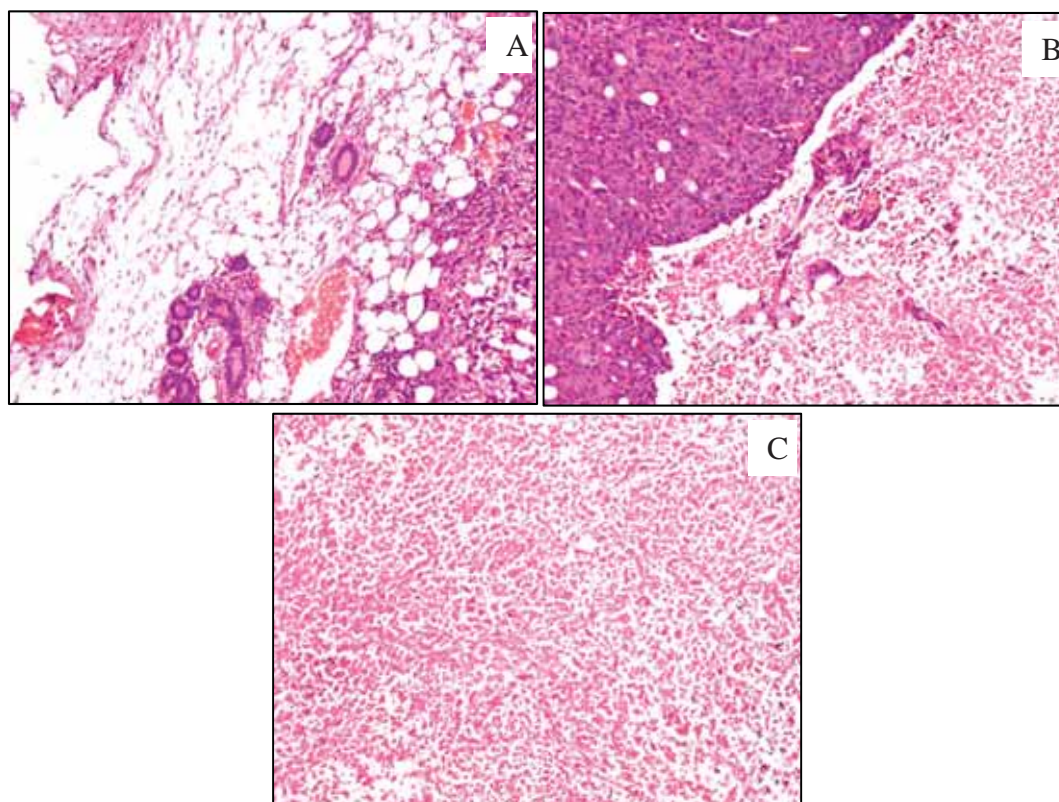


Figura 4: Microscopia tumoral. Regiões capsular (A), intermediária (B) e central (C) dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H/E) dos tumores, aumento de 10x.

Em relação ao grau de angiogênese dos tumores, observou-se que todos os grupos tratados apresentaram menor grau que o grupo controle do tumor (PBS-grupo I), exceto o grupo tratado com abrina 7,5µg/kg acrescida de galactose 0,2 M (grupo IV) que apresentou maior grau ($p < 0,001$). O grupo tratado com abrina não apresentou diferença estatística em relação ao grupo da droga padrão - doxorubicina, o mesmo não ocorrendo com o grupo abrina 7,5µg/kg acrescida de galactose 0,2 M (grupo IV) (**Figuras 5 e 6**).

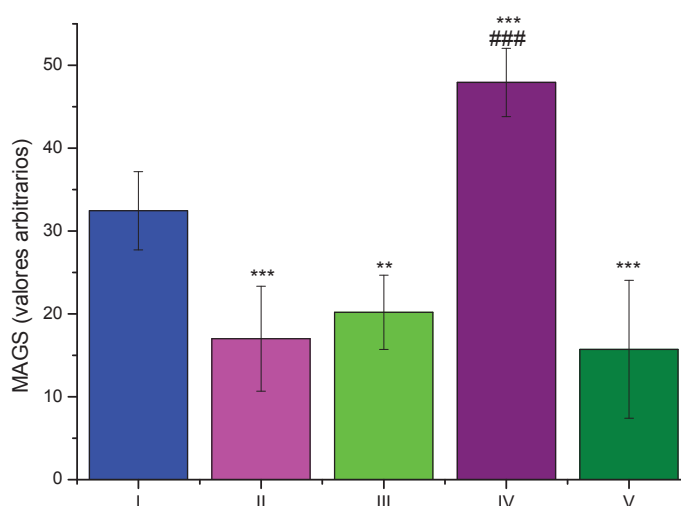


Figura 5: Gradação para angiogênese nos tumores por microscopia (MAGS). Os tumores de animais do grupo PBS - controle tumor (I), abrina 7,5µg/kg (II), doxorubicina 6mg/kg (III), abrina 7,5µg/kg acrescida de galactose 0,2 M (IV), galactose 0,2 M (V). O grau de angiogênese foi determinado em lâminas coradas com hematoxilina e eosina através do Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS). Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em valores arbitrários, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de tumor de 3 animais de cada grupo de estudo. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo I (controle tumoral), e ### $p < 0,001$ em relação ao grupo III (droga padrão - doxorubicina).

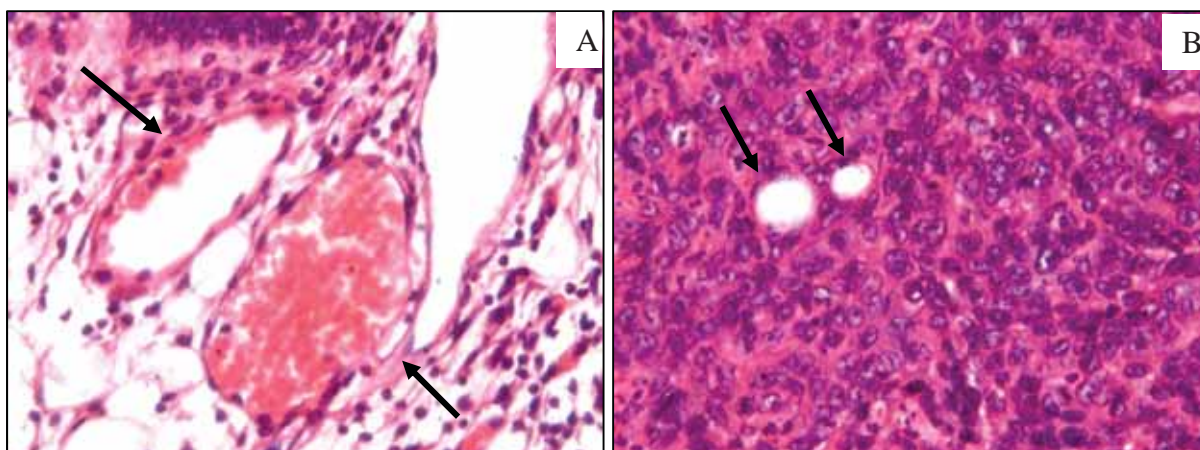


Figura 6: Avaliação da angiogênese tumoral. Fotos ilustrativas de grandes vasos (A) e pequenos vasos (B) na área capsular do tumor obtidas de tumores corados com hematoxilina e eosina (H/E), aumento de 100x.

5.4- *Determinação de células produtoras de citocinas em cortes histológicos do tumor*

Para identificação de células produtoras de citocinas no microambiente tumoral por imunohistoquímica utilizando o método estraptavidina-peroxidase, foram utilizados anticorpos anti-mouse produzidos em coelho contra as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , e anti-humano TGF- α . Assim as células positivas, que apresentaram coloração castanha, foram contadas em 10 campos por lâminas, sendo avaliadas 2 lâminas por grupo experimental. Como controle negativo da reação foram utilizadas lâminas escolhidas aleatoriamente, que foram submetidas somente ao anticorpo secundário.

Com base nos dados referentes a determinação de IL-2 nos tumores observamos que todos os grupos apresentaram-se negativos para esta citocina na área do tumor.

Em relação a IL-4, pode-se observar que não houve células positivas na área do tumor na maioria dos grupos. Somente o grupo doxorrubicina apresentou citoplasma de células com morfologia sugestiva de macrófagos marcado

positivamente para IL-4 no tecido conjuntivo peritumoral, sendo de 3 a 5 células nos 10 campos analisados.

Referente a análise de células positivas para IL-6, que todos os grupos foram negativos no ambiente tumoral, mas todos apresentaram moderada quantidade de células positivas (10 a 30 células em 10 campos) com morfologia sugestiva de macrófago.

Em relação a células positivas para IL-10, o grupo abrina foi o único grupo a apresentar uma leve marcação na região do tumor. No tecido conjuntivo peritumoral, todos os grupos apresentaram quantidade moderada de células positivas (10 a 30 células em 10 campos) com morfologia sugestiva de macrófago, exceto os grupos que receberam tratamento com galactose ou doxorubicina.

Todos os grupos apresentaram tumores sem células marcadas para as citocinas IFN- γ e TNF- α . Sendo que o grupo que recebeu tratamento com PBS, apresentaram duas células marcadas fortemente em 10 campos analisados para ambas as citocinas.

Em relação às células positivas para TGF- α , todos os grupos não apresentaram células marcadas na região tumoral, exceto uma das lâminas do grupo que recebeu tratamento com abrina acrescida de galactose que apresentou fraca marcação no tumor, mas com células tumorais fortemente marcadas. No tecido conjuntivo peritumoral, os grupos que receberam tratamento com abrina, ou doxorubicina, ou PBS apresentaram menos de 10 células positivas nos 10 campos analisados, porém o grupo que recebeu abrina acrescida de galactose apresentou moderada marcação, apresentando uma média de 20 células positivas em 10 campos analisados. As células do tecido conjuntivo que apresentaram marcação para esta citocina apresentam características morfológicas sugestivas de macrófagos e fibroblastos, embora no grupo controle tumoral, células endoteliais foram marcadas positivamente.

As lâminas que foram utilizadas como controle negativo, ou seja, que só receberam o anticorpo secundário, não apresentaram marcação positiva.

5.5- Viabilidade celular de macrófagos em presença das substâncias em estudo

Os macrófagos obtidos dos animais dos diferentes grupos experimentais foram re-expostos às substâncias utilizadas no tratamento deles, com exceção do grupo que recebeu PBS, cujos macrófagos foram expostos a todas as substâncias estudadas. O teste de citotoxicidade tem como objetivo comprovar a viabilidade celular dos macrófagos cultivados em presença das substâncias em estudo nas concentrações usadas nos demais testes imunológicos.

Observou-se que nos grupos testados, as concentrações escolhidas mostraram viabilidade celular satisfatória para a realização dos demais testes imunológicos. Ao contrário do resultado *in vivo*, *in vitro* a presença de galactose não afetou significativamente e de forma clara a citotoxicidade de abrina em macrófagos **(Figura 7)**.

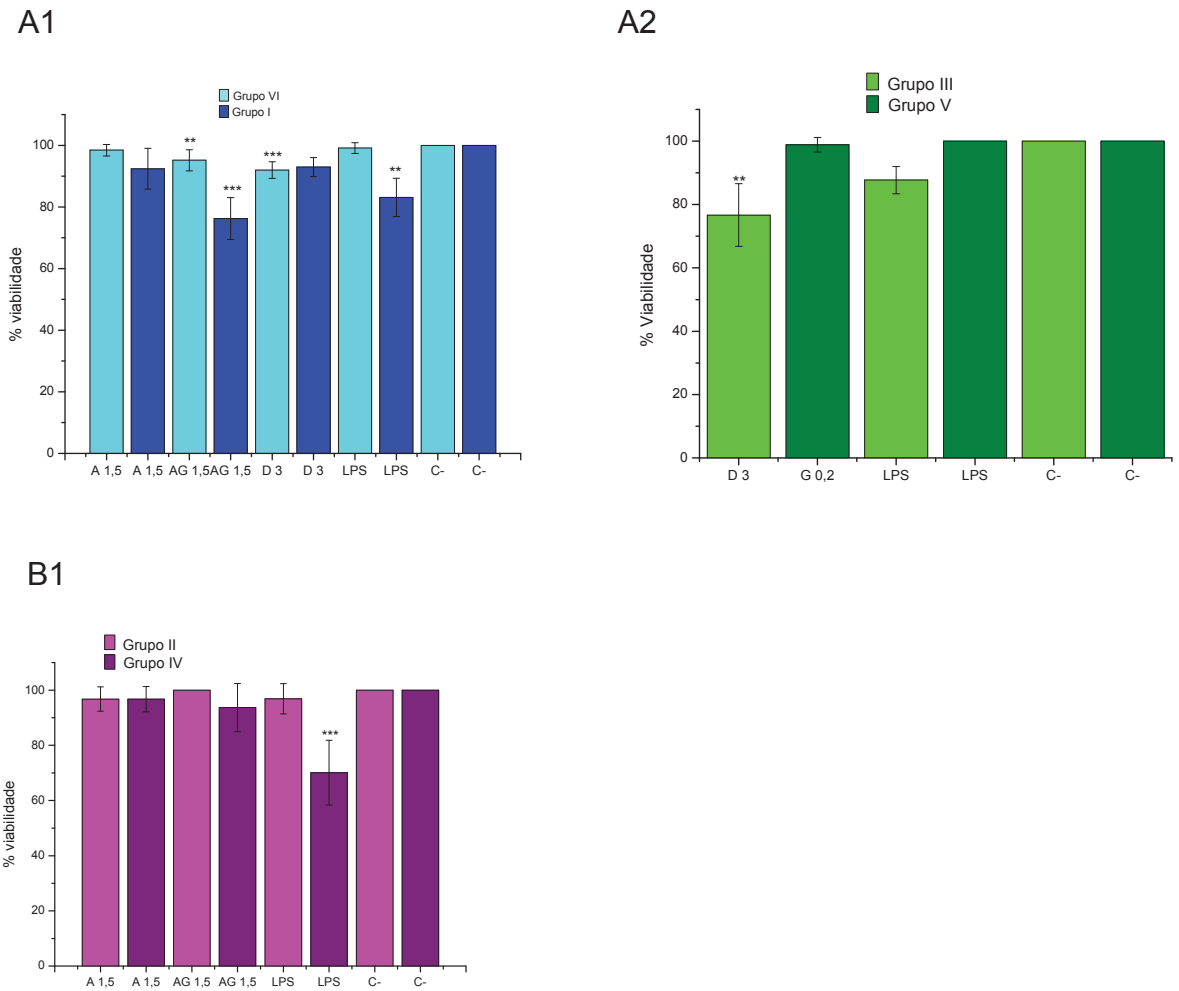


Figura 7: Viabilidade celular de macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos em presença das substâncias em estudo. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3µg/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Como controle positivo (LPS) foi utilizado lipopolissacarídeo 10µg/ml, e controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C), o que corresponde a 100% de viabilidade celular. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. ** p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado com o controle negativo.

5.6- Viabilidade celular de linfócitos esplênicos em presença das substâncias em estudo

Os linfócitos obtidos dos animais dos diferentes grupos experimentais foram re-expostos às substâncias utilizadas no tratamento deles, com exceção do grupo que recebeu PBS, cujos macrófagos foram expostos a todas as substâncias em estudo. O teste de citotoxicidade tem como objetivo comprovar a viabilidade celular dos linfócitos cultivados em presença das substâncias em estudo nas concentrações usadas nos demais testes imunológicos.

Na figura 8, pode-se observar que a viabilidade celular dos linfócitos expostos às concentrações utilizadas na obtenção de sobrenadante para dosagem de citocinas foi satisfatória.

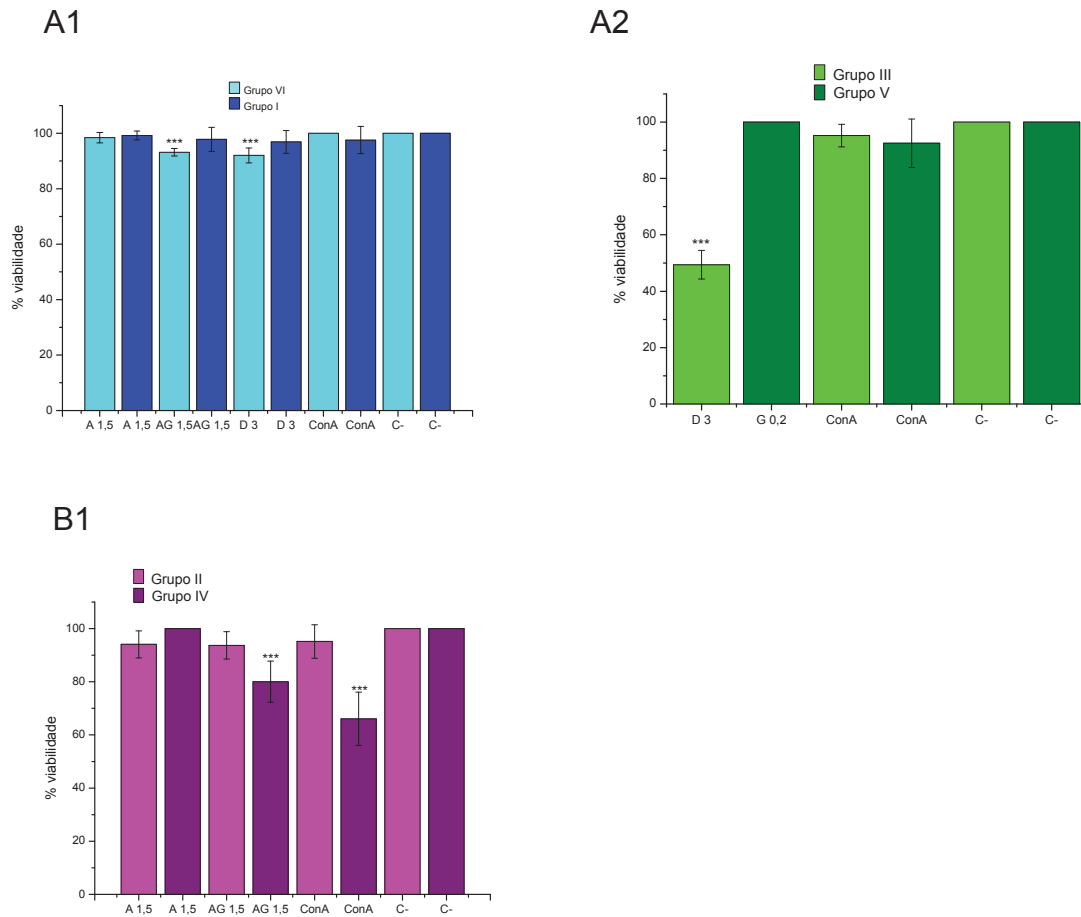


Figura 8: Viabilidade celular de linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos em presença das substâncias em estudo. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorrubicina 3µg/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Como controle positivo (ConA) foi utilizado Concanavalina A 0,5µg/ml, e controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C), o que corresponde a 100% de viabilidade celular. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. ***p<0,001 quando comparado com o controle negativo.

5.7- Viabilidade celular de células tumorais (LM3) em presença das substâncias em estudo

Para avaliar a citotoxicidade *in vitro* das substâncias em teste em cultura de células de adenocarcinoma de mama murino (LM3), foram feitas culturas de 24 e 48h de duração. Foram realizados 3 experimentos isoladamente em triplicata para cada concentração testada das substâncias em estudo.

Observou-se que a substância que apresentou menor IC₅₀ em cultura de 24h foi doxorrubina, seguida de abrina, enquanto que em cultura de 48h foi abrina, seguida de doxorrubicina. Quando abrina foi acrescida de galactose, o valor de IC₅₀ foi aproximadamente dez vezes superior que o dela isoladamente. Observou-se, também que foi necessária uma concentração significativamente menor de todas as substâncias para inibir em 50% o crescimento das células tumorais numa cultura de 48 horas. (**Tabela 2**). Quando as células tumorais foram cultivadas em presença de solução de β-D-galactose 0,2 M, houve uma viabilidade celular de 76,64 ± 5,8 em 24 horas e 45,8 ± 8,1 em 48 horas de cultura.

Tabela 2: Valores de IC₅₀ das substâncias para as células LM3 após 24 e 48h de cultura

IC ₅₀ (ng/ml)	24h	48h
Abrina	62,3 ± 1,0	5,0 ± 4,7
Abrina/galactose	723,7 ± 2,7	92,8 ± 0,7
Doxorrubicina	50,2 ± 2,5	31,8 ± 7,5

Foram realizados 3 experimentos isoladamente em triplicata. Valores expressos em média ± desvio padrão.

5.8- Caracterização fenotípica de macrófagos, subpopulações de linfócitos, células NK e células dendríticas

As células dendríticas obtidas por diferenciação de células de medula óssea foram cultivadas juntamente com abrina na presença ou ausência de β -D-galactose, ou doxorubicina por 24 horas. Após este período as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD11c, anti-CD80, anti-CD86, anti-A-I/E-I conjugados a fluorocromos.

As substâncias em estudo não apresentaram alteração significativa da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e moléculas de MHC classe II, que participam na regulação de apresentação de antígenos e na ativação de células T, o que sugere que as substâncias não possuem a capacidade de ativar células dendríticas (**Tabela 3**).

Tabela 3: Percentual de expressão de receptores celulares em células dendríticas diferenciadas expostas às substâncias em estudo por 24h

Substância	% CD11c	% CD11c MHC II	% CD11c CD80	% CD11c CD86
Abrina	51,9 \pm 0,14	36,7 \pm 2,69	34,3 \pm 2,83	9,55 \pm 0,92
Abrina/galactose	50,45 \pm 0,49*	35,65 \pm 0,92	35,45 \pm 1,48	8,7 \pm 0,0
Doxorrubicina	49,7 \pm 1,56*	36,95 \pm 0,78	38,35 \pm 0,21	10,50 \pm 0,28
LPS	47,3 \pm 0,28**	45,75 \pm 0,07*	55,35 \pm 2,47***	28,45 \pm 0,07***
RPMI-1640	55,10 \pm 0,00	39,6 \pm 0,0	39,4 \pm 0,0	11,1 \pm 0,0

Os experimentos foram realizados em triplicata utilizando citômetro de fluxo FACS Canto, BD Immunocytometry System. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao RPMI-1640 (controle negativo)

Células do exsudato peritoneal obtidas dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram marcadas com os anticorpos anti-CD11b, anti-CD54, anti-CD80 e anti-CD86 conjugado a fluorocromos e analisadas em citômetro de fluxo.

Em nenhum dos grupos experimentais portadores de tumor tratados com as substâncias em estudo houve aumento estatisticamente significativo da expressão de CD11b em relação ao grupo controle de animais normais e ou ao grupo controle do tumor, o grupo II (abrina) apresentou uma forte diminuição do percentual dessas células em relação aos dois grupos controle ($p < 0,001$). Em relação às células CD11b⁺CD54⁺, somente o grupo II (abrina) apresentou uma leve diminuição no percentual destas células em relação aos grupos controle. Todos os grupos portadores de tumor tratados com as substâncias em estudo tiveram um aumento significativo no percentual de células CD11b⁺CD80⁺ e CD11b⁺CD86⁺ em relação aos animais normais (grupo VI). Os grupos II, III e V apresentaram uma diminuição significativa ou não significativa no percentual de CD11b⁺CD86⁺ em relação ao grupo I (controle tumor). O grupo IV (abrina acrescida de galactose) apresentou aumento significativo de células CD11b⁺CD80⁺ ($p < 0,001$) em relação ao grupo I. O grupo tratado com galactose (grupo V) apresentou redução significativa do percentual das células CD11b⁺CD80⁺ ($p < 0,001$) e não significativo de CD11b⁺CD86⁺ ($p > 0,05$) em relação ao grupo I.

Tabela 4: Percentual de expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão em células peritoneais CD11b⁺ obtidas dos diferentes grupos experimentais

Grupos	% CD11b	% CD11b CD54	% CD11b CD80	% CD11b CD86
I	60,9 ± 4,2	22,6 ± 1,9	12,1 ± 0,9	14,6 ± 3,4
II	39,2 ± 1,4 ^{####*}	20,6 ± 1,8	9,0 ± 1,8 ^{####*}	8,0 ± 1,4 ^{###*}
III	59,2 ± 2,8*	23,8 ± 0,6	13,7 ± 1,2 ^{***}	12,7 ± 1,2 ^{***}
IV	61,9 ± 2,0	30,2 ± 0,2 ^{####*}	17,9 ± 0,6 ^{####*}	15,5 ± 0,4 ^{***}
V	55,8 ± 1,6*	23,6 ± 0,2	7,6 ± 0,3 ^{####*}	11,9 ± 0,2 ^{***}
VI	68,5 ± 3,7	23,1 ± 1,4	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,6

Os experimentos foram realizados em citômetro de fluxo FACS Canto, BD Immunocytometry System utilizando 5 animais por grupo. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao grupo VI (animais normais); ## p<0,01 e ### p<0,001 em relação ao grupo I (controle tumor). Os experimentos foram realizados pelo menos três (3) vezes.

Células esplênicas obtidas dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram marcadas com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-NK1.1 e anti-Foxp3 para determinar as subpopulações de linfócitos T, anti-NK1.1 para determinar células NK, e anti-CD11c, anti-I-Ad/I-Ed (MHC II), anti-CD80 e anti-CD86 para determinar células dendríticas, sendo estes anticorpos conjugados a fluorocromos.

Observou-se que o grupo II foi o único grupo a apresentar uma redução significativa de células CD11c⁺ em relação ao grupo controle do tumor (grupo I), sendo o único que apresentou redução de células CD11c⁺CD80⁺ e CD11c⁺CD86⁺, sendo esta última não significativa. Contudo no tratamento de abrina acrescida de galactose, houve aumento significativo das populações CD11c⁺, CD11c⁺CD80⁺ e CD11c⁺CD86⁺ em relação ao grupo tratado com abrina (grupo II). O grupo III apresentou, aumento não significativo de células CD11c⁺CD80⁺ e de células CD11c⁺CD86⁺. O tratamento com galactose apresentou aumento de células CD11c⁺, CD11c⁺MHCII⁺, CD11c⁺CD80⁺ e CD11c⁺CD86⁺ em relação ao controle do tumor (grupo I) (**Tabela 5**).

Tabela 5: Percentual de expressão de moléculas co-estimulatórias em células esplênicas CD11c⁺ obtidas dos diferentes grupos experimentais

Grupos	% CD11c	%CD11c MHC II	% CD11c CD80	% CD11c CD86
I	4,0 ± 0,6	90,9 ± 5,1	20,5 ± 1,4	21,5 ± 1,2
II	1,7 ± 0,3 ^{###***}	97,0 ± 0,4	10,2 ± 1,8 ^{###***}	18,3 ± 0,9 ^{**}
III	3,1 ± 0,1 ^{***}	90,2 ± 3,0	27,5 ± 4,8 ^{***}	21,7 ± 6,1
IV	3,1 ± 0,5 ^{***}	92,5 ± 1,0	26,6 ± 1,5 ^{***}	27,4 ± 1,4
V	4,2 ± 0,9 ^{**}	94,4 ± 1,8	23,4 ± 0,8 ^{***}	27,9 ± 4,3
VI	6,4 ± 0,5	91,5 ± 4,2	50,7 ± 3,6	30,5 ± 2,2

Os experimentos foram realizados em citômetro de fluxo FACS Canto, BD Immunocytometry System utilizando 5 animais por grupo. ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao grupo VI (animais normais); ### p<0,01 em relação ao grupo I (controle tumor). Os experimentos foram realizados pelo menos três (3) vezes.

Todos os grupos de animais portadores de tumor tiveram percentual de CD25+Foxp3⁺ muito superior ao grupo VI (animais normais). Os grupos II, IV e V tiveram um suave aumento de células T CD4⁺, porém de forma não significativa em relação ao grupo I, enquanto que o grupo III teve uma redução significativa em relação a este grupo. Todos os grupos tiveram redução não significativa de células CD25+Foxp3⁺ em relação ao grupo I com exceção do grupo IV que apresentou aumento do percentual dessas células. O grupo III foi o único que apresentou aumento significativo de células T CD8⁺ em relação ao grupo I (**Tabela 6**).

Tabela 6: Percentual de expressão de receptores celulares em células esplênicas CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e Treg obtidas dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	% CD3	% CD3 CD4	% CD3 CD8	% Foxp3 CD25
I	16,1 ± 1,7	68,4 ± 1,4	25,2 ± 1,9	0,3 ± 0,1
II	6,8 ± 0,2 ^{####}	68,7 ± 0,7	22,6 ± 0,3*	0,1 ± 0,1
III	11,4 ± 1,6 ^{####}	60,8 ± 1,2 ^{####}	31,0 ± 2,5 ^{##}	0,1 ± 0,1 [#]
IV	7,7 ± 1,0 ^{####}	68,8 ± 2,3	22,5 ± 0,7*	0,4 ± 0,1 ^{###}
V	8,2 ± 1,5 ^{####}	68,7 ± 0,6	26,0 ± 1,1	0,2 ± 0,1
VI	26,1 ± 1,1	65,7 ± 0,6	27,6 ± 1,6	0,0 ± 0,0

Os experimentos foram realizados em citômetro de fluxo FACS Canto, BD Immunocytometry System utilizando 5 animais por grupo. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao grupo VI (animais normais); # p<0,05, ## p<0,01 e ### p<0,001 em relação ao grupo I (controle tumor). Os experimentos foram realizados pelo menos três (3) vezes.

Todos os grupos apresentaram redução significativa ou não do percentual de células NK (células NK1.1+) em relação ao grupo I (controle tumor). Os grupos tratados com abrina acrescida de galactose ou somente galactose apresentaram aumento não significativo ou igual percentual de células NKT (CD3+NK1.1+) em relação ao grupo I (**Tabela 7**).

Tabela 7: Percentual de expressão de receptores celulares em células esplênicas NK1.1⁺, CD3⁺ NK1.1⁺ obtidas dos diferentes grupos experimentais

Grupos	% NK1.1	% CD3 NK1.1
I	1,0 ± 0,4	0,4 ± 0,1
II	0,3 ± 0,0 [#]	0,2 ± 0,1 ^{**}
III	0,3 ± 0,0 [#]	0,2 ± 0,1 ^{**}
IV	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1
V	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1
VI	0,57 ± 0,2	0,87 ± 0,6

Os experimentos foram realizados em citômetro de fluxo FACS Canto, BD Immunocytometry System utilizando 5 animais por grupo. ** p<0,01 em relação ao grupo VI (animais normais); # p<0,05 em relação ao grupo I (controle tumor). Os experimentos foram realizados pelo menos três (3) vezes.

5.9- *Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos estimulados com as substâncias em estudo*

Os macrófagos obtidos dos animais dos diferentes grupos experimentais foram re-expostos às substâncias utilizadas no tratamento deles, com exceção do grupo que recebeu PBS, cujos macrófagos foram expostos a todas as substâncias em estudo. O Zimozan foi utilizado como controle positivo e somente tampão fosfato completo para H₂O₂, como controle negativo.

Após 24 horas de incubação, as substâncias testadas não induziram em macrófagos níveis significantes de peróxido de hidrogênio, com exceção de abrina 1,5 ng/ml e abrina 1,5 ng/ml acrescida de galactose 0,2M no grupo II (**Figura 9**).

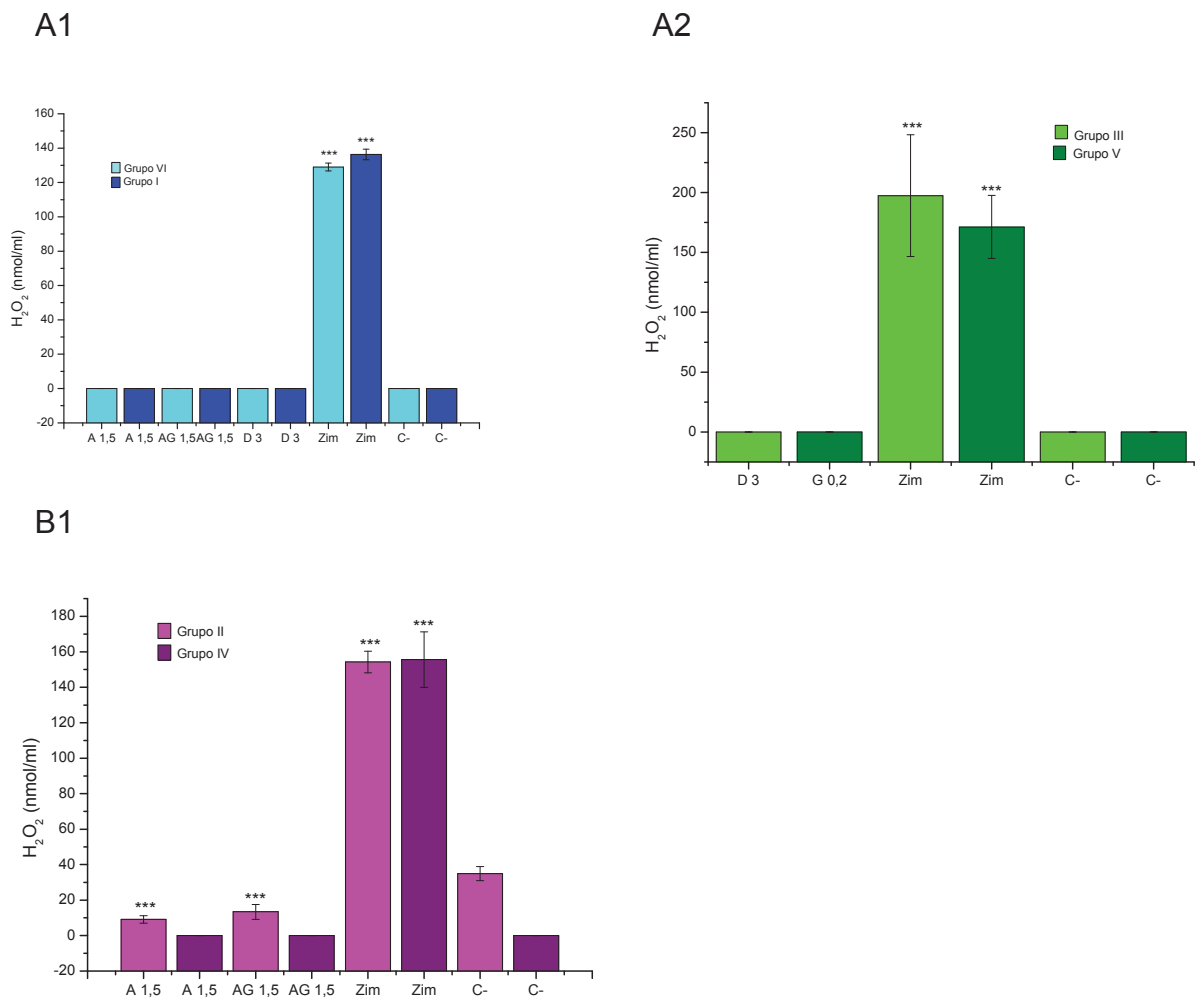


Figura 9: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3µg/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Solução de Zimozan 5mg/ml foi utilizada como controle positivo (Zim). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (Solução completa para H₂O₂). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. *** p<0,001 quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

5.10- Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos e células dendríticas estimulados com as substâncias em estudo

Os macrófagos obtidos dos animais dos diferentes grupos experimentais foram re-expostos às substâncias utilizadas no tratamento deles, com exceção do grupo que recebeu PBS, cujos macrófagos foram expostos a todas as substâncias em estudo. As células dendríticas obtidas após diferenciação com IL-4 e GM-CSF foram cultivadas na presença de abrina, na presença ou ausência de β -D-galactose, ou doxorrubicina. O LPS foi utilizado como controle positivo e somente meio de cultura celular RPMI-1640-C, como controle negativo.

Após 24 horas de incubação, abrina 1,5 ng/ml e doxorrubicina 3 μ g/ml induziram níveis significativos de óxido nítrico no grupo VI ($p < 0,001$), sendo que somente abrina acrescida de galactose induziu produção significativa de NO no grupo I ($p < 0,001$). Nos demais grupos não houve produção significativa de NO pelas substâncias testadas (**Figura 10**). Em relação às células dendríticas, as substâncias em estudo não induziram níveis significantes de NO ($p > 0,05$) (**Tabela 8**)

Tabela 8: Produção de óxido nítrico em cultura de células dendríticas expostas às substâncias em estudo.

Substância	[NO] μ mol/2 x 10 ⁵ células
Abrina	4,10 \pm 0,65
Abrina/galactose	3,39 \pm 0,29
Doxorrubicina	1,60 \pm 2,19
LPS	10,22 \pm 0,42
RPMI-1640-completo	4,09 \pm 0,45

Foram realizados 3 experimentos isoladamente em triplicata. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

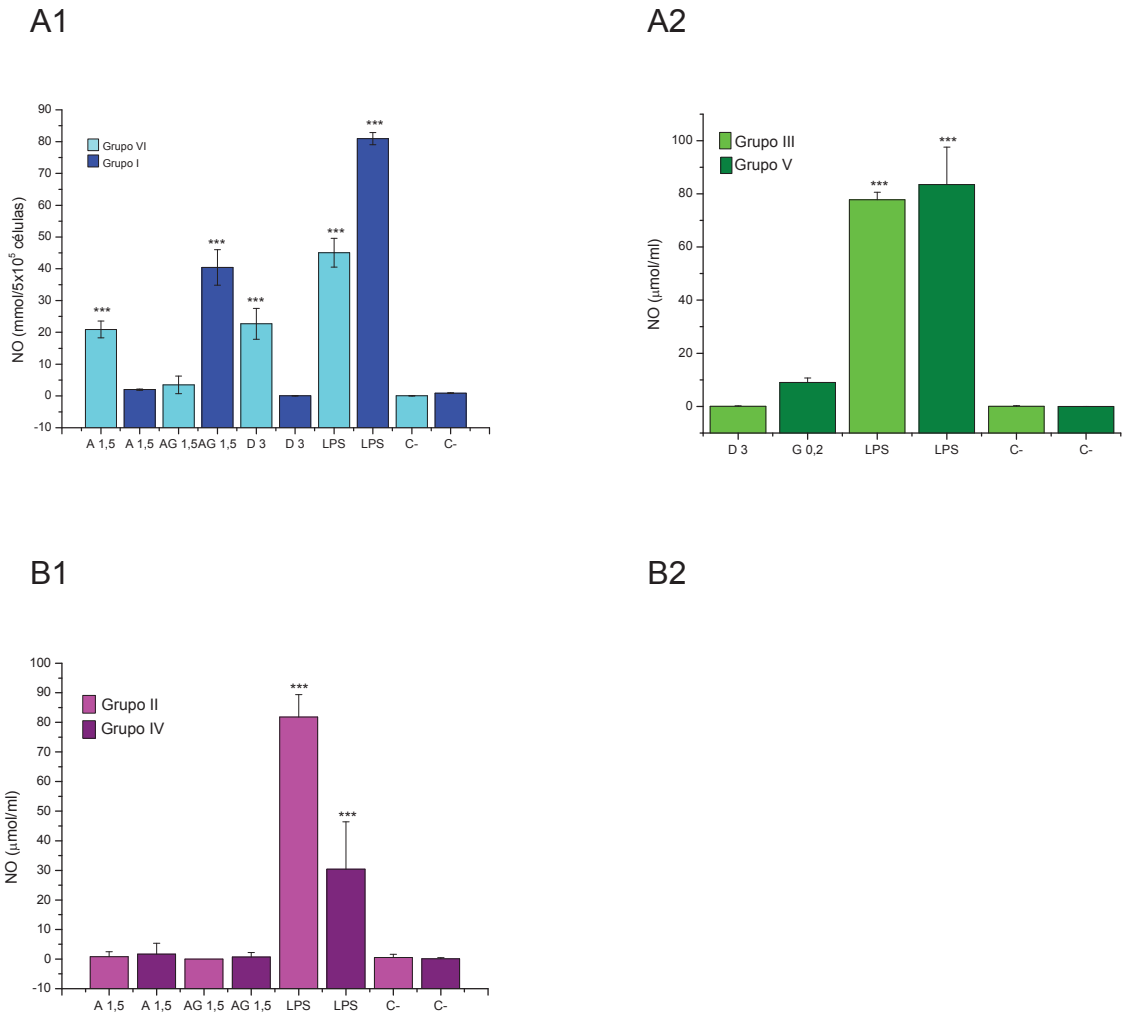


Figura 10: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 e são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3µg/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Solução de LPS 10µg/ml foi utilizada como controle positivo (LPS). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. *** p<0,001 quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

5.11- Determinação de citocinas

As células dendríticas obtidas após diferenciação com IL-4 e GM-CSF foram cultivadas na presença de abrina na presença ou ausência de β -D-galactose, ou doxorrubicina por 24 horas. O LPS foi utilizado como controle positivo e somente meio de cultura celular RPMI-1640-C, como controle negativo. As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e TGF- β foram dosadas no sobrenadante de cultura através da técnica ELISA.

Observou-se que abrina induziu uma alta produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10, sendo que quando acrescido de galactose houve uma significativa redução na produção de IL-1 β e IL-10, mas aumento de TGF- β . E, em relação à doxorrubicina, ela induziu moderada produção de IL-1 β , alta de IL-6, e teve uma produção significativamente reduzida de TGF- β ($p < 0,001$), similar a produzida por abrina acrescida de galactose. Não houve produção significativa de IL-12 estimulada por nenhuma das substâncias em estudo em relação às células cultivadas somente em meio de cultura (**Figura 11**).

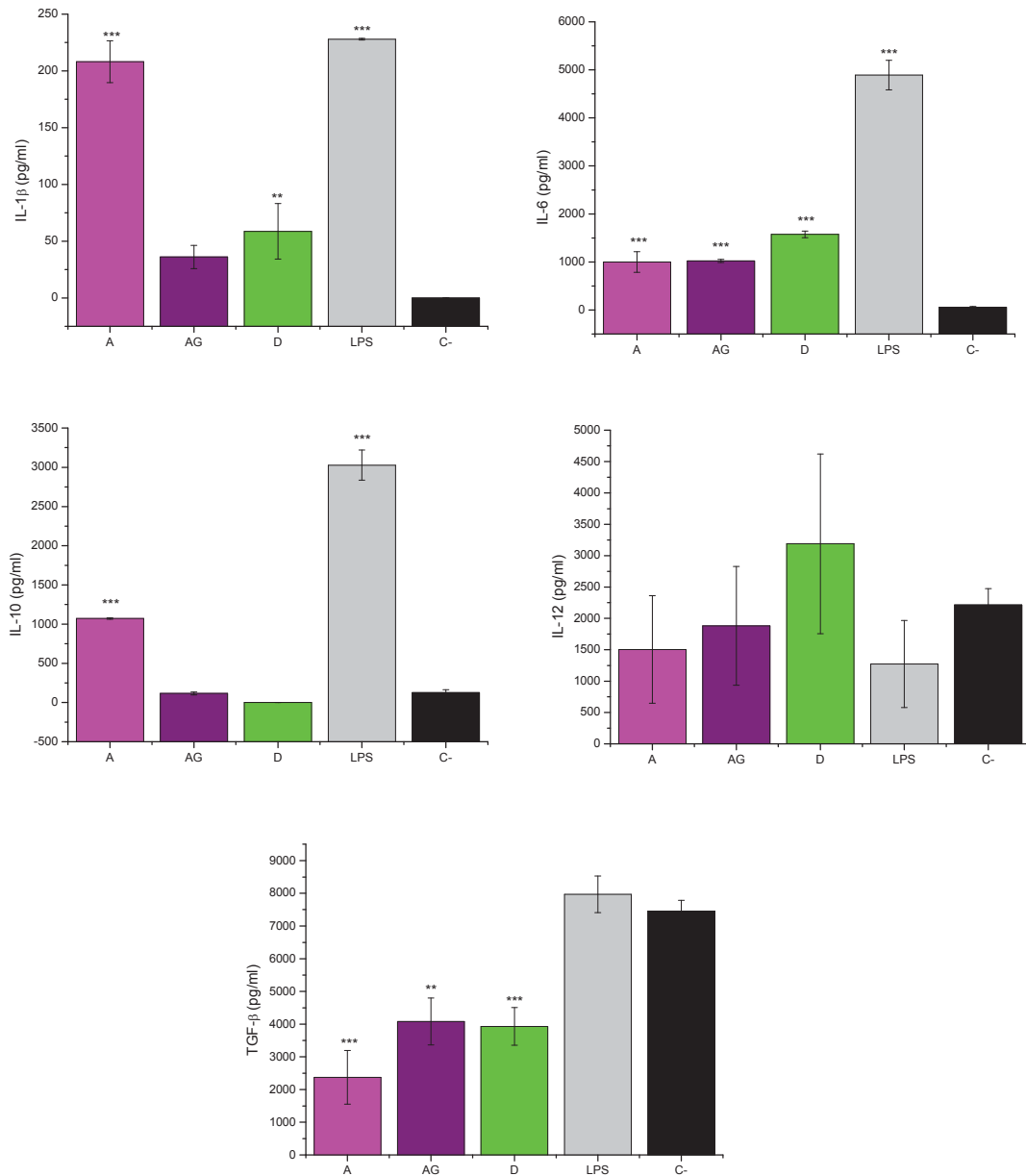


Figura 11: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 (p40) e TGF- β por células dendríticas expostas às substâncias em estudo. Sendo A (abrina 25ng/ml), AG (abrina 25ng/ml acrescida de galactose 0,2M) e D (doxorrubicina 30 μ g/ml). Como controle positivo (LPS) foi utilizado lipopolissacarídeo 10 μ g/ml, e controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. ** p<0,01 e *** p<0,001 quando comparado ao controle negativo.

Os macrófagos obtidos dos animais dos diferentes grupos experimentais foram re-expostos as substâncias utilizadas no tratamento deles, com exceção do grupo que recebeu PBS e animais normais, cujas células foram expostas a todas as substâncias em estudo. O LPS foi utilizado como controle positivo de macrófagos, e somente meio de cultura celular RPMI-1640-C, como controle negativo.

Observou-se que, em relação à produção de IL-1 β , no grupo I, abrina e abrina acrescida de galactose 0,2M tiveram uma leve e moderada produção ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente); no grupo VI, abrina teve uma moderada produção ($p < 0,01$) e abrina acrescida de galactose teve uma menor ($p < 0,05$) que somente com RPMI-completo ($p < 0,001$); no grupo II, abrina e abrina acrescida de galactose 0,2M tiveram uma alta produção de IL-1 β ($p < 0,001$); no grupo III, doxorrubicina induziu uma produção significativa de IL-1 β ($p < 0,001$) em relação às células em cultura com RPMI-completo; nos demais grupos as substâncias em estudo não induziram produção de IL-1 β significativa (**Figura 12**).

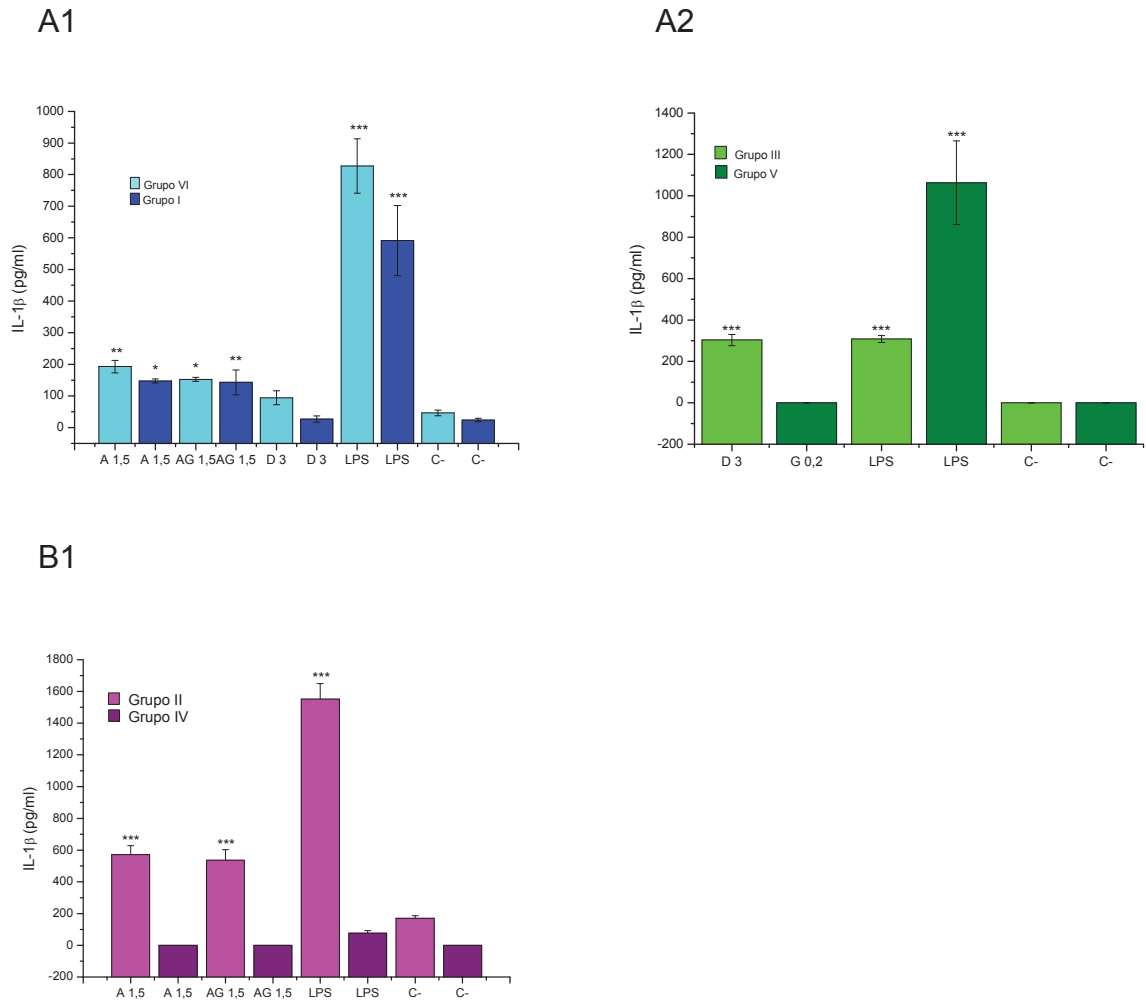


Figura 12: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 é o grupo experimental (Abrina - Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3 μ g/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Solução de LPS 10 μ g/ml foi utilizada como controle positivo (LPS). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001, quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

Pode-se observar que no grupo VI doxorrubicina teve produção de IL-6 significativamente menor ($p < 0,05$) que quando somente na presença de meio de cultura; nos grupos I, abrina acrescida de galactose teve significante produção de IL-6 ($p < 0,001$) similar a quando as células foram estimuladas com LPS (**Figura 13**).

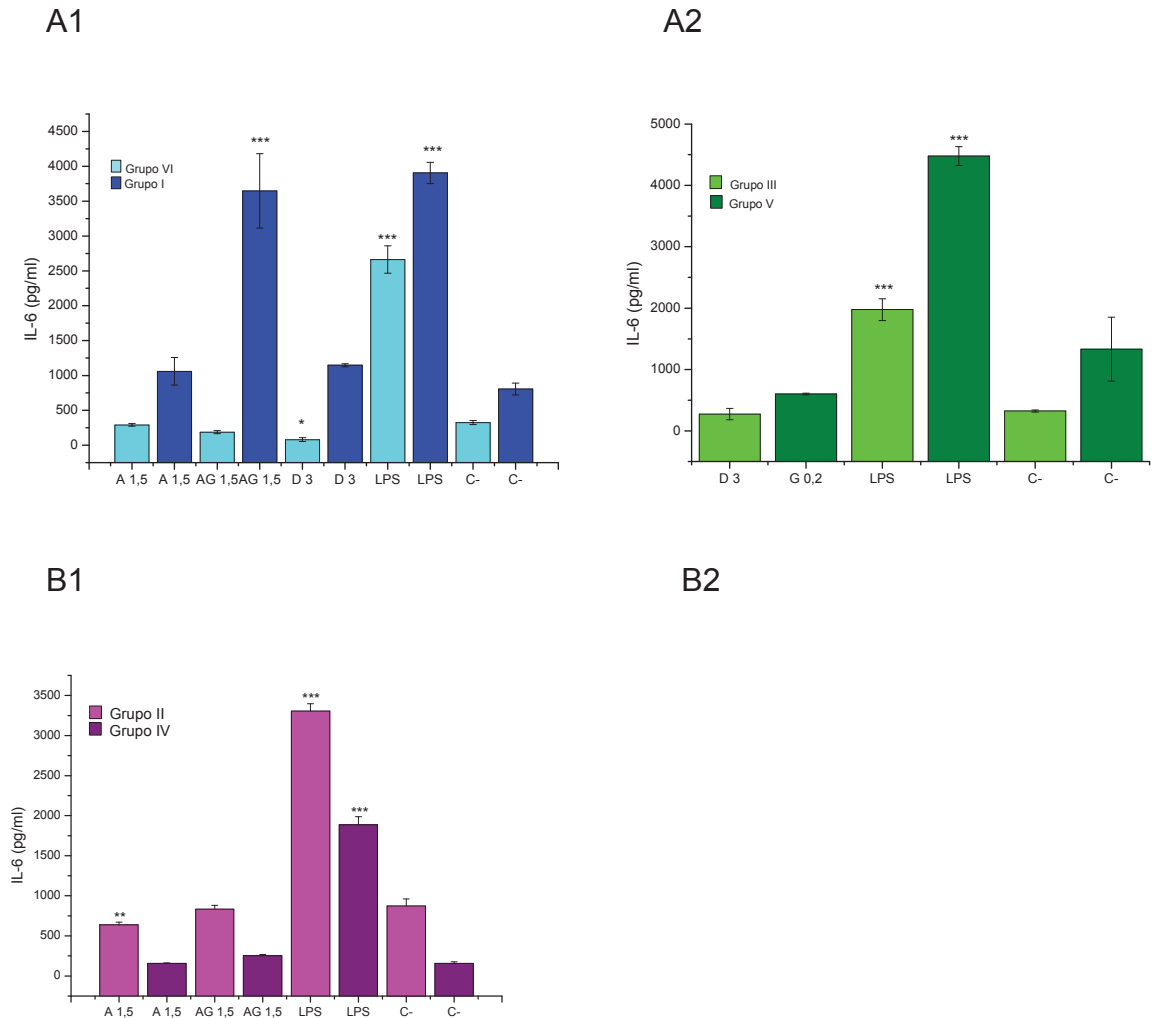
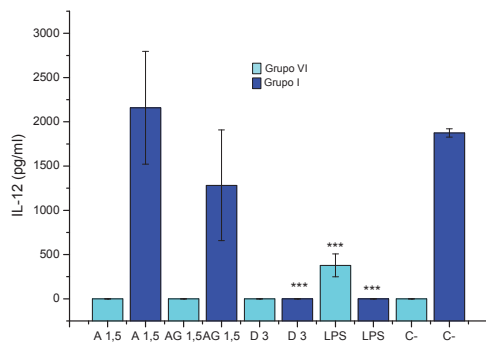


Figura 13: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-6 por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 são os grupos experimentais (Abrina - Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3µg/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Solução de LPS 10µg/ml foi utilizada como controle positivo (LPS). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

Em relação à produção de IL-12, no grupo I, as células em presença somente de RPMI-c teve uma alta produção de IL-12, sendo que todas as substâncias tiveram produção menor com exceção de abrina 1,5ng/ml que teve uma produção similar. No grupo VI (animais normais) nenhuma das substâncias induziu a produção desta citocina. Nos grupos III e V não houve produção de IL-12 nem quando as células foram estimuladas com LPS. O grupo II todas as substâncias testadas e o controle negativo tiveram alta produção de IL-12, sendo que abrina 1,5ng/ml e abrina 1,5 ng/ml acrescida de galactose 0,2 M tiveram produção significativamente menor que as células em presença somente de meio RPMI-c (**Figura 14**).

A1



B1

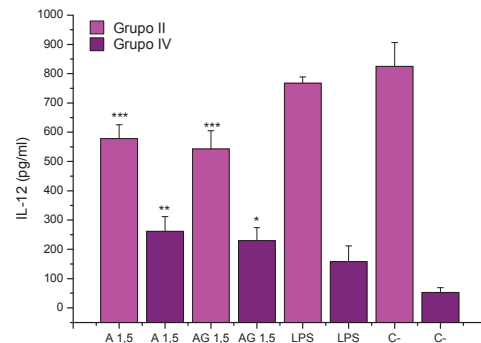


Figura 14: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-12(p40) por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e B1 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Abrina - Abrina/galactose, respectivamente). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), e D3 (doxorubicina 3µg/ml). Solução de LPS 10µg/ml foi utilizada como controle positivo (LPS). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

Em relação à produção de TNF- α , nos grupos I e VI, abrina apresentou leve a moderada produção desta citocina ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). No grupo II abrina e abrina acrescida de galactose induziram produção significativamente maior que células em presença de meio RPMI ($p < 0,001$). As substâncias nos demais grupos experimentais não foram capazes de induzir a produção da citocina a nível significativo. (**Figura 15**).

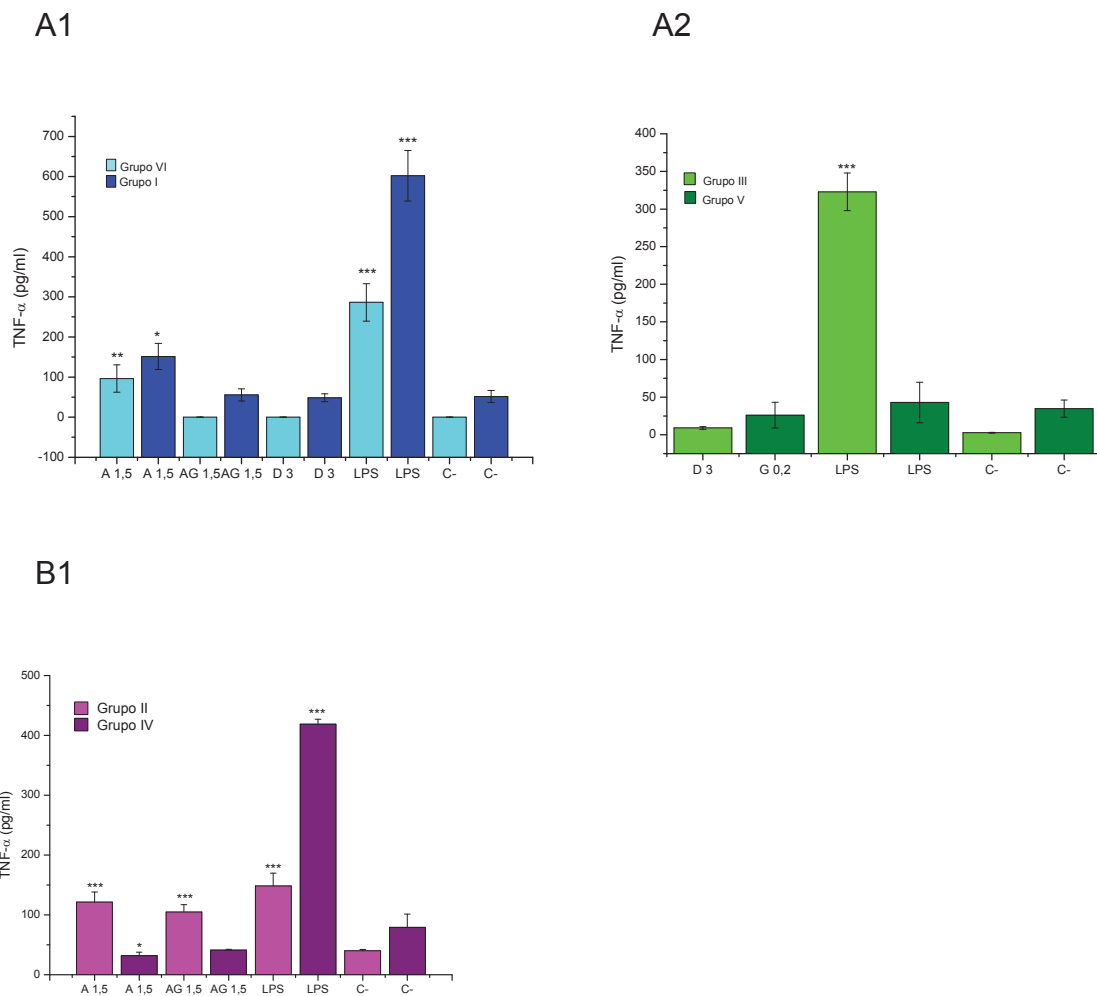


Figura 15: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 são os grupos experimentais (Abrina - Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3 μ g/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Solução de LPS 10 μ g/ml foi utilizada como controle positivo (LPS). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. * p<0,05, **p<0,01 e *** p<0,001 quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

Em todos os grupos testados, os macrófagos peritoneais mantiveram a capacidade de responder ao efeito estimulante da produção IL-1 β , IL-6 e TNF- α induzido por LPS, com exceção do grupo V, onde não houve resposta ao efeito estimulante do LPS sobre a produção de TNF- α .

As células esplênicas obtidas dos animais dos diferentes grupos experimentais foram re-expostas as substâncias utilizadas no tratamento deles, com exceção do grupo que recebeu PBS e animais normais, cujas células foram expostas a todas as substâncias em estudo. A Concanavalina A foi utilizada como controle positivo de linfócitos, e somente meio de cultura celular RPMI-1640-C, como controle negativo.

No grupo I, somente abrina induziu produção de IL-4 de forma significativa ($p < 0,01$); no grupo VI, abrina acrescida de galactose e doxorrubicina tiveram menor produção que somente na presença de RPMI-completo ($p < 0,001$); no grupo III, doxorrubicina induziu uma significativamente maior produção de IL-4 que células em presença de RPMI-c ($p < 0,001$); nos grupos II, IV e V não houve produção significativa por nenhuma das substâncias testadas (**Figura 16**).

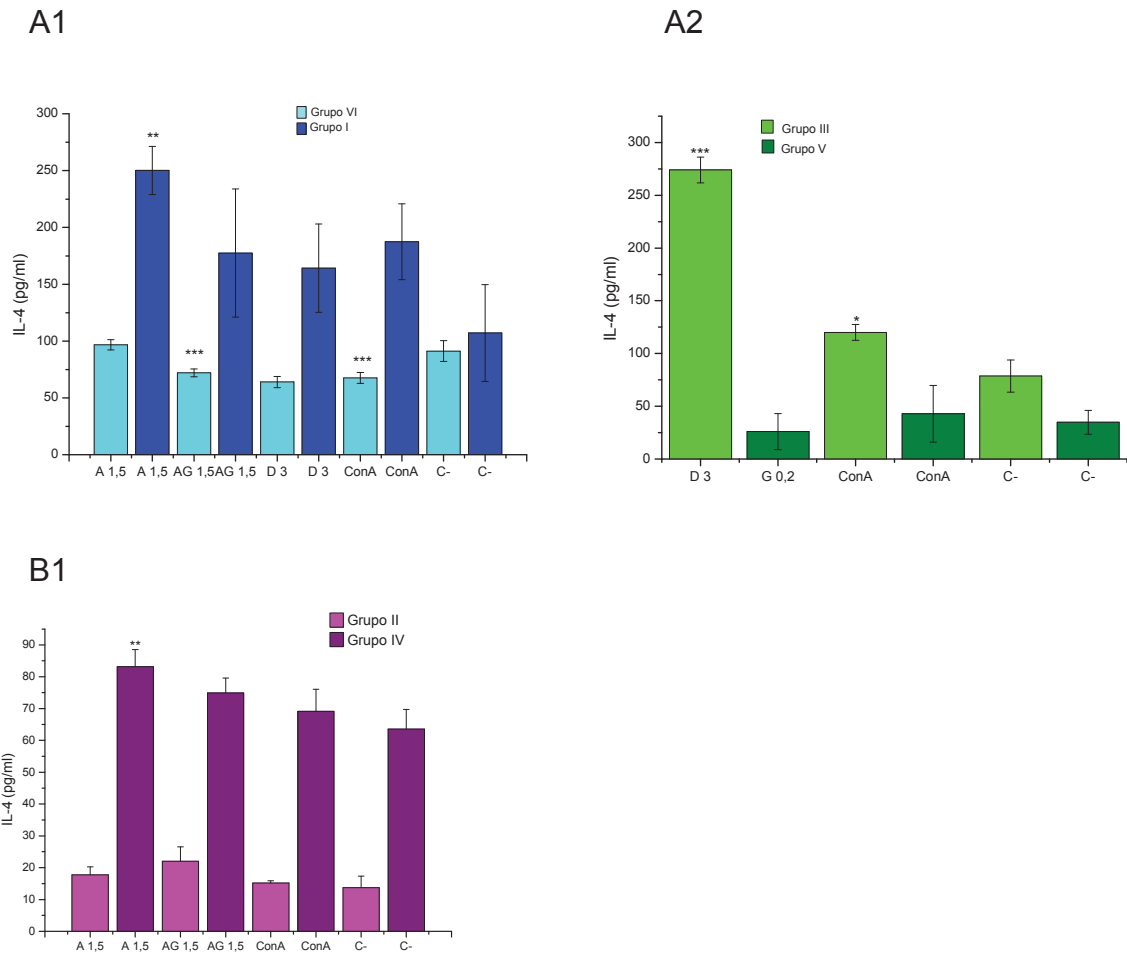


Figura 16: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-4 por linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3 μ g/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Solução de Concanavalina A 0,5 μ g/ml foi utilizada como controle positivo (ConA). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

Referente à produção de IL-10, somente no grupo I, as células responderam ao estímulo provocado pela Concanavalina A de forma significativamente maior que as células em presença de RPMI-c. Além disso, pode-se observar que, no grupo I, abrina acrescida de galactose 0,2M apresentou alta produção ($p < 0,001$). No grupo II e V, abrina e abrina acrescida de galactose não estimularam a produção de IL-10 de forma significativamente maior que células em meio de cultura. No grupo III, doxorrubicina estimulou uma produção levemente maior de IL-10 que células em presença de meio de cultura ($p < 0,05$). No grupo V a galactose não induziu maior produção de IL-10 do que as células em meio de cultura (**Figura 17**).

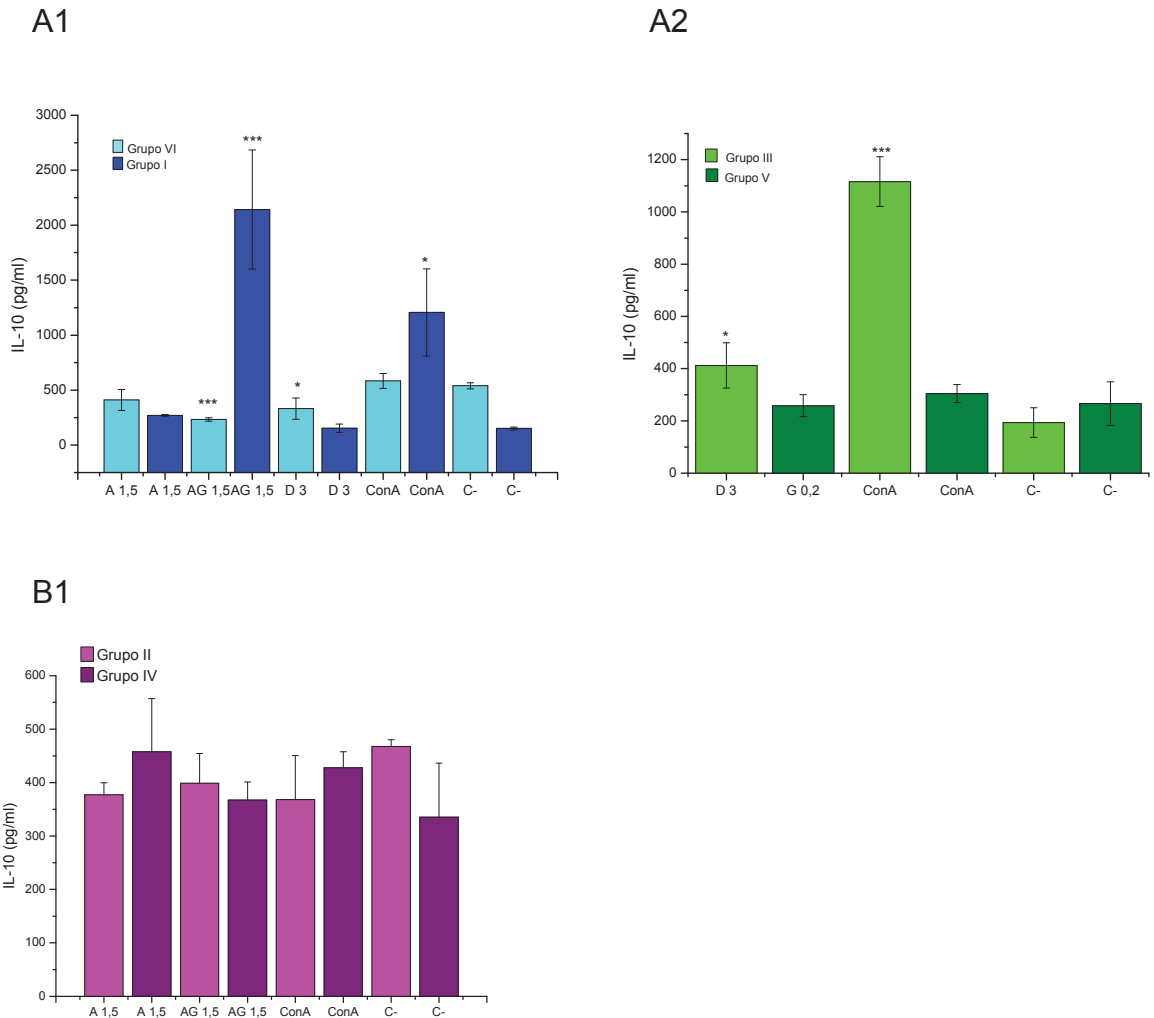


Figura 17: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-10 por linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3µg/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Solução de Concanavalina A 0,5µg/ml foi utilizada como controle positivo (ConA). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

No grupo I, todas as substâncias em estudo induziram uma alta a leve produção de IFN- γ , com exceção da doxorubicina. No grupo VI, abrina e abrina acrescida de galactose estimularam leve a alta produção de IFN- γ ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) que células em RPMI-c. No grupo II, somente abrina apresentou alta produção de IFN- γ ($p < 0,001$) e as células não responderam ao efeito estimulante de concanavalina A. No grupo III, doxorubicina estimulou alta produção desta citocina ($p < 0,001$). Nos demais grupos as substâncias em estudo não estimularam a produção significativa de IFN- γ (**Figura 18**).

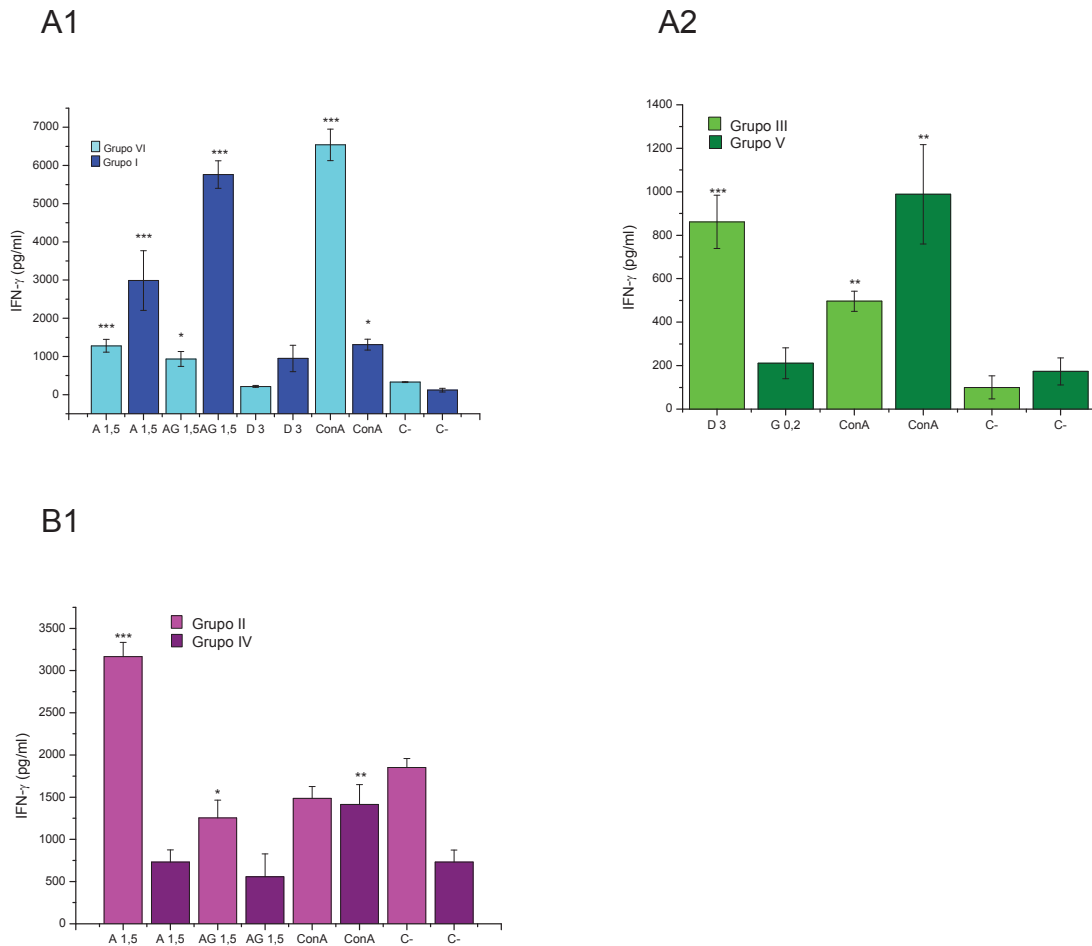


Figura 18: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IFN- γ por linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3 μ g/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Solução de Concanavalina A 0,5 μ g/ml foi utilizada como controle positivo (ConA). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05 quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

Observou-se, em relação à produção de TGF- β , que nos grupos II, III, IV, V e VI, as substâncias testadas não estimularam a produção de TGF- β de forma significativamente maior que os controles negativos (RPMI-completo) pertencentes aos respectivos grupos. (**Figura 19**).

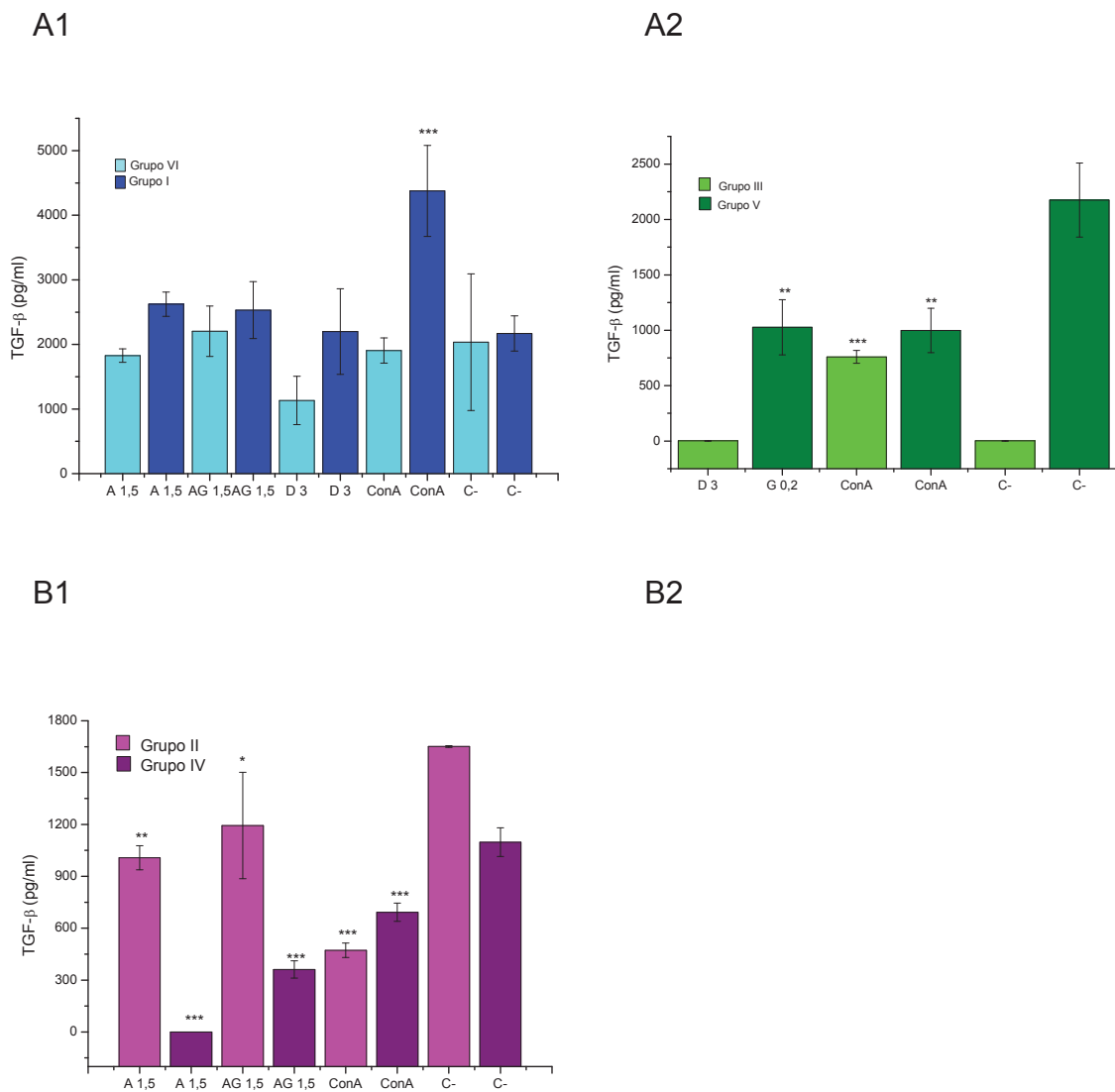


Figura 19: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de TGF-β por linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos. A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3μg/ml), e G0,2 (galactose 0,2M). Solução de Concanavalina A 0,5μg/ml foi utilizada como controle positivo (ConA). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05, quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

5.12- Determinação de apoptose e necrose pelas metodologias TUNEL e Anexina V

Células peritoneais e células esplênicas obtidas de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram testadas quanto a apoptose inicial ou tardia pelas técnicas Anexina V e TUNEL, respectivamente.

Em relação a apoptose, através da técnica de Anexina V, observou-se que o percentual de células peritoneais apoptóticas dos animais pertencentes ao grupo controle tumoral foi levemente menor que o percentual de células dos animais normais. O percentual de células peritoneais apoptóticas dos grupos tratados com abrina ou abrina acrescida de galactose foi superior ao valor de todos os grupos exceto o grupo V (galactose). Em relação ao percentual de células esplênicas apoptóticas, o grupo abrina (grupo II) não apresentou diferença estatística em relação aos grupos I e VI (grupos controle tumoral e animais normais, respectivamente), enquanto que os demais grupos tratados (abrina acrescida de galactose, doxorubicina e galactose) apresentaram percentual maior de células esplênicas apoptóticas.

Em relação a necrose, através da dupla marcação Anexina V e iodeto de propídio, observamos que o único grupo com aumento significativo de células peritoneais em necrose foi o grupo V (abrina acrescida de galactose). Os grupo II e III (abrina e doxorubicina, respectivamente) foram os únicos que apresentaram diminuição significativa estatisticamente do percentual de células esplênicas em necrose (**Figura 20**).

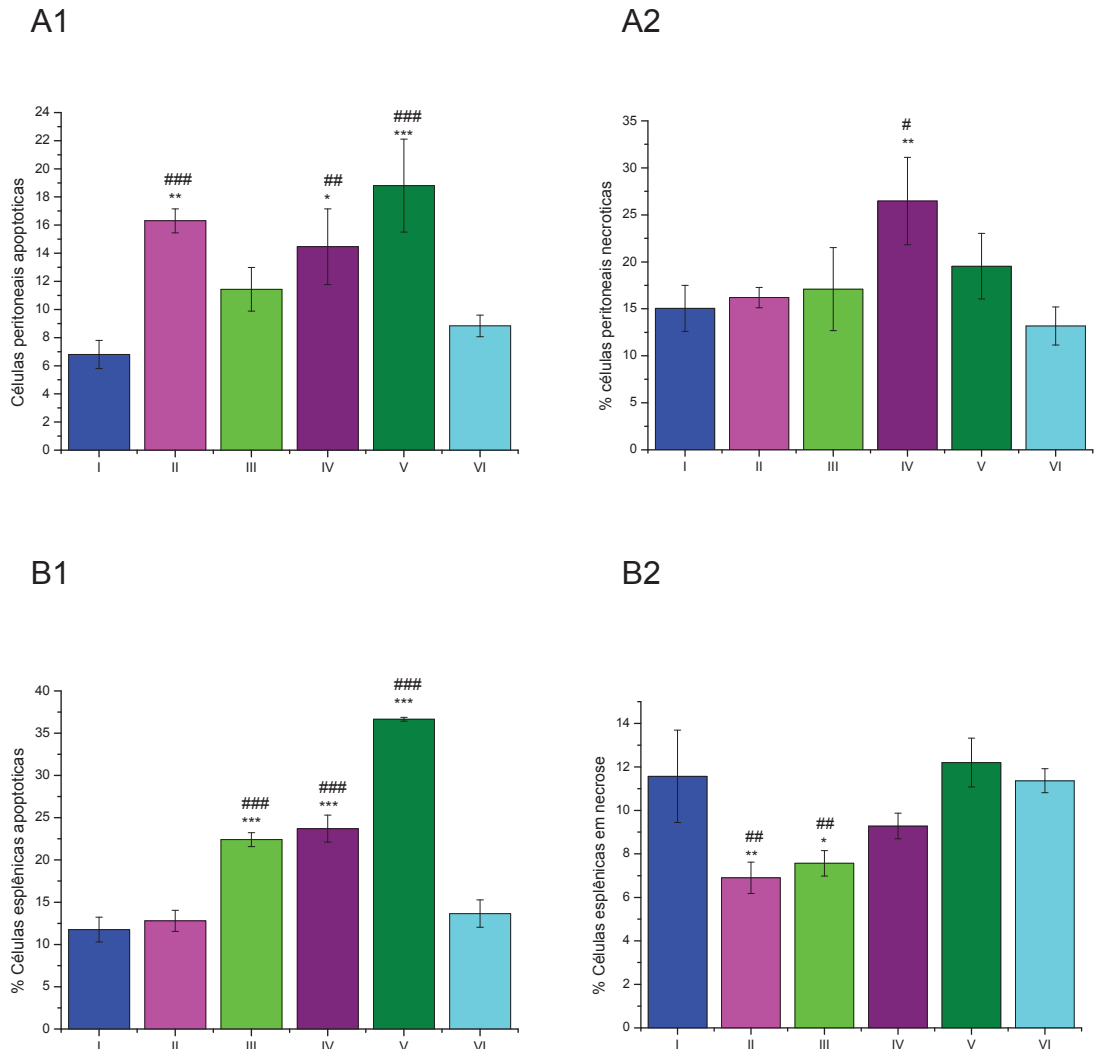


Figura 20: Determinação de células apoptóticas e necróticas pela técnica de Anexina V. A1 e A2 são células peritoneais apoptóticas e necróticas, respectivamente. B1 e B2 são células necróticas apoptóticas e necróticas, respectivamente. As células peritoneais ou esplênicas de animais do grupo PBS - controle tumor (I), abrina 7,5 μ g/kg (II), doxorrubicina 6mg/kg (III), abrina 7,5 μ g/kg acrescida de galactose 0,2 M (IV), galactose 0,2 M (V) e animais normais (VI) foram marcadas usando kit Anexina V (BD Pharmigen) e analisadas em citômetro de fluxo. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05, quando comparado ao grupo animais normais (grupo VI) e ### p<0,001, ## p<0,01, # p<0,05, quando comparado ao grupo controle tumor (PBS - grupo I).

Os resultados encontrados quando se pesquisou o percentual de células peritoneais e esplênicas em apoptose, pela técnica de TUNEL, mostrou que todos os grupos apresentaram maior percentual de células peritoneais em apoptose que de células esplênicas. Todos os grupos de animais portadores de tumor tratados com as substâncias estudadas apresentaram similar ou maior percentual de células peritoneais e esplênicas em apoptose que o grupo VI (animais saudáveis). O grupo II (abrina) apresentou uma leve diminuição de células peritoneais apoptóticas ($p < 0,05$) e um aumento não estatisticamente significativo de células esplênicas apoptóticas ($p > 0,05$) que o grupo I. O grupo III apresentou o maior percentual de células peritoneais em apoptose ($31,1 \pm 1,0\%$) (**Figura 21**).

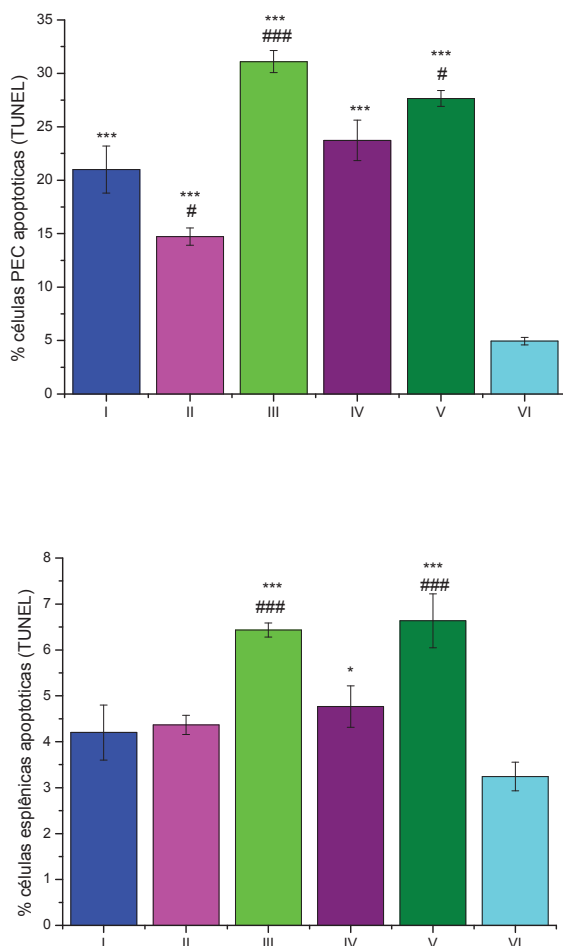


Figura 21: Determinação de células apoptóticas pela técnica de TUNEL. As células peritoneais ou esplênicas de animais do grupo PBS - controle tumor (I), abrina 7,5µg/kg (II), doxorubicina 6mg/kg (III), abrina 7,5µg/kg acrescida de galactose 0,2 M (IV), galactose 0,2 M (V) e animais normais (VI) foram marcadas usando kit Anexina V (BD Pharmigen) e analisadas em citômetro de fluxo. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo animais normais (grupo VI) e #### $p < 0,001$, ### $p < 0,01$, # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle tumor (PBS - grupo I).

6- DISCUSSÃO

Células tumorais são confrontadas com células imunes a cada estágio de malignidade no hospedeiro, no interior do tumor, nas circulações sanguínea e linfática e nas lesões metastáticas. A imunoterapia do câncer tem como objetivo estimular o sistema imune para destruir tumores, p.ex. através do aumento da produção de citocinas e mediadores imunológicos que podem atuar eliminando as células tumorais (VAN GINDERACHTE et al., 2006).

Abrina, proteína inativadora de ribossomos do tipo 2, em presença ou ausência de solução de β -D-galactose 0,2 M e doxorrubicina foram testadas quanto à sua citotoxicidade *in vitro* em células LM3 após 24 e 48 horas de cultura. Na cultura de 24h, doxorrubicina mostrou-se a mais tóxica das substâncias estudadas, contudo em 48h foi a abrina que se mostrou mais tóxica. Quando as células tumorais foram cultivadas em presença de solução de β -D-galactose 0,2 M, esta se mostrou levemente tóxica em cultura de 24 horas e ficando muito tóxica em cultura de 48 horas, ou seja, o açúcar não parece estar promovendo a proliferação das células. Esta leve toxicidade pode ser devido ao efeito da osmolaridade da solução de β -galactose sobre as células, pois utilizou-se uma solução concentrada deste açúcar. Não existem artigos publicados que expliquem o fenômeno, sendo necessários mais estudos para elucidar que mecanismos celulares estão envolvidos na diminuição da citotoxicidade das RIPs estudadas em presença de β -D-galactose em cultura de células tumorais (LM3).

Além disso, avaliamos a capacidade de abrina inibir o crescimento tumoral *in vivo* em modelo mamário murino e a influência da ligação da abrina a resíduos de galactose na resposta antitumoral. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com uma droga padrão (doxorrubicina - 6 mg/kg) e o grupo controle que recebeu somente PBS (solução salina). Abrina na concentração escolhida para o tratamento intratumoral (7,5 μ g/kg) teve uma alta percentagem de inibição do crescimento tumoral (64,62%) sendo esta similar ao da droga padrão (73,18%). Os tumores que foram tratados com abrina acrescida de galactose apresentaram maior tamanho do que aqueles que foram tratados somente com abrina, sugerindo possivelmente que, a presença da galactose inibiu a ação tóxica de abrina sobre as células tumorais e ao mesmo tempo promoveu o crescimento tumoral. Confirmando

os resultados obtidos no teste *in vivo*, quando células LM3 (adenocarcinoma de mama) foram cultivadas em presença de abrina acrescida de galactose, observou-se uma diminuição significativa da citotoxicidade da abrina, ou seja, foi necessária uma maior concentração da proteína para inibir em 50% o crescimento das células.

Complementando estes experimentos, os tumores foram analisados histopatologicamente e observamos em todos os grupos experimentais que o tumor é um tumor invasivo, tendo ele invadido tecido adiposo, muscular estriado e vascular (veias). Os grupos I e II (controle tumor e abrina, respectivamente) apresentaram tecido linfóide invadido pelo tumor. Todos os grupos, exceto os grupos abrina e doxorrubicina apresentaram padrão de infiltrado inflamatório do tipo crônico com intensidade moderada, sendo que nos grupos abrina e doxorrubicina, alguns tumores apresentaram padrão misto e outros crônicos, sendo de intensidade leve a moderada. Segundo pesquisadores, a inflamação crônica contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama através de mecanismos envolvendo ativação crônica da imunidade humoral e infiltração de células T_{H2} e células inflamatórias inatas polarizadas (PIERCE et al., 2009). A presença de neutrófilos no infiltrado inflamatório encontrado nos tumores dos grupos II e III (abrina e doxorrubicina, respectivamente) pode ser um fator contribuinte para o efeito antitumoral dessas drogas pois, de acordo com outros pesquisadores, neutrófilos associados ao tumor fornecem proteção anti-metastática por eliminar células tumorais disseminadas (GRANOT et al., 2011).

Pesquisadores tem mostrado mais interesse no estudo da participação de células inflamatórias no câncer de mama tanto pelo aumento do entendimento de seu papel no desenvolvimento do tumor como pelo aumento da habilidade de diferenciar entre os tipos celulares. As células dendríticas são sentinelas do sistema imune executando papel essencial na resposta imune através do processamento e apresentação de antígenos às células T CD4⁺ virgens, do controle da ativação de células T CD8⁺ citotóxicas, da produção de imunoglobulinas pelas células B, e em alguns casos a tolerância pelas células T (SMITH et al., 2004). Avaliou-se o nível de ativação de células dendríticas diferenciadas de células da medula óssea obtida de animais saudáveis pelas substâncias em estudo através da avaliação de percentual destas células expressando moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e moléculas do MHC II (A-I /E-I) por citometria de fluxo e da dosagem de óxido nítrico em sobrenadante de cultura utilizando reagente de Griess. Observou-se que as

substâncias em estudo diminuíram a expressão destas moléculas de superfície de forma não significativa em relação às células controle, o que se sugere que as substâncias não possuem a capacidade de ativar células dendríticas, os resultados de produção de NO confirmam este resultado, pois todas as substâncias em estudo não estimularam de forma significativa a produção deste mediador.

Esses dados vão ao encontro dos resultados mostrados por Smith e colaboradores (2004), onde demonstraram que ricina (RIP tipo 2) mesmo sendo capaz de entrar em células dendríticas imaturas, ricina não é capaz de induzir ativação de células dendríticas e nem interferir na maturação destas células induzida por LPS. Além disso, eles também demonstraram que nem as subunidades A e B são capazes de induzir maturação de forma direta ou indireta.

Em relação ao percentual de células dendríticas ativadas obtidas de baço de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, observou-se que somente o grupo II (abrina) apresentou um leve aumento no percentual de células CD11c⁺MHCII⁺ ($p < 0,01$), porém diminuição da percentagem de células CD11c⁺, CD11c⁺CD80⁺ ($p < 0,001$), porém quando foi acrescida galactose, houve um aumento significativo na percentagem de células CD11c⁺, CD11c⁺CD80⁺ e CD11c⁺CD86⁺ com leve diminuição da expressão de MHCII. O tratamento com a droga padrão (grupo III – doxorrubicina) não apresentou alteração significativa no percentual das células dendríticas e na expressão das moléculas de superfície com exceção de CD80, que apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$). O tratamento com galactose não apresentou alteração estatisticamente significativa na expressão das moléculas estudadas, com exceção de CD80, que aumentou ($p < 0,01$) em relação ao grupo I (controle tumor).

Foi observado uma maior diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias pelas células dendríticas dos animais tratados com abrina do que quando células DC diferenciadas foram tratadas com abrina. Provavelmente, a abrina está exacerbando o efeito imunossupressor do tumor sobre ativação das células dendríticas por possuir a mesma característica bloqueadora de ativação de células DC que a ricina.

Outro estudo demonstrou que células hTERT-MUTZ3 após 1-2 meses expostas a 30-90nM de doxorrubicina perderam completamente a capacidade de diferenciar em células de Langerhans, sendo essa perda reversível após 3-4 meses

sem exposição a droga, quando as células tornam-se capazes de ativar células T alogênicas (VAN DE VEN et al., 2011).

Outras células importantes para a resposta imune inata são os macrófagos que são APCs derivadas da medula óssea que podem apresentar antígenos e expressar moléculas co-estimuladoras. Eles participam tanto da imunidade inata como da adaptativa através de diversas atividades, que incluem: fagocitose, produção de agentes microbicidas, secreção de citocinas, processamento de antígenos e apresentação de epítomos aos linfócitos T (MLAMBO & SIGOLA, 2003).

A comunicação celular ocorre por adesão intercelular. Foi reportado que macrófagos expressão as moléculas de adesão ICAM-1 (CD54) e Mac-1 (CD11b) (HAYASHI et al., 2008). O tratamento com abrina, apesar de ter apresentado atividade antitumoral satisfatória, não induziu ativação de macrófagos peritoneais, fato observado pela diminuição da expressão de integrina CD11b, molécula de adesão CD54 e moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86). Porém quando galactose foi acrescida, observou-se fenômeno oposto, com aumento significativo ou não dessas moléculas. Esse aumento da expressão dessas moléculas no tratamento com abrina acrescida de galactose não se repetiu quando os animais foram tratados com galactose, ou seja, galactose não foi a responsável pelo aumento dessas moléculas, sendo necessários mais estudos para elucidar o que causou este aumento. O tratamento com doxorrubicina (grupo III) não apresentou aumento significativo do percentual de macrófagos peritoneais expressando CD11b, CD54 e CD80 ($p > 0,05$), porém apresentou uma leve redução da expressão de CD86 ($p < 0,05$).

A resposta imune a tumores ocorre principalmente por diferentes populações de células T. Estas exercem uma importante resposta imune no crescimento tumoral nos primeiros estágios do câncer, mas tornam-se células T CD4+ e CD8+ reguladoras (Tregs) após estimulação crônica e interação com as células tumorais, dessa forma promovendo mais que inibindo o desenvolvimento e progressão do câncer (LÖFDAHL et al., 2011). O fenótipo ou mesmo a função das células imunes podem variar de acordo com sua localização nos tecidos. Células T podem ser encontradas na circulação, em sítios de inflamação ou residindo em tecidos associados ao sistema imune (Fahmi et al., 2010).

Referente aos resultados encontrados quando pesquisou-se o percentual de células T no baço dos animais, o tratamento com abrina (grupo II) não alterou o

percentual de células T CD4 esplênicas em relação ao controle do tumor (grupo I), porém aumentou células CD3⁺ ($p < 0,001$) e diminuiu células T CD8 citotóxicas e células Treg ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Contudo quando galactose foi acrescida ao tratamento, não houve aumento de células CD3⁺, houve valor similar de células T CD4⁺ e CD8⁺ e houve aumento de células Treg no baço dos animais. O tratamento com galactose (grupo V) não apresentou alterações estatisticamente significativas na percentagem das subpopulações de células T estudadas em relação ao grupo I (controle tumor). O tratamento com a droga padrão (doxorrubicina – grupo III) induziu diminuição do percentual de células CD4⁺ e células Treg ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente), mas levou a um aumento de células T CD8 citotóxicas ($p < 0,001$).

Ramnath, Kuttan e Kuttan (2006) demonstraram que abrina, na concentração de 0,1 ng/50.000 células esplênicas ou timócitos, estimulou a proliferação dessas células diretamente ou juntamente com mitógenos (PHA ou ConA), sendo os resultados comparáveis com mitógenos comumente usados tais como PHA e ConA. Estes resultados talvez expliquem o aumento de células CD3⁺ no baço dos animais portadores de tumor tratados com abrina.

Estudos demonstraram que tratamento intravenoso com doxorrubicina (5 mg/kg) aumentou a razão de células T CD4:CD8 no sangue periférico murino no sétimo dia após o tratamento, porém diminuiu a razão no dia 14. A proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico dos camundongos retornou ao valor inicial após semanas do tratamento com doxorrubicina. Não houve mudanças significativas na razão de células CD4:CD8 no sangue periférico após desafio com doxorrubicina intravenosa. Baseado nesses resultados os pesquisadores concluíram que doxorrubicina intravenosa não aumenta células CD4⁺ e CD8⁺ e não induz alterações proporcionais nas células CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico (PARK et al., 2009). No presente estudo foi observado que o tratamento com a droga padrão (doxorrubicina – grupo III) induziu diminuição do percentual de células CD4⁺ e células Treg ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente), mas levou a um aumento de células T CD8 citotóxicas ($p < 0,001$), contradizendo os resultados observados por Park e colaboradores (2009), talvez isto seja explicado pela mudança na concentração e via de inoculação da doxorrubicina, e o local de obtenção das células.

Células NK compreendem um importante componente da imunidade inata sendo responsáveis pela eliminação de células tumorais e células infectadas por vírus. Estas células eliminam as células-alvo através da liberação de vesículas contendo granzinas e perforinas. Enquanto perforinas formam poros na membrana da célula-alvo, granzinas clivam e ativam caspases na célula alvo resultando em indução de apoptose (KEES, EGEBLAD, 2011). No presente estudo, todos os tratamentos induziram uma diminuição da percentagem de células NK no baço dos animais. Os animais que tiveram galactose na composição do tratamento tiveram percentagem de células NK no baço iguais ou superior ao percentual em animais saudáveis.

Células NKT inariantes são caracterizadas pela expressão de repertório de receptores de antígeno de célula T altamente restrito (TCR) em combinação com marcador de célula NK CD161 (NK1.1). Células iNKT executam um papel crucial em várias respostas imunes, incluindo resposta imune antitumoral. Seu diverso papel regulador nas respostas imunes, sendo tanto inibidor como estimulador, tem sido atribuído a uma aparente flexibilidade dessas células no que diz respeito a seu perfil predominante de citocinas (SCHNEIDERS et al., 2012). O tratamento com abrina ou doxorubicina diminuiu o percentual de células NKT no baço dos animais, contudo quando abrina foi acrescida de galactose ou somente galactose foram usados no tratamento dos animais, esse percentual foi superior ao dos animais do grupo controle de tumor (grupo I).

Macrófagos ativados classicamente (M1) por exposição de IFN- γ possuem atividade tumoricida e provoca reações destrutivas nos tecidos (MANTOVANI, SICA, 2010). Essas células exercem atividades anti-proliferativas e citotóxicas, resultante parcialmente de sua habilidade em secretar espécies reativas do nitrogênio e oxigênio (NO, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio, superóxido) e citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6) (VAN GINDERRACHTER et al., 2006).

Avaliou-se a viabilidade celular de macrófagos e de linfócitos tratados em presença das substâncias nas concentrações que seriam utilizadas nos testes imunológicos propriamente ditos, de forma que se assegurasse a capacidade destas células responderem aos estímulos utilizados mostrando-se viáveis. As substâncias testadas nas concentrações utilizadas nos testes de citotoxicidade em macrófagos e linfócitos obtiveram viabilidade celular satisfatória.

A presença de galactose *in vitro* não afetou significativamente e de forma clara a citotoxicidade de abrina em macrófagos e linfócitos. O que pode ser explicado pelos estudos que demonstraram que a toxicidade das proteínas não depende somente da capacidade da proteína entrar nas células, mas também, ao menos em parte, dos mecanismos de escape da degradação por proteossomas (STIRPE, BATTELLI, 2006). Olsnes e colaboradores (1978) observaram que células HeLa possuíam mais receptores para ricina (1 a 3×10^7) do que para modicina (2×10^5), contudo, a modicina foi muito mais tóxica que a ricina para estas células, o que fez com que concluíssem que a toxicidade não está relacionada com o número de receptores e conseqüentemente à quantidade de proteína que se liga na célula.

Foram estudadas a estimulação da liberação de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais obtidos dos animais pertencentes aos grupos experimentais. O tratamento com abrina acrescida de galactose, ou doxorrubicina não estimulou a produção desses mediadores, contudo quando foi usado abrina houve produção de H_2O_2 sem produção de NO por macrófagos em meio de cultura. Quando se observou a produção estimulada pelas substâncias em estudo, observou-se que abrina e abrina acrescida de galactose estimularam levemente a produção de H_2O_2 em células obtidas de animais do grupo II, porém não houve produção pelas substâncias estudadas nos demais grupos experimentais. No grupo I (controle tumor) somente abrina acrescida de galactose estimulou significativamente a produção de NO, enquanto que no grupo VI (animais saudáveis), somente abrina e doxorrubicina estimularam a produção desse mediador, não ocorrendo produção estimulada pelas substâncias nos demais grupos experimentais.

Pesquisadores mostraram que baixas concentrações de NO induz diferenciação de células T_H1 , mas não de células T_H2 , porém altas concentrações de NO inibem respostas T_H1 e aumenta respostas T_H2 (GAO, 2010). Com base nisso, podemos concluir que os resultados obtidos para produção de óxido nítrico em nosso trabalho são benéficos para resposta antitumoral, pois um perfil imunológico T_H1 é necessário para o combate ao câncer (DISIS, PARK, 2009).

Narayanan, Surolia e Karande (2004) observaram através de seus estudos que abrina induz a produção de ROS, este sendo um efeito da perda do potencial de membrana da mitocôndria desencadeando eventos apoptóticos em células JR4 Jurkat.

Esses dados obtidos no presente estudo sobre produção de NO podem ser correlacionados com os resultados de angiogênese, onde todos os tratamentos estudados mostraram diminuição no grau de angiogênese com significância estatística em relação ao grupo controle do tumor, havendo também diminuição, porém sem relevância estatística, em relação ao grupo tratado com a droga padrão (doxorubicina), com exceção do grupo tratado com abrina 7,5 µg/kg acrescida de galactose 0,2 M que apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) em relação aos demais grupos. Foram observados campos microscópicos em regiões de centro e periferia dos tumores, quando se analisou o grau de angiogênese tumoral. A maioria dos vasos foram encontrados na periferia dos tumores, isto pode ser explicado por estudos utilizando modelo de tumores transplantados similares ao empregado no presente estudo que demonstram ocorrer uma atração de vasos sanguíneos pela liberação de mediadores solúveis fazendo estes vasos crescerem a partir da periferia para o centro do tumor (LIN, POLARD, 2007). Alguns tumores extraídos, principalmente os de maior tamanho apresentaram presença de líquido cístico, provavelmente derivados da necrose e do acúmulo de metabólitos liberados pelas células circundantes, devido o crescimento acelerado sem suporte nutricional adequado.

Citocinas são glicoproteínas sintetizadas por diferentes células principalmente fagócitos mononucleares e linfócitos T ativados quando estimuladas (NICOLINI, CARPI, ROSSI, 2006). Elas são liberadas em resposta a vários estresses celulares, tais como lesão induzida por carcinógeno, infecção e inflamação. Nessas situações, elas agem estimulando a resposta imune para controlar o estresse celular e minimizar os danos celulares. Considerando que o controle efetivo da causa do estresse celular promove a reparação celular, quando não ocorre resolução isto pode levar à produção persistente de citocinas e uma exacerbação da destruição celular. Em vista disso, as reações do hospedeiro ao estresse celular podem causar impacto em vários estágios de formações e progressão tumoral (DRANOFF, 2004).

No presente trabalho foi observado que os grupos I (PBS), II (abrina), III (doxorubicina), IV (abrina acrescida de galactose), V (galactose) e VI (animais normais) apresentaram um predomínio dos perfis de citocinas T_H1 e T_H2 . Em relação à produção de citocinas estimuladas pelas substâncias em estudo por células dendríticas diferenciadas da medula óssea, abrina estimulou a produção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-10) e anti-inflamatória (IL-10), as demais substâncias

estimularam a liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 β e IL-6), e todas as substâncias em estudo diminuíram significativamente a produção de IL-12 e TGF- β exceto doxorrubicina, nas concentrações testadas.

Em relação ao perfil de citocinas encontrado nos tumores pertencentes aos grupos de estudo, o tratamento com abrina aumentou a quantidade de macrófagos positivos para IL-10 e IL-6 no tecido conjuntivo peritumoral; e o tratamento com doxorrubicina não apresentou marcação nas células tumorais ou nas células imunes do conjuntivo peritumoral para as citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ , e diminuiu das citocinas IL-6, IL-10 e TGF- α .

Confirmando os resultados obtidos para determinação de IL-12 em sobrenadante de cultura de células dendríticas em presença de abrina, Smith e colaboradores (2004) demonstraram que ricina, uma proteína pertencente a mesma família, ou suas sub-unidades isoladas não estimularam de forma significativa a produção de IL-12p40 e IL-12p70.

Ramnath, Kuttan e Kuttan (2006) mostraram que animais normais e animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich tratados com abrina 1,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intraperitonealmente apresentaram aumento da citotoxicidade mediada por células NK esplênicas contra células K-562 (células leucêmicas humanas), aumento da citotoxicidade celular dependente de anticorpo e citotoxicidade mediada por complemento dependente de anticorpo pelas células esplênicas obtidas desses animais. Esses resultados podem ser explicados pela capacidade da abrina induzir um aumento significativo da produção de IFN- γ pelas células esplênicas de animais portadores de tumor tratado com abrina, ou com PBS e um leve aumento em células de animais normais, sendo essa produção acompanhada de aumento na produção de IL-12, exceto em animais normais. Estudos explicam que é possível haver produção de IFN- γ sem estimulação por IL-12, ocorrendo quando existe uma grande dose de antígeno com sustentada sinalização TCR e fosforilação da proteína kinase Erk ativada por mitógeno o que resulta em células T_H1 produtoras de IFN- γ via um mecanismo independente de IL-12, enquanto que em baixas doses de antígenos com ativação transitória de Erk1 e Erk2 há favorecimento de respostas T_H2 e secreção de IL-4 (O'GARRA, GABRYSOVÁ, SPITS, 2011).

Em todos os grupos experimentais observou-se tanto produção de IL-10 como de IFN- γ . Em 1990, descobriram-se clones de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 e IFN- γ em fluido de lavagem bronco-alveolar em pacientes com tuberculose aguda.

As células T CD4⁺-IL-10-IFN- γ possuem atividade imunossupressora, mas são diferentes das células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ derivadas do timo, pois são induzidas por antígenos, ou seja, elas são geralmente geradas em um ambiente onde está ocorrendo uma forte estimulação imune e realiza sua função imunossupressora através de IL-10 e com a ajuda de IFN- γ (CHEN, LIU, 2009). Além disso, outros pesquisadores demonstraram que células T ativadas e de memória, ao contrário de células T virgens, parecem ser refratárias aos efeitos de IL-10, o que pode estar relacionado a diminuição do receptor de IL-10 (IL-10R) na ativação de células T (MOCELLIN, MARINCOLA, YOUNG, 2005).

Presume-se que a diminuição da expressão de moléculas de MHC II e co-estimulatórias (CD80 e CD86) pelas células dendríticas esplênicas dos animais portadores de tumor tratados com as substâncias em estudo pode estar relacionada com o aumento da produção de IL-10 pelas células esplênicas desses animais, pois é conhecido que IL-10 impede as propriedades apresentadoras de antígenos de células DC por reduzir sua expressão de moléculas HLA classe II, moléculas de adesão intercelular (ICAM-1/CD54), moléculas co-estimulatórias (CD80/B7-1 e CD86/B7-2) e citocinas T_H1 (IL-12), porém IL-10 não afeta tanto assim a ativação de células T citotóxicas por células DC, pois ela não diminui a expressão de moléculas de HLA class I nestas células, e aumenta a citotoxicidade de células NK em modelos pré-clínicos (MOCELLIN, MARINCOLA, YOUNG, 2005). Além disso, trabalhos demonstraram que IL-10 possui atividade antitumoral quando em grande quantidade, enquanto que em baixas concentrações ela atua promovendo o crescimento tumoral (RAO et al., 2006).

IL-4 e IL-6 são conhecidas por promover o crescimento tumoral por regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas e angiogênicas nas células tumorais (CONTICELLO et al., 2004; CULIG, 2011). IL-4 controla o crescimento celular e regula o sistema imune através da diminuição da atividade celular de células T_H1 e promoção de diferenciação de células T para o fenótipo T_H2, e da indução de apoptose em células endoteliais humanas e monócitos ativados, entre outras (AOUDJEHANE et al., 2007). Contudo, estudos demonstraram que IL-4 exerce um efeito direto sobre as células tumorais aumentando sua sobrevivência, pois esta citocina aumenta proliferação celular em células tumorais PC3 (próstata), MD-MB-231 (mama), A253 (cabeça e pescoço) e SKOV-3 (ovário) sob condições de estresse celular (ROCA et al., 2011). Neste trabalho foi observada uma diminuição de IL-4 e

IL-6 em sobrenadante de cultura nos grupos que receberam abrina ou doxorrubicina por via intratumoral como tratamento, indicando que pode estar havendo uma diminuição da resistência a apoptose pelas células tumorais de mama LM3 e aumento da sobrevivência das células imunes nesses grupos experimentais, contudo no ambiente tumoral, doxorrubicina manteve o percentual de células positivas para IL-4 e reduziu de IL-6, enquanto o tratamento com abrina reduziu IL-4 e aumentou IL-6.

Apoptose é um processo dependente de energia iniciado por uma variedade de estímulos, tanto intercelular como intracelular, no qual células vivas participam de sua própria morte de uma maneira eficiente e organizada. Através da técnica de Anexina V, observou-se uma redução significativa de células esplênicas em apoptose e necrose de animais tratados com abrina ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) ou doxorrubicina ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) em relação ao grupo controle tumoral, enquanto que pela técnica de TUNEL, foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) de células em apoptose no grupo tratado com doxorrubicina, enquanto que abrina apresentou valor similar ou menor que o grupo controle tumor. O tratamento com galactose aumentou o percentual de células esplênicas apoptóticas em ambas as técnicas.

Em vista de todos os resultados obtidos no presente estudo, pode-se observar que o tratamento com abrina apresentou potencial antitumoral similar ao da droga padrão (doxorrubicina), podendo ser um candidato para futuras pesquisas no tratamento de câncer de mama.

7 - CONCLUSÃO

Pela atuação da abrina no sistema imunológico:

- Redução do volume e peso tumoral, no grau de angiogênese tumoral, na apoptose em células imunes do peritônio e baço dos animais, e no percentual de células T reguladoras no baço dos animais;
- Estimulação da produção de citocinas importantes no combate ao câncer (IL-12, IFN- γ) e na expressão de molécula de MHC classe II por células dendríticas no baço dos animais tratados com abrina,

pode-se concluir que a abrina pode ser um candidato ao tratamento contra o câncer de mama murino, com eficácia similar ao da droga padrão, a doxorrubicina.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOUDJEHANE, L.; PODEVIN, P.; SCATTON, O.; JAFFRAY, P.; DUSANTER-FOURT, I.; FELDMANN, G.; MASSAULT, P.P.; GRIRA, L.; BRINGUIER, A.; DOUSSET, B.; CHOUZENOUX, S.; SOUBRANE, O.; CALMUS, Y.; CONTI, F. Interleukin-4 induces human hepatocyte apoptosis through a Fas-independent pathway. **FASEB J.**, v. 21, n. 7, p. 1433-44, 2007.

BAL DE KIER JOFFÉ, E.; PURICELLI, L.; VIDAL, M.C.; LUSTIG, E.S. Characterization of two murine mammary adenocarcinoma tumors with different metastatic ability. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 2, p. 151–160, 1983.

BARBIERI, L.; BATTELLI, M. G.; STIRPE, F. Ribosome inactivating proteins from plants. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1154, p. 237–282, 1993.

BASS, H. W.; O'BRIAN, G.R.; ROBERTS, J.K.; BOSTON, R.S. A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2. **Plant Cell.**, v. 4, p. 225-234, 1992.

BATTELLI, M. G.; CITORES, L.; BUONOMICI, L.; FERRERAS, J. M.; DE BENITO, F. M.; STIRPE, F.; GIRBES, T. Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin. **Arch. Toxicol.**, v. 71, p. 360–364, 1997.

BAUTISTA, G.C.R.; ACOSTA, G.E.; TOLEDO, G.I.I. Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in Vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados/ Evaluation of the MTT to determine in Vitro proliferation of fresh and frozen bovine lymphocytes. **Vet. Mex.**, v. 31, n. 2, p. 101-106, 2000.

BEAUMELLE, ALAMI, M., HOPKINS, C. R. ATP-dependent translocation of ricin across the membrane of purified endosomes. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 23661-23669, 1993.

BISWAS, S.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocytes subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 889-96, 2010.

BREM, S.; CONTRAN, R.; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis : A quantitative method for histologic grading. **J Nat Cancer Inst.**, v. 48, p. 347-356, 1972.

CARNEVALE, R. P.; PROIETTI, C. J.; SALATINO, M.; URTREGER, A.; PELUFFO, G.; EDWARDS, D. P.; BOONYARATANAKORNKIT, V.; CHARREAU, E. H.; JOFFÉ, E. B. K.; SCHILLACI, R.; ELIZALDE, P. V. Progesterone Effects on Breast Cancer Cell Proliferation, Proteases Activation, and *in Vivo* Development of Metastatic Phenotype All Depend on Progesterone Receptor Capacity to Activate Cytoplasmic Signaling Pathways. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 6, p. 1335–1358, 2007.

CASAS, A.; DI VENOSA, G.; VANZULLI, S.; PEROTTI, C.; MAMOME, L.; RODRIGUEZ, L.; SIMIAN, M.; JUARRANZ, A.; PONTIGGIA, O.; HASAN, T.; BATLLE, A. Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. **Cancer Letters**, v. 271, p. 342–351, 2008.

CAVALLARO, U. α_2 -macroglobulin receptor mediates binding and cytotoxicity of plant ribosome-inactivating proteins. **Eur. J. Biochem.**, v. 232, p. 165-171, 1995.

CHEN, J., LIU, X.S. Development and function of IL-10-IFN- γ -secreting CD4⁺ T cells. **J Leukoc Biol**, v. 86, p. 1305-1310, 2009.

CITY OF CORAL SPRINGS. Disponível em:
<http://www.coral springs.org/environment/sandyridge/Vegetation%20Survey/RosaryP ea.cfm>. Acessado em 02 de fevereiro de 2008.

CONTICELLO, C.; PEDINI, F.; ZEUNER, A.; PATTI, M.; ZERILLI, M.; STASSI, G.; MESSINA, A.; PESCHLE, C.; DE MARIA, R. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. **J Immunol.**, v. 172, n. 9, p. 5467-77, 2004.

CULIG, Z. Cytokine disbalance in common human cancers. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1813, n. 2, p. 308-14, 2011.

DESANTIS, C.; SIEGEL, R.; BANDI, P.; JEMAL, A. Breast Cancer Statistics, 2011. **CA: Cancer J Clin**, v, 61, n. 6, p. 409–418, 2011.

DISIS, M.L.; PARK, K.H. Immunomodulation of breast cancer via tumor antigen specific Th1. **Cancer Res Treat.**, v. 41, n. 3, p. 117-21, 2009.

DI VENOSA, G.; PEROTTI, C.; FUKUDA, H.; BATLLE, A.; CASAS, A., Sensitivity to ALA-PDT of cell lines with different nitric oxide production and resistance to NO cytotoxicity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 80, p. 195–202, 2005.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat Rev Cancer.**, v. 4, n. 1, p. 11-22, 2004.

EIJÁN, A.M.; DAVEL, L.E.; RUEDA, H.A.; ROZENBERG, G.; LUSTIG, E.S.; JASNIS, M.A. Differential nitric oxide release and sensitivity to injury in different mammary tumor cell lines. **Int J Mol Med**, v. 2, p. 625-630, 1998.

ERNEST, E.; CASSILETH, B.R. How useful are unconventional cancer treatment. **Eur J Cancer**, v. 35, n. 11, p. 1608-13, 2009.

ESPAÑOL, A.; EIJÁN, A.M.; MAZZONI, E.; DAVEL, L.; JASNIS, M.A.; SACERDOTE DE LUSTIG, E.; SALES, M.E. Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines. **Int J Mol Med**, v. 9, p. 651-657, 2002.

FAHMI, T.; ESENDAGLI, G.; YILMAZ, G.; KANSU, E.; GUC, D. Immune compartmentalization of T cell subsets in chemically-induced breast cancer. **Scand J Immunol.**, v. 72, n. 4, p. 339-48, 2010.

FERNANDO, R. *Abrus precatorius L.* IPCS INCHEM Home. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pims/plant/abruspre.htm>>. Acesso em 25 fev 2007.

FISZMAN, G.; CATTANEO, V.; DE LA TORRE, E.; ESPAÑOL, A.; COLOMBO, L.; DE LUSTIG, E. S.; SALES, M. E. Muscarinic receptors autoantibodies purified from mammary adenocarcinoma-bearing mice sera stimulate tumor progression. **Int Immunopharmacol**, v. 6, p. 1323–1330, 2006.

FRANKEL, A. E.; BURBAGE, C.; FU, T.; TAGGE, E.; CHANDLER, J.; WILLINGHAM, M. C. Ricin toxin contains at least three galactose-binding sites located in B chain subdomains 1a, 1b, and 2g. **Biochemistry.**, v. 35, p. 14749–14756, 1996.

GAO, Y. The multiple actions of NO. **Pflugers Arch.**, v. 459, n. 6, p. 829-39, 2010.

GRANOT, Z.; HENKE, E.; COMEN, E.A.; KING, T.A.; NORTON, L.; BENEZRA, R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. **Cancer Cell.**, v. 20, n. 3, p. 300-14, 2011.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytic. Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GROLLEAU-JULIUS, A.; HARNING, E.K.; ABERNATHY, L.M.; YUNG, R.L. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. **Cancer Res.**, v. 68, n. 15, p. 6341-9, 2008.

HARTLEY, M. R.; CHADDOCK, J. A.; BONNESS, M. S. The structure and function of ribosome-inactivating proteins. **Trends Plant Sci.**, v. 1, p. 254–260, 1996.

HAYASHI H, NAKAHAMA K, SATO T, TUCHIYA T, ASAKAWA Y, MAEMURA T, TANAKA M, MORITA M, MORITA I. The role of Mac-1 (CD11b/CD18) in osteoclast differentiation induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. **FEBS Lett.**, v. 582, n. 21-22, p. 3243-8, 2008.

HIRAHARA, K.; VAHEDI, G.; GHORESCHI, K.; YANG, X.P.; NAKAYAMADA, S.; KANNO, Y.; O'SHEA, J.J.; LAURENCE, A. Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. **Immunology.**, v. 134, n. 3, p. 235-45, 2011.

HUERTA, S.; GOULET, E.J.; HUERTA-YEPEZ, S.; LIVINGSTON, E.H. Screening and Detection of Apoptosis. **J Surg Res.**, v. 139, p. 143–156, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa da Incidência de Câncer para 2008 no Brasil e nas cinco Regiões.** Disponível no site: “http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1793”; acesso em 01/08/2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Câncer de mama.** Disponível no site: “<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>”; acesso em 01/05/2012.

JACKSON, L.; EVERS, B.M. Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers. **Cancer Treat. Res.**, v. 130, p. 39–65, 2006.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E. The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations. **J Immunol**, v. 171, p. 6323-6327, 2003.

KANENO, R.; FONTANARI, L.M.; SANTOS, S.A.; DI STASI, L.C.; RODRIGUES FILHO, E.; EIRA, A.F. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. **Food Chem Toxicol**, v. 42, n. 6, p. 909-16, 2004.

KEES, T.; EGEBLAD, M. Innate immune cells in breast cancer – from villains to heroes? **J Mammary Gland Biol Neoplasia.**, v. 16, n. 3, p. 189-203, 2011.

KORKAYA, H.; LIU, S.; WICHA, M.S. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. **J Clin Invest.**, v. 121, n. 10, p. 3804-9, 2011.

KUMAR, V.; CONTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L. **Patologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994.608p.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAPTEVA, N.; ALDRICH, M.; ROLLINS, L.; REN, W.; GOLTSOVA, T.; CHEN, S.Y.; HUANG, X.F. Attraction and activation of dendritic cells at the site of tumor elicits potent antitumor immunity. **Mol Ther.**, v. 17, n. 9, p. 1626-36, 2009.

LEVANO, K.S.; JUNG, E.H.; KENNY, P.A. Breast cancer subtypes express distinct receptor repertoires for tumor-associated macrophage derived cytokines. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 411, n. 1, p. 107-10, 2011.

LIN, J.Y.; LEE, T.C.; HU, S.; TUNG, T.C. Inhibitory effects of four isoabirins on the growth of Sarcoma 180 cells. **Cancer Res.**, v. 42, p. 276-279, 1982.

LIN, E.Y.; POLLARD, J.W. Tumor-Associated Macrophages Press the Angiogenic Switch in Breast Cancer. **Cancer Res**, v. 67, n. 11, p. 5064–5066, 2007.

LING, J.; LIU, W. Y.; WANG, T. P. Cleavage of supercoiled double-stranded DNA by several ribosome-inactivating proteins *in vitro*. **FEBS Lett.**, v. 345, p. 143–146, 1994.

LIU, Y.; PECK, K.; LIN, J. Involvement of Prohibitin Upregulation in Abrin-Triggered Apoptosis. **Evid-Based Complement Alternat Med**, doi:10.1155/2012/605154, 2012.

LÖFDAHL, B.; AHLIN, C.; HOLMQVIST, M.; HOLMBERG, L.; ZHOU, W.; FJÄLLSKOG, M.L.; AMINI, R.M. Inflammatory cells in node-negative breast cancer. **Acta Oncol.**, doi: 10.3109/0284186X.2011.652737, 2012.

LOPES, F.C.M. **Avaliação da atividade antiinflamatória, antitumoral e antiangiogênica de compostos isolados da planta *Alchornea glandulosa* e de fungos endofíticos a ela relacionados.** 2008. 164f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara.

LORD, J. M.; ROBERTS, L. M. Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. **J. Cell Biol.**, v. 140, p. 733–736, 1998.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol.**, v. 22, n.2, p. 231-237, 2010.

MCPHERSON, A. Jr; RICH, A. Studies on crystalline abrin: X-ray diffraction data, molecular weight, carbohydrate content and subunit structure. **FEBS Lett.**, v. 35, p. 257-261, 1973.

MLAMBO, G.; SIGOLA, L.B. Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF- α production. **Int Immunopharmacol**, v. 3, p. 513-522, 2003.

MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F.M.; YOUNG, H.A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. **J Leukc Biol.**, v. 78, p. 1043-1051, 2005.

MONNAZZI, L.G.S. **Papel das Yops de *Yersinia pseudotuberculosis* na modulação da resposta imune celular durante infecção experimental.** 2007. 118f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara.

MOREIRA, R.A. **Lectinas vegetais: uma abordagem química e físicoquímica.** Tese de Titular, UFC, 600p, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, D.M. **Pulchelinas, lectinas galactose-específicas, de sementes de Abrus pulchellus**: purificação e estudos de propriedades químicas e biológicas. 1997. 120f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MUNDY, J.; LEAH, R.; BOSTON, R.; ENDO, Y.; STIRPE, F. Genes encoding ribosome-inactivating proteins. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 12, p. 60-62, 1994.

NARAYANAN, S.; SUROLIA, A.; KARANDE, A. A. Ribosome-inactivating protein and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells. **Biochem. J.**, v. 377, p. 233–240, 2004.

NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokines Growth Factor Rev.**, v. 17, p. 325-337, 2006.

NIELSEN, K.; BOSTON, R. S. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. **Annu.Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.**, v. 52, p. 785-816, 2001.

NOMA, K.; YAMAGUCHI, Y.; OKITA, R.; MATSUURA, K.; TOGE, T. The spleen plays an immunosuppressive role in patients with gastric cancer: involvement of CD62L+ cells and TGF-beta. **Anticancer Res**, v. 25, p. 643-9, 2005.

O'GARRA, A.; ARAI, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. **Trends Cell Biol.**, v. 10, n. 12, p. 542-550, 2000.

O'GARRA, A.; GABRYSOVÁ, L.; SPITS, H. Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells. **Nature Immunol.**, v. 12, n. 4, p. 288-294, 2011.

OHBA, H.; MORIWAKI, S.; BAKALOVA, R.; YASUDA, S.; YAMASAKI, N. Plant-derived abrin-a induces apoptosis in cultured leukemic cell lines by different mechanisms. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.195, p. 182– 193, 2004.

OLSNES, S.; SANDVIG, K.; EIKLID, K.; PIHL, A. Properties and action mechanism of the toxic lectin modeccin: interaction with cell lines resistant to modeccin, abrin, and ricin. **J Supramol Struct**, v. 9, p. 15-25, 1978.

OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v. 44, n.4, p. 361-370, 2004.

PARK, J.Y.; JANG, M.J.; CHUNG, Y.H.; KIM, K.Y.; KIM, S.S.; LEE, W.B.; YOU, S.; CHOI, Y.S.; HUR, D.Y.; KIM, D. Doxorubicin enhances CD4(+) T-cell immune responses by inducing expression of CD40 ligand and 4-1BB. **Int Immunopharmacol.**, v. 9, n. 13-14, p. 1530-9, 2009.

PEUMANS, W.J.; HAO, Q.; VAN DAMME, E.J.M. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? **FASEB J**, v. 15, p. 1493-1506, 2001.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods.**, v. 38, p. 161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D.J.; Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods.**, v. 46, p. 211-226, 1981.

PIERCE, B.L.; BALLARD-BARBASH, R.; BERNSTEIN, L.; BAUMGARTNER, R.N.; NEUHOUSER, M.L.; WENER, M.H.; BAUMGARTNER, K.B.; GILLILAND, F.D.; SORENSEN, B.E.; MCTIERNAN, A.; ULRICH, C.M. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. **J Clin Oncol.**, v. 27, n. 21, p. 3437-44, 2009.

QUAGLINO, A.; SCHERE-LEVY, C.; ROMORINI, L.; MEISS, R.P.; KORDON, E. C. Mouse mammary tumors display Stat3 activation dependent on leukemia inhibitory factor signaling. **Breast Cancer Res**, v., 9, p. R69, 2007.

RAMNATH, V., KUTTAN, G., KUTTAN, R. Antitumour effect of abrin on transplanted tumours in mice. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 46, p. 69–77, 2002.

RAMNATH, V.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Effect of abrin on cell-mediated immune responses in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, v. 28, n. 2, p. 259-68, 2006.

RENGARAJAN, J.; SZABO, S.J.; GLIMCHER, L.H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. **Immunol Today**, v. 21, n. 9, p. 479-483, 2000.

ROCA, H.; CRAIG, M.J.; YING, C.; VARSOS, Z.S.; CZARNIESKI, P.; ALVA, A.S.; HERNANDEZ, J.; FULLER, D.; DAIGNAULT, S.; HEALY, P.N.; PIENTA, K.J. IL-4 induces proliferation in prostate cancer PC3 cells under nutrient-depletion stress through the activation of the JNK-pathway and survivin upregulation. **J Cell Biochem.**, doi: 10.1002/jcb.24025, 2011.

SAWAOKA, H.; TSUJI, S.; TSUJII, M.; GUNAWAN, E.S.; SASAKI, Y.; KAWANO, S.; HORI, M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. **Lab Invest.**, v. 79, n. 12, p. 1469-77, 1999.

SCHNEIDERS, F.L.; DE BRUIN, R.C.; SANTEGOETS, S.J.; BONNEVILLE, M.; SCOTET, E.; SCHEPER, R.J.; VERHEUL, H.M.; DE GRUIJL, T.D.; VAN DER VLIET, H.J. Activated iNKT cells promote V γ 9V δ 2-T cell anti-tumor effector functions through the production of TNF- α . **Clin Immunol.**, v. 142, n. 2, p. 194-200, 2012.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J. Chronic Inflammation: A Common and Important Factor in the Pathogenesis of Neoplasia. **CA Cancer J Clin**, v. 56, n. 2, p. 69-83, 2006.

SHORTMAN, K.; LAHOUD, M.H.; CAMINSCHI, I. Improving vaccines by targeting antigens to dendritic cells. **Exp Mol Med.**, v. 41, n. 2, p. 61-6, 2009.

SMITH, D.C.; SALIO, M.; LORD, J.M.; ROBERTS, L.M.; CERUNDOLO, V. Lack of dendritic cell maturation by the plant toxin ricin. **Eur J Immunol.**, v. 34, n. 8, p. 2149-57, 2004.

SPOONER, R. A.; WATSON, P. D.; MARSDEN, C. J.; SMITH, D. C.; MOORE, K. A.; COOK, J. P.; LORD, J. M.; ROBERTS, L. M. Protein disulphide-isomerase reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum. **Biochem. J.**, v. 383, p. 285–293, 2004.

STEINMAN, R.M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature.**, v. 449, n. 7161, p. 419-26, 2007.

STEEVES, R. M., DENTON, M. E., BARNARD, F. C., HENRY, A., AND LAMBERT, J. M. Identification of three oligosaccharide binding sites in ricin. **Biochemistry**, v. 38, p. 11677–11685, 1999.

STIRPE, F.; GASPERI-CAMPANI, A.; BARBIERI, L.; LORENZONI, E.; MONTANARO, L.; SPERTI, S.; BONETTI, E. Inhibition of protein synthesis by modeccin, the toxin of *Modecca digitata*. **FEBS Lett.**, v. 85, p. 65-67, 1978.

STIRPE, F.; BATTELLI, M.G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 1850-1866, 2006.

TAHIROV, T.H.; LU, T.H.; LIAW, Y.C.; CHU, S.C.; LIN, J.Y. A new crystal form of abrin-a from the seeds of *Abrus precatorius*. **J. Mol. Biol.**, v. 235, p. 1152-1153, 1994.

TAHIROV, T.H.; LU, T.C.; LIAW, Y.C.; CHEN, Y.L.; LIN, J.Y. Crystal structure of abrin-a at 2.14 Å. **J. Mol. Biol.**, v. 250, p. 354-367, 1995.

TALMOR, M.; MIRZA, A.; TURLEY, S.; MELLMAN, I.; HOFFMAN, L.A.; STEINMAN, R.M. Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures. **Eur J Immunol.**, v. 28, n. 3, p. 811-7, 1998.

TSAI, B.; YE, Y.; RAPOPORT, T. A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, p. 246–255, 2002.

VAN DE VEN, R.; VERBRUGGE, S.E.; REURS, A.W.; BONTKES, H.J.; HOOIJBERG, E.; JANSEN, G.; SCHEPER, R.J.; SCHEVER, G.L.; DE GRUIJL, T.D. High susceptibility of c-KIT+CD34+ precursors to prolonged doxorubicin exposure interferes with Langerhans cell differentiation in a human cell line model. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, p. 943–951, 2011.

VAN GINDERACHTER, J.A.; MOVAHEDI, K.; GHASSABEH, G.H.; MEERSCHAUT, S.; BESCHIN, A.; RAES, G.; DE BAETSELIER, P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**, v. 211, n. 6-8, 14, p. 487-501, 2006.

WACHÉ, Y.J.; HBABI-HADDIOUI, L.; GUZYLACK-PIRIOU, L.; BELKHELFA, H.; ROQUES, C.; OSWALD, I.P. The mycotoxin deoxynivalenol inhibits the cell surface expression of activation markers in human macrophages. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 239-44, 2009.

WU, J.H.; WU, A.M.; YANG, Z.; CHEN, Y.; SINGHA, B.; CHOW, L.; LIN, J. Recognition intensities of submolecular structures, mammalian glyco-structural units, ligand cluster and polyvalency in abrin-a-carbohydrate interactions. **Biochimie**, v. 92, p. 147-156, 2010.

CAPÍTULO 2

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Immunological response in mice bearing LM3 breast tumor undergoing Pulchellin treatment

Djamile Cordeiro de Matos¹, Lívia Carolina Abreu de Ribeiro¹, Aline Tansini¹, Lucas Souza Ferreira¹, Marisa Campos Polesi Placeres¹, Lucas Luis Colombo² and Iracilda Zeppone Carlos^{1,3*}

Abstract

Background: Ribosome-inactivating proteins (RIP) have been studied in the search for toxins that could be used as immunotoxins for cancer treatment. Pulchellin, a type 2 RIP, is suggested to induce immune responses that have a role in controlling cancer.

Methods: The percentage of dendritic cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen (flow cytometry), cytokines' release by PECs and splenocytes (ELISA) and nitric oxide production by PECs (Griess assay) were determined from tumor-bearing mice injected intratumorally with 0.1 ml of pulchellin at 0.75 µg/kg of body weight. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

Results: Pulchellin-treated mice showed significant immune system activation, characterized by increased release of IFN-γ and Th2 cytokines (IL-4 and IL-10), while IL-6 and TGF-β levels were decreased. There was also an increase in macrophage's activation, as denoted by the higher percentage of macrophages expressing adhesion and costimulatory molecules (CD54 and CD80, respectively).

Conclusions: Our results suggest that pulchellin is promising as an adjuvant in breast cancer treatment.

Keywords: Pulchellin, Breast cancer, Cytokines, Immune system

Background

Tumor cells are confronted with immune cells at each stage of malignancy in the host, within the tumor, in the blood and lymph circulation and in metastatic lesions [1]. Cancer immunotherapy aims to stimulate the immune system to destroy tumors, i.e. by enhancing the production of cytokines and other immune mediators that might act to eliminate the tumor cells.

Pulchellin is a type 2 ribosome-inactivating protein (RIP) isolated from the seeds of *Abrus pulchellus tenuiflorus*. Type 2 RIPs, like ricin and abrin, are heterodimeric proteins composed of an enzymatic A-chain covalently linked by a single disulfide bond to a B-chain. The A-chain has the toxic rRNA-specific N-glycosidase

activity, and the B-chain has lectin activity towards specific carbohydrate moieties present on the surfaces of mammalian cells. Pulchellin has an affinity for β-D-galactose [2], a carbohydrate that is present on the surface of many eukaryotic cells. This feature enables this RIP to bind to glycoproteins and glycolipids on the cell surface, after which it is internalized by different mechanisms [3]. Several studies have reported the mechanisms of pulchellin interaction with membrane model systems [4] and the endocytosis machinery in K-562 cells [2], but there have been no reports of the immunological activities of this protein.

In the present study, we investigated the immune response in tumor-bearing mice treated with pulchellin. A high production of IFN-γ was observed, possibly responsible for the observed macrophage activation, including nitric oxide and TNF-α production and an enhanced expression of adhesion and costimulatory molecules; the increased production of the cytokines IL-10 and IL-4, but decreased IL-6 and TGF-β production, was also observed.

* Correspondence: carlosiz@fcar.unesp.br

¹Laboratory of Clinical Immunology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, São Paulo, Brazil

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Rua Expedicionários do Brasil 1601, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

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

Methods

Materials

Native pulchellin was isolated [5] and kindly provided by Dr. Ana Paula Ulian de Araújo from the Physics Institute of São Carlos – USP, Brazil.

Cell culture

The tumor cell line LM3, derived from a murine mammary adenocarcinoma that spontaneously arose in BALB/c mice, was kindly provided by Dr. Lucas L. Colombo from Angel H. Roffo Institute, Buenos Aires, Argentina. Cells were maintained in MEM medium (Gibco, BRL) supplemented with 3 mM L-glutamine, 80 µg/ml gentamycin and 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) at 37°C in a humidified 5% CO₂ air atmosphere. Cells were detached by the trypsinization (0.25% trypsin and 0.02% EDTA, in Ca²⁺- and Mg²⁺-free PBS) of confluent monolayers. The medium was replaced three times per week. Cell viability was assayed using a Trypan blue exclusion test, and the absence of mycoplasma was confirmed by the Hoechst method.

Animals

Female BALB/c mice (2-3-month-old) weighing around 20 g were purchased from the animal facility of UNICAMP, São Paulo, Brazil. Sterilized water and food were provided *ad libitum*. All animal procedures were performed in accordance with the regulations of the Research Ethics Committee (# 28/2008), Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, São Paulo, Brazil.

Experimental groups

LM3 cells (1 × 10⁶ cells) were injected subcutaneously in the flanks of 2-3-month-old female BALB/c mice. After 20 days, LM3 tumor-bearing mice were injected intratumorally with 0.1 ml of pulchellin at 0.75 µg/kg of body weight (10 times the *in vitro* IC₅₀ concentration) (group P) or phosphate buffered saline (group T). The mice in group N did not receive treatment (healthy mice). The mice were sacrificed after 7 days of treatment.

Peritoneal macrophages

Thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells (PEC) were harvested from group P, group T and group N mice using 5.0 ml of sterile PBS, pH 7.4. The cells were washed twice by centrifugation at 200g for 5 min at 4°C and resuspended in the appropriate medium for each test.

Isolation of splenic lymphocytes

Spleens were resected from group P, group T and group N mice under sterile conditions and macerated to produce single cell suspensions. After red blood cell lysis, the cells were washed twice by centrifugation at 200g

for 5 min at 4°C and resuspended in the appropriate medium for each test.

Flow cytometry analysis

The cells were adjusted to a concentration of 1 × 10⁶ cells/ml in PBS containing 1% BSA. Peritoneal exudate cells were stained with the following fluorescent dye-conjugated monoclonal antibodies (Mab) from BD Biosciences: CD11b fluorescein isothiocyanate (FITC), CD54 phycoerythrin (PE) and CD80 allophycocyanin (APC). Spleen cells were stained with the following fluorescent dye-conjugated monoclonal antibodies (Mab), also from BD Biosciences: CD3 FITC, CD4 PE, CD8a peridinin chlorophyll cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5), CD11c FITC, CD25 APC, CD86 APC and I-Ad/I-Ed (MHC II) PE. Corresponding IgG isotypes were used as controls to account for non-specific binding (BD Biosciences). Prior to cell staining, non-specific binding sites were blocked with mouse BD Fc Block (BD Biosciences). Cell surface markers were stained for 30 min at 4°C, washed with staining buffer (PBS containing 1% BSA) and then fixed in 1% paraformaldehyde at 4°C until analysis. Flow cytometry data were acquired using a FACSCanto instrument (BD Immunocytometry System, USA) and analyzed using FACSDiva Software (BD Biosciences).

Measurement of nitric oxide (NO) production

NO production was determined by assaying the nitrite levels of the culture supernatants using the Griess reagent. PEC (adherent cells) at 5 × 10⁶ cells/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 2 × 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 5% FCS (complete RPMI) were incubated for 24 h at 37°C in a 7.5% CO₂ atmosphere. Cell-free supernatant (50 µl) was mixed with 50 µl Griess reagent (0.1% sulfanilamide, 3% phosphoric acid and 0.1% naphthyl ethylenediamine) and incubated at room temperature for 10 min in the dark. After incubation, absorbance was read at 540 nm on a microplate reader (Multiskan, Labsystems, Finland). The nitrite concentration was calculated based on a standard curve. The results were expressed in µmols/ml [6].

Measurement of cytokines production

The levels of IL-6 and TNF-α in the PEC culture supernatants and IL-4, IL-10, IFN-γ and TGF-β in the splenocytes culture supernatants were determined by a sandwich immunoassay kit (BD Biosciences Pharmingen, USA) in 96-well microplates performed according to the manufacturer's instructions. Absorbance was read at 450 nm on a microplate reader (Multiskan Ascent, Labsystems, Finland) within 30 min of stopping the reaction, and cytokine concentrations were calculated from a

curve of known concentrations of each cytokine standard. The results were expressed in pg/ml.

Data analysis

The results are expressed as the means \pm S.D. Each experiment was performed at least five times. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test was performed using GraphPad InStat version 3.0 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Flow cytometry analysis

Macrophage cell surface markers were used to evaluate peritoneal cells, lymphocytes and dendritic spleen cells. We observed that untreated tumor-bearing mice (group T) presented an increase in the numbers of mature dendritic cells (CD11c⁺CD86⁺ and CD11c⁺MHCII⁺, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) and CD4⁺CD25⁺ cells ($p < 0.01$), accompanied by a reduction of total CD4⁺ and CD8⁺ cells ($p < 0.001$) when compared to control healthy mice (group N). Pulchellin treatment (group P) promoted an enhancement of adhesion (CD54) and costimulatory (CD80) molecules expression in peritoneal macrophages ($p < 0.01$), a significant reduction in the number of CD4⁺CD25⁺ Treg cells ($p < 0.01$) and non-significant reduction in the number of CD8 cells and dendritic cells ($p > 0.05$) relative to the tumor control group (T group) (Table 1).

Measurement of nitric oxide and cytokine production

In order to evaluate the immune response in mice that received an intratumoral administration of pulchellin, the production of nitric oxide and cytokines in the cell culture supernatants of PEC and spleen cells was determined. Analysis of the PEC cells from pulchellin-treated tumor-bearing mice revealed a higher production of NO than that of the untreated tumor-bearing or healthy

Table 1 Percentage of macrophages (peritoneum), dendritic cells and lymphocytes (both from spleen) from mice of the different treatment groups

	Pulchellin (P group)	Tumor control (T group)	Healthy mice (N group)
% CD11b ⁺ CD54 ⁺	35.8 \pm 2.6 ^{#####}	24.7 \pm 2.2	23.1 \pm 1.4
% CD11b ⁺ CD80 ⁺	5.3 \pm 1.3 ^{#####}	1.1 \pm 0.4	1.5 \pm 0.2
% CD11c ⁺ MHCII ⁺	1.5 \pm 0.1 ^{##}	2.8 \pm 0.5 ^{**}	1.2 \pm 0.1
% CD11c ⁺ CD86 ⁺	0.2 \pm 0.1 [#]	0.4 \pm 0.1 [*]	0.2 \pm 0.1
% CD3 ⁺ CD4 ⁺	9.0 \pm 0.3 ^{***}	8.5 \pm 0.2 ^{***}	17.6 \pm 1.0
% CD4 ⁺ CD25 ⁺	0.1 \pm 0.1 ^{##}	1.0 \pm 0.3 ^{**}	0.1 \pm 0.1
% CD3 ⁺ CD8 ⁺	2.6 \pm 0.4 ^{***}	2.5 \pm 0.4 ^{***}	6.7 \pm 0.4

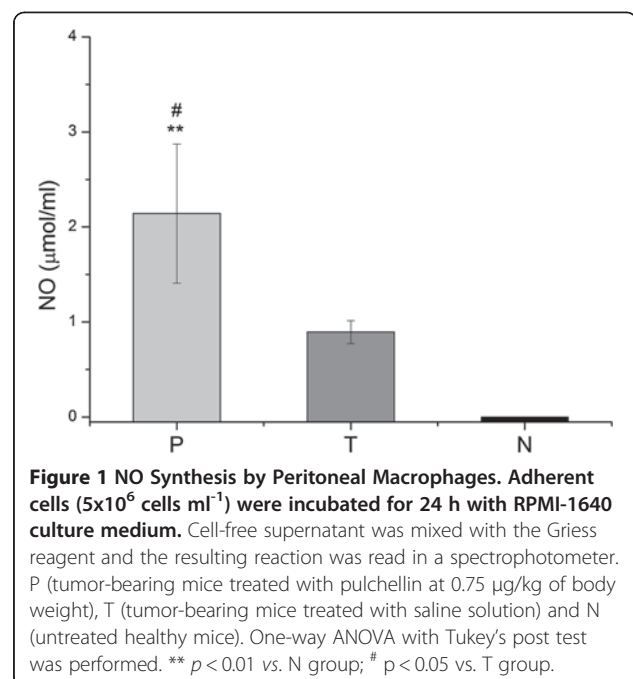
Data are represented as the mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by Tukey post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. healthy group; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. tumor control group.

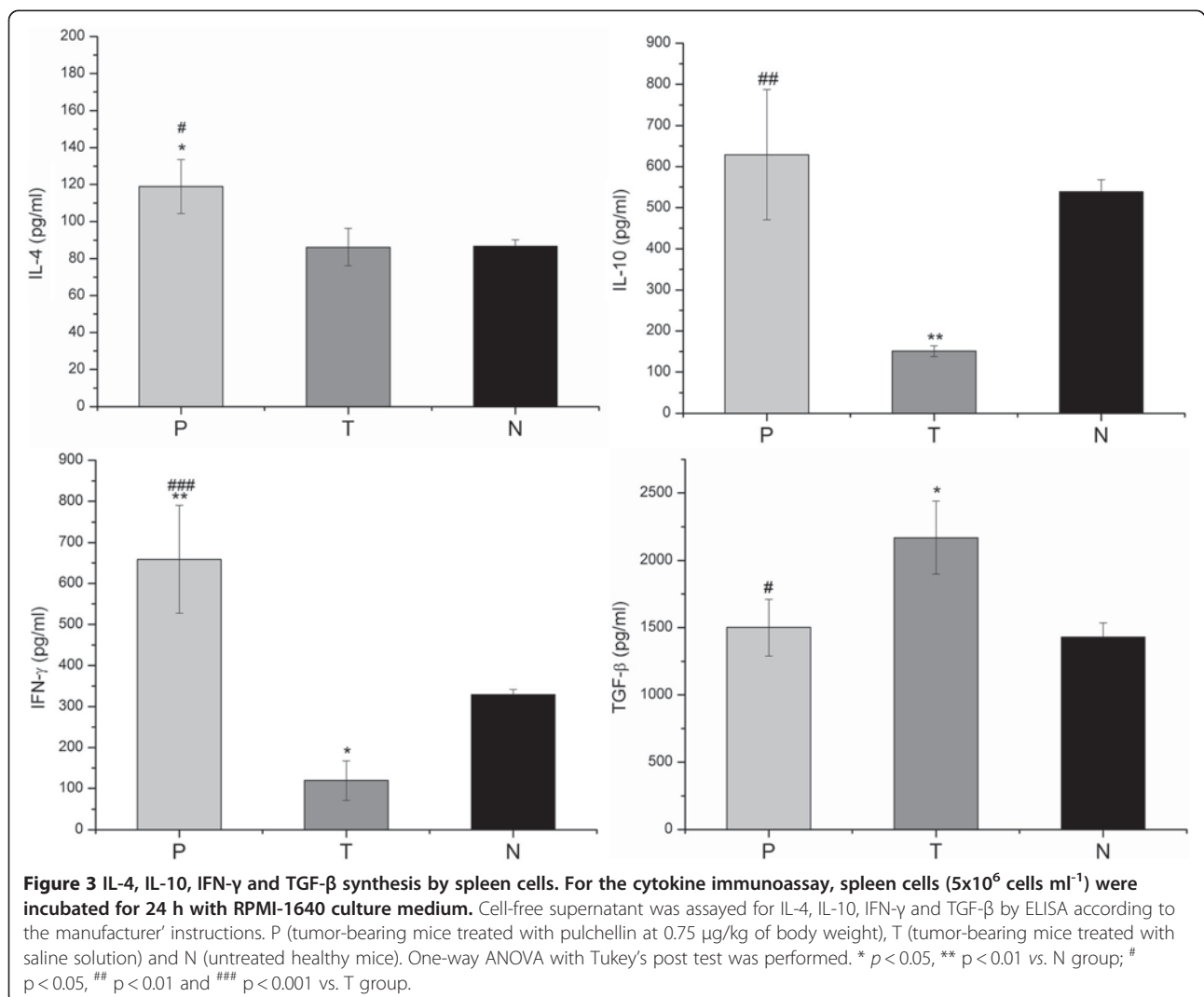
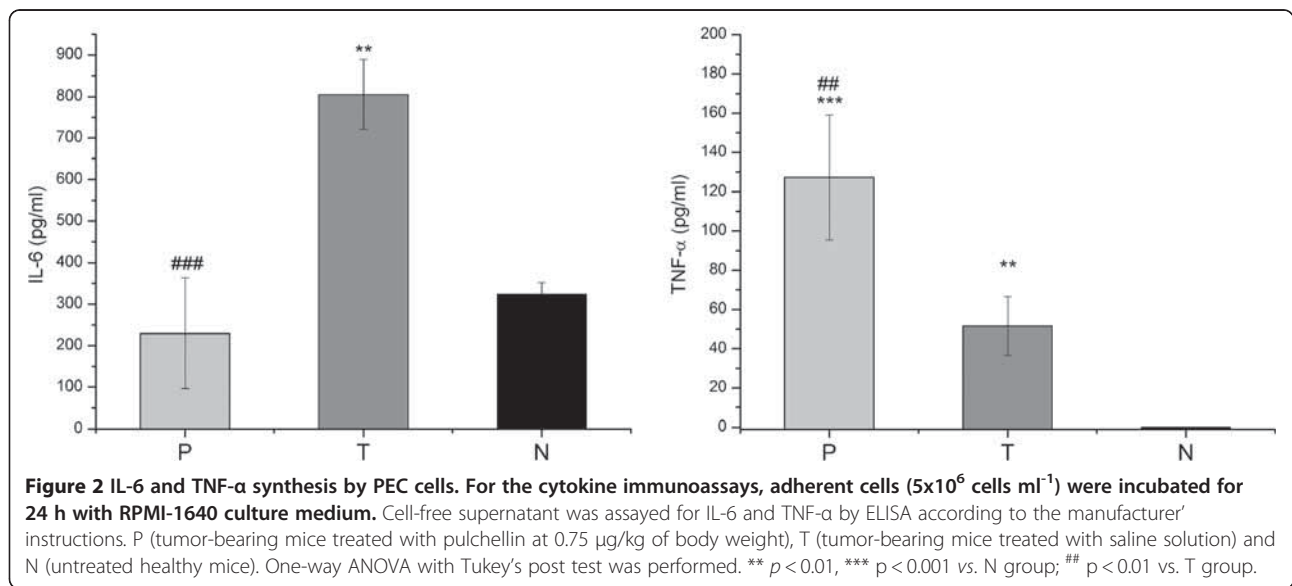
mice ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) after 24 h of culture (Figure 1). The immune cells from pulchellin-treated mice also produced statistically higher concentrations of TNF- α by PEC cells, and IL-4, IFN- γ and IL-10 by splenocytes, and lower concentrations of IL-6 (PEC cells) and TGF- β (splenocytes), than the cells from tumor control mice (Figures 2 and 3).

Discussion

In the last several years, researchers have demonstrated the important role of the immune system in the control or promotion of tumor development [7]. Pulchellin, a type 2 RIP isolated from *Abrus pulchellus tenuiflorus*' seeds, is a powerful toxin, structurally similar to abrin and ricin. Although the anti-tumor activities and immunomodulatory effects of abrin and ricin have been studied [8-10], there is no such published data for pulchellin.

In this study, we evaluated the production of some immune mediators and the expression of surface markers in different immune cells obtained from tumor-bearing mice treated or not with pulchellin. We observed greater production of IFN- γ by spleen cells from group P than in those from group T. Since we couldn't detect IL-12 production by PECs from group P (data not shown), it can be suggested that the increased IFN- γ production found in this group is most likely the cause of the enhanced expression of adhesion (CD54) and costimulatory (CD80) molecules and the production of TNF- α and NO by macrophages [11]. In some cases, production of IFN- γ can be triggered in the absence of IL-12 stimulation, when there is enough antigen levels to keep a





sustained TCR activation with subsequent fosforilation of the mitogen-activated Erk kinase protein, resulting in IFN- γ -producing Th1 cells [12].

We also observed less activation of dendritic cells from the spleens of group P mice than in mice from group T. A group of researchers have already reported a similar phenomenon when they treated immature human monocyte-derived dendritic cells with ricin (type II RIP), resulting in decreased expression of MHC II and CD86 in these cells. This may explain why pulchellin treatment does not significantly change the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in comparison to group T [13].

A reduction of CD4⁺CD25⁺ cells, as well as of TGF- β and IL-6 production, was observed in group P compared to group T. IL-6 is known to promote tumor growth by upregulating anti-apoptotic and pro-angiogenic proteins in tumor cells [14], and TGF- β is known to support tumor progression by promoting cell invasion and dissemination to distant sites, enhancing angiogenesis and mediating the immune evasion of tumor cells [15]. Besides that, IL-6 is known to promote, together with TGF- β , naive T cells differentiation into Th17 cells [16], which are found in greater quantities in mice as breast cancer progresses, reaching their highest levels at the later stages of the disease [17]. CD4⁺CD25⁺ cells are naturally occurrbca03ing Tregs and are recognized as a major subset among the immune cells that are responsible for peripheral immune self-tolerance. The accumulation of CD4⁺CD25⁺ Tregs can result in tumor growth through the suppression of anticancer immunity [18]. Consequently, the downregulation of these Tregs and cytokines by pulchellin treatment might improve antitumor immunity.

The increase in IL-10 and IL-4 release on group P animals may enhance the host immune response against the tumor and aid in the control of tumor growth. IL-4 also plays a role in the immune response against various tumors, including breast cancer, by inhibiting tumor angiogenesis [19]. Meanwhile, IL-10 directly activates and expands the antigen-specific IFN- γ -producing effector CD8 T cell pool inside the tumor, resulting in higher IFN- γ levels which trigger the increased expression of intratumoral antigen presenting molecules [20].

Currently, there are several published data in which RIPs are chemically linked to or genetically fused with antibodies, growth factors, hormones and lectins for the treatment of cancer. Based on the results of the present work, pulchellin may be a candidate for further studies as a drug that can produce immunotoxins with antitumoral purpose.

Conclusions

Pulchellin exhibited several interesting activities, including macrophage activation, the production of cytokines

known to increase antitumor immunity and the reduction of pro-tumoral cytokines and CD4⁺CD25⁺ Treg cells. These results provide a new perspective for cancer treatment and suggest that pulchellin may be a candidate for the production of immunotoxins against breast cancer.

Abbreviations

FCS: Fetal calf serum; IC₅₀: Inhibitory concentration 50%; IFN- γ : Interferon-gamma; IL-4: Interleukin-4; IL-6: Interleukin-6; IL-10: Interleukin-10; TGF- β : Transforming growth factor-beta; TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha; Treg cells: Regulatory T cells.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IZC conceived the study, participated in its design and coordination. DCM carried out cell culture experiments, cytokine estimations and drafted the manuscript. LCAB participated of the immunoassays. MCP and LFS realized the tumor induction. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

Special thanks to professor Ana Paula Ulian Araújo from the Physics Institute of São Carlos – USP who kindly provided the purified pulchellin solution used in our experiments. We acknowledge FAPESP for the financial support to carry out this research.

Author details

¹Laboratory of Clinical Immunology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, São Paulo, Brazil. ²Institute of Oncology Angel H. Roffo, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ³Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Rua Expedicionários do Brasil 1601, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

Received: 29 March 2012 Accepted: 11 July 2012

Published: 24 July 2012

References

1. Van Ginderachte JA, Movahedi K, Ghassabeh GH, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P: **Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion.** *Immunobiology* 2006, **211**:487–501.
2. Goto LS, Castilho PV, Cominetti MR, Selistre-Araújo HS, Araújo APU: **Endocytosis of pulchellin and its recombinant B-chain into K-562 cells: Binding and uptake studies.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1770**:1660–1666.
3. Stirpe F, Battelli MG: **Ribosome-inactivating proteins: progress and problems.** *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**:1850–1866.
4. Reyes LF, Nobre TM, Pavinatto FJ, Zaniquelli ME, Caseli L, Oliveira ON Jr, Araújo AP: **The role of the C-terminal region of pulchellin A-chain in the interaction with membrane model systems.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1818**:82–89.
5. Goto LS, Beltrami DI, de Moraes RA, de Araújo APU: **Abrus pulchellus type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar-binding B chain.** *Protein Expr Purif* 2003, **31**:12–18.
6. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: **Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids.** *Anal Biochem* 1982, **126**:131–138.
7. Fahmi T, Esendagli G, Yilmaz G, Kansu E, Guc D: **Immune compartmentalization of T cell subsets in chemically-induced breast cancer.** *Scand J Immunol* 2010, **72**:339–348.
8. Chen ZK, Lin LW, Cai J, Yang FD, Cai HJ, Xue ES, Huang J, Wei HF, Zhang XJ: **Effect of interstitial chemotherapy with ricin temperature-responsive gel for anti-breast cancer and immune regulation in rat.** *Chin J Integr Med* 2011. doi:10.1007/s11655-011-0757-4.
9. Chen J, Liu XS: **Development and function of IL-10-IFN- γ -secreting CD4⁺ T cells.** *J Leukoc Biol* 2009, **86**:1305–1310.
10. Ramnath V, Kuttan G, Kuttan R: **Effect of abrin on cell-mediated immune responses in mice.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006, **28**:259–268.

11. Biswas SK, Mantovani A: **Macrophage plasticity and interaction with lymphocytes subsets: cancer as a paradigm.** *Nat Immunol* 2010, **11**: 889–896.
12. O'Garra A, Gabrysova L, Spits H: **Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells.** *Nat Immunol* 2011, **12**: 288–294.
13. Smith DC, Salio M, Lord JM, Roberts LM, Cerundolo V: **Lack of dendritic cell maturation by the plant toxin ricin.** *Eur J Immunol* 2004, **34**:2149–2157.
14. Nicolini A, Carpi A, Rossi G: **Cytokines in breast cancer.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, **17**:325–337.
15. Drabsch Y, ten Dijke P: **TGF- β signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011, **16**(2):97–108.
16. Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, Peng G: **Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells.** *J Immunol* 2010, **184**(3):1630–1641.
17. Wang J, Cai D, Ma B, Wu G, Wu J: **Skewing the Balance of Regulatory T-cells and T-helper 17 Cells in Breast Cancer Patients.** *J Int Med Res* 2011, **39**(3):691–701.
18. Pukhal'skii AL, Shmarina GV, Aleshkin VA: **Regulatory T-cells: modern approaches to optimization of their numbers.** *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2011, **8**:24–33.
19. Okada H, Kuwashima N: **Gene therapy and biologic therapy with interleukin-4.** *Curr Gene Ther* 2002, **2**:437–450.
20. Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, Blaisdell S, Basham B, Dai J, Grein J, Sheppard C, Hong K, Cutler C, Turner S, LaFace D, Kleinschek M, Judo M, Ayanoglu G, Langowski J, Gu D, Paporello B, Murphy E, Sriram V, Naravula S, Desai B, Medicherla S, Seghezzi W, McClanahan T, Cannon-Carlson S, Beebe AM, Oft M: **IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance.** *Cancer Cell* 2011, **20**:781–796.

doi:10.1186/1472-6882-12-107

Cite this article as: de Matos *et al.*: Immunological response in mice bearing LM3 breast tumor undergoing Pulchellin treatment. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012 **12**:107.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

