

**ALINE CAFFARELLI BERGO**

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E IMUNOLÓGICA DE ABRINA E  
PULCHELINA EM TUMOR MAMÁRIO MURINO**

**ARARAQUARA**

**2013**

**ALINE CAFFARELLI BERGO**

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E IMUNOLÓGICA DE ABRINA E  
PULCHELINA EM TUMOR MAMÁRIO MURINO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,  
da Universidade Estadual Paulista, para a  
obtenção do grau de Farmacêutica-  
Bioquímica.

**Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos**

**Araraquara**

**2013**

## **Agradecimentos**

*À minha família, pela educação, amor, carinho e apoio em todos esses anos.*

*Aos amigos, pelo incentivo e companheirismo.*

*Ao meu namorado Luis, pelo carinho e todos os conselhos.*

*À professora Iracilda pela oportunidade acadêmica e incentivo no desenvolvimento do projeto.*

*À Djamile pelo ensinamento e todo apoio dado.*

*Aos colegas de laboratório pela ajuda e suporte em todos os momentos.*

*A Deus, por ter colocado em meu caminho tantas pessoas boas.*

## Sumário

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução.....                                                       | 10 |
| 2. Objetivos.....                                                        | 14 |
| 2.1 Geral.....                                                           | 14 |
| 2.2 Específicos.....                                                     | 14 |
| 3. Materias e métodos.....                                               | 14 |
| 3.1 Origem das amostras.....                                             | 14 |
| 3.2 Obtenção das amostras.....                                           | 15 |
| 3.3 Etapa química .....                                                  | 15 |
| 3.3.1 Obtenção do extrato bruto de <i>Abrus precatorius</i> .....        | 15 |
| 3.3.2 Purificação da abrina.....                                         | 15 |
| 3.4 Animais.....                                                         | 16 |
| 3.5 Grupos de estudo.....                                                | 16 |
| 3.6 Testes biológicos <i>in vivo</i> .....                               | 17 |
| 3.6.1 Inoculação das células tumorais.....                               | 17 |
| 3.6.2 Inoculação intratumoral das substâncias.....                       | 18 |
| 3.6.3 Obtenção dos tumores e a avaliação do crescimento tumoral...       | 18 |
| 3.7 Testes biológicos <i>in vitro</i> .....                              | 19 |
| 3.7.1 Obtenção das células do exsudato peritoneal.....                   | 19 |
| 3.7.2 Obtenção dos linfócitos esplênicos e sobrenadante de cultura....   | 19 |
| 3.7.3 Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal | 20 |
| 3.7.4 Avaliação da viabilidade celular de linfócitos esplênicos.....     | 21 |
| 3.7.5 Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO).....                | 22 |
| 3.8 Determinação de citocinas.....                                       | 23 |

|     |                                                                                                      |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.9 | Análise de resultados.....                                                                           | 24 |
| 4.  | Resultados e discussão.....                                                                          | 25 |
| 4.1 | Avaliação da taxa de inibição do crescimento tumoral.....                                            | 25 |
| 4.2 | Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal.....                              | 27 |
| 4.3 | Avaliação da viabilidade celular de linfócitos esplênicos em presença das substâncias em estudo..... | 29 |
| 4.4 | Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO).....                                                  | 31 |
| 4.5 | Determinação de citocinas.....                                                                       | 33 |
| 5.  | Conclusão.....                                                                                       | 40 |
| 6.  | Referências bibliográficas.....                                                                      | 41 |

## Resumo

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. Os tumores de mama e colo do útero são os mais frequentes no sexo feminino. Neste estudo, avaliou-se o efeito tóxico de injeções intratumorais de abrina e pulchelina com ou sem  $\beta$ -D-galactose sobre o desenvolvimento do tumor mamário murino, verificando sua influência sobre o sistema imune. Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) abrina, obtida de sementes de *Abrus precatorius*, e pulchelina, de sementes maduras de *Abrus pulchellus* subsp. *tenuiflorus*, foram utilizadas e como droga controle foi usada a Doxorrubicina. As RIPs foram administradas em camundongos fêmeas Balb/c. A partir dos tumores retirados dos animais em estudo, verificou-se o percentual de inibição do crescimento tumoral, medindo-se o tamanho e os pesos dos tumores. A partir de culturas de macrófagos obtidos dos animais de estudo, avaliou-se a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-12 pelas RIPs na presença ou ausência de  $\beta$ -D-galactose. A IL-10 foi quantificada a partir de linfócitos esplênicos. A viabilidade celular foi verificada quando as células foram sujeitas às ações das RIPs. Com base nos resultados obtidos, observou-se que as RIPs não apresentaram potencial antitumoral, pois não houve redução do tamanho do tumor em relação ao controle, exceto pela abrina ( $p < 0,05$ ). Contudo, verificou-se que houve um possível efeito inibitório da toxicidade de abrina e pulchelina pela galactose sobre as células tumorais. As substâncias testadas (abrina, pulchelina e doxorrubicina) nas concentrações utilizadas nos testes de citotoxicidade em macrófagos e linfócitos obtiveram viabilidade celular satisfatória.

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

## **Lista de ilustrações**

Figura 1 – Média dos volumes dos tumores.

Figura 2 – Viabilidade celular de macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos em presença das substâncias em estudo.

Figura 3: Viabilidade celular de linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos em presença das substâncias em estudo.

Figura 4 – Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.

Figura 5 – Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-12 por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.

Figura 6 - Efeito das abrina e abrina acrescida de galactose sobre a produção de IL-12 por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos

Figura 7 – Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.

Figura 8 – Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-10 por linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos.

Figura 9: Efeito da abrina e abrina acrescida de galactose em estudo sobre a produção de IL-10 por linfócitos esplênicos obtidos dos animais.

### **Lista de tabelas**

Tabela 1 – Peso dos tumores após eutanásia dos animais e extração.

## Lista de abreviaturas e siglas

|                                |                                                     |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>ANOVA</b>                   | Análise de variância                                |
| <b>CEMIB</b>                   | Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica |
| <b>CO<sub>2</sub></b>          | Gás carbônico                                       |
| <b>IL</b>                      | Interleucina                                        |
| <b>iNOS</b>                    | Óxido nítrico sintase induzível                     |
| <b>INCA</b>                    | Instituto Nacional do Câncer                        |
| <b>LPS</b>                     | Lipopolissacarídeo                                  |
| <b>MEM</b>                     | Minimum Essencial Medium                            |
| <b>NK</b>                      | Células <i>natural killer</i>                       |
| <b>NO</b>                      | Óxido nítrico                                       |
| <b>RCM</b>                     | Receptores colinérgicos muscarínicos                |
| <b>RIP</b>                     | Proteínas inibidoras de ribossomos                  |
| <b>RPMI</b>                    | Roswell Park Memorial Institute (culture medium)    |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Fator de necrose tumoral alfa                       |

## 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. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, sendo o tipo mais comum entre as mulheres, chegando a responder por 22% de novos casos a cada ano. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 52.680 novos casos de câncer de mama foram estimados para 2012, e em 2010, foram registradas 12.705 mortes em mulheres devido à doença. O câncer de mama provavelmente é o tipo mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e progressividade e, sobretudo pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal (INCA, 2013).

Diversos modelos experimentais, utilizando linhagens de células tumorais humanas e murinas, têm sido usados na pesquisa de novos medicamentos para o tratamento dos mais diversos tipos de cânceres. A linhagem LM3 é obtida a partir de cultura primária de adenocarcinoma de mama murino (M3) em Balb/c (BAL DE KIER JOFFÉ et al., 1983). Estas células expressam constitutivamente altas concentrações de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) em comparação às células do epitélio mamário murino normal (NMuMG) (ESPAÑOL et al., 2002). Diversos trabalhos experimentais têm utilizado a linhagem de adenocarcinoma de mama murino LM3 tanto em experimentos *in vitro* (CARLI et al., 2009) como *in vivo* (CASAS et al., 2008; CARNEVALE et al., 2007; QUAGLINO et al., 2007; FISZMAN 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 autodestrutivas (KORKAYA et al., 2003). A função do sistema imune na proteção contra o câncer é demarcada por dois conceitos extremos. Segundo a Teoria da Imunovigilância, as células imunocompetentes desempenham as funções mais importantes no controle do crescimento tumoral, sendo encarregadas de detectar e eliminar as células neoplásicas. Em contrapartida, baixos níveis de estimulação do sistema imunológico produzem uma resposta que aumenta o crescimento tumoral (JAKÓBISIAK et al., 2003). Assim, as células que resistem à resposta imune são capazes de sofrer proliferação, o que leva a um desenvolvimento do tumor.

Tanto a imunidade inata quanto a adaptativa são responsáveis pelos efeitos antitumorais, como atividade dos seguintes elementos: células *natural killer* (NK), células T *natural killer*, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, citocinas, anticorpos específicos e células T citotóxicas específicas (KORKAYA et al., 2011). Os macrófagos, uma vez ativados, liberam substâncias como óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e citocinas. O óxido nítrico é produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), podendo apresentar diversas atividades, dentre elas antibacteriana, antiparasitária e antiviral. Porém, o descontrole na síntese de NO está implicado na patogênese da hipertensão, sepse, doenças cerebrais degenerativas e câncer. Efeitos adversos do NO *in vivo* foram observados por EDWARDS et al. (1996), em uma linhagem de células de tumor mamário murino (EMT-6). O tratamento destas células com LPS/IFN- $\gamma$  estimulou a produção de NO e inibiu o crescimento das células em 50%. Paralelamente, a inoculação dessas culturas de células (EMT-6) em camundongos resultou no aparecimento de tumores

subcutâneos e metástases pulmonares duas vezes maiores que nos controles. Na presença de um inibidor da iNOS, o crescimento das células, o tamanho do tumor e o número de metástases não diferiram dos controles (COSTA et al., 2003).

Além do óxido nítrico, outros mediadores inflamatórios são produzidos pelas células imunes. O fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produzido por macrófagos, possui atividade antitumoral contra várias linhagens tumorais, mas esta citocina pode aumentar a capacidade de invasão da célula tumoral. Podemos notar dessa forma que as citocinas interagem entre si criando um ambiente favorável ou desfavorável ao crescimento tumoral. A interleucina 12 (IL-12) medeia a resposta imune celular, alterando o caráter do microambiente tumoral, tornando-o antiangiogênico e abolindo as propriedades imunossupressoras (SZALA et al., 2010). As células T helper 1 (Th1) produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2), IL-12 (também produzida por macrófagos) e TNF- $\alpha$ , e são eficientes na resposta imune celular, via ativação de macrófagos, possivelmente atuantes no combate ao câncer. As células T helper 2 (Th2) liberam interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), que ativam principalmente a imunidade humoral (RENGARAJAN et al., 2000). A citocina IL-10 possui ainda funções imunossupressoras, como inibição de macrófagos ativados, exercendo um importante papel na homeostasia da resposta imune. Assim, age desta forma a favor do crescimento tumoral e é encontrada em maiores concentrações em neoplasias mais avançadas (OUYANG et al., 2011).

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) são proteínas de plantas capazes de remover um ou mais resíduos de adenina do RNAr, inibindo a síntese de proteínas, inativando ribossomos de células eucarióticas. Também podem danificar outros substratos polinucleotídeos. 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 (GADADHAR et al., 2013). As RIPS são usadas frequentemente na agricultura e na medicina devido à sua atividade antiviral e a capacidade de se comportarem como imunoconjugados (imunotoxinas), tornando-se tóxicas às células alvo, podendo ajudar durante a terapia (WALSH et al., 2013).

*Abrus precatorius* e *Abrus pulchellus* sbsp. *tenuiflorus* são espécies sub-arbustivas brasileiras e a partir delas, obtém-se abrina e pulchelina, respectivamente. Estas são proteínas inativadoras de ribossomos do tipo II que possuem duas cadeias peptídicas unidas por ponte dissulfídicas, sendo que uma das cadeias possui atividade enzimática N-glicosilase (cadeia A), e a outra cadeia, possui atividade lectínica (cadeia B) (GADADHAR et al., 2013). A abrina e pulchelina possuem afinidade por  $\beta$ -D-galactose (MATOS, 2000; GOTO et al., 2007), carboidrato presente na superfície de muitas células eucarióticas. Esta característica atribui às RIPS a capacidade de se ligar a glicoproteínas e glicolípídeos presentes na superfície das células, sendo então internalizadas por diferentes mecanismos. Todavia, o tráfico de um imunoconjugado para o interior da célula é dependente de receptor e pode ser diferente de célula para célula (GADADHAR et al., 2013).

No presente estudo, administraram-se intratumoralmente as RIPS, na presença e ausência da  $\beta$ -D-galactose, com o intuito de avaliar tanto a resposta imunológica do hospedeiro quanto suas funções relacionadas com a redução do tumor. Escolheu-se a via intratumoral devido à alta toxicidade das RIPS pretendendo-se, desta maneira, manter grande parte de seus efeitos tóxicos limitado ao ambiente

tumoral, diminuindo-se, assim, os efeitos colaterais provocados pela toxicidade das proteínas no organismo hospedeiro.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Avaliar *in vivo* a ação antitumoral da administração intratumoral de abrina e pulchelina contra o tumor de mama e a possível ação inibidora da toxicidade por  $\beta$ -D-galactose. Verificar *in vitro* a influência da presença do tumor tratado, ou não, com as RIPs sobre o sistema imune.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar a taxa de inibição do crescimento dos tumores tratados com os compostos.
- Determinar a toxicidade da abrina e pulchelina na presença ou ausência de  $\beta$ -D-galactose sobre células do exsudato peritoneal e linfócitos esplênicos.
- Avaliar a produção de Óxido Nítrico (NO) pelas células macrofágicas pelas RIPs na presença ou ausência de  $\beta$ -D-galactose, como mediador participante do processo imunológico/cancerígeno.
- Determinar a estimulação da produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 pelas RIPs na presença ou ausência de  $\beta$ -D-galactose.

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1 Origem das amostras**

As toxinas abrina e pulchelina foram extraídas das sementes de *Abrus precatorius* e *Abrus pulchellus* subsp. *tenuiflorus*, respectivamente. Sementes

maduras de *Abrus pulchellus* subsp. *tenuiflorus* foram coletadas de plantas cultivadas no Instituto de Física de São Carlos – USP. 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.

### **3.2 Obtenção das amostras**

A pulchelina foi fornecida pela professora Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, do Instituto de Física de São Carlos - USP.

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.

### **3.3 Etapa química**

#### **3.3.1 Obtenção do extrato bruto de *Abrus precatorius***

As sementes foram desprovidas da casca e depois moídas. Em seguida, a farinha das sementes passou por um processo de deslipidação através de maceração em acetona. Misturou-se 10g farinha com 100 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) e agitou-se constantemente por 3 horas. A suspensão obtida foi centrifugada a 12.000 x g durante 20 minutos à 4°C e, em seguida, filtrada em papel de filtro qualitativo, sendo então denominada de extrato bruto.

### 3.3.2 Purificação da abrina

O extrato bruto foi aplicado a uma coluna de galactomanana, obtida de *Adenanthera pavonina* L., estabilizada com solução fisiológica. Lavou-se com solução fisiológica, obtendo-se o pico I. Aplicou-se uma solução de glicina 0,1M, obtendo-se o pico II (onde se encontra a proteína). A absorbância do pico II foi detectada em espectrofotômetro utilizando filtro de 280nm. As soluções foram acondicionadas em centriprep número 10 (Millipore), centrifugando-se em centrífuga refrigerada (Thermo Scientific, EUA) a 16.000 x g a 4°C por 90 minutos para concentrar as soluções de proteína. Após concentradas, adicionou-se solução salina tamponada com fosfatos (PBS) em pH 7,2, centrifugando a 3.000 x g a 4°C por 90 minutos, para a remoção total da glicina na amostra. A absorbância da amostra foi detectada em espectrofotômetro utilizando filtro de 280nm. A amostra foi filtrada em membrana de 0,2µm e então, acondicionada em freezer -20° C para posterior utilização.

### 3.4 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas 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 sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, parecer n° 40/2008.

### 3.5 Grupos de estudo

A distribuição dos animais foi feita da seguinte maneira:

**Grupo I:** controle tumoral – foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi administrado PBS.

**Grupo II:** foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de abrina.

**Grupo III:** foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de pulchelina.

**Grupo IV:** foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de Doxorrubicina.

**Grupo V:** foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de abrina e  $\beta$ -D-galactose.

**Grupo VI:** foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de pulchelina e  $\beta$ -D-galactose.

**Grupo VII:** foram inoculadas as células LM3 no camundongo e foi realizada a administração intratumoral de  $\beta$ -D-galactose.

**Grupo VIII:** animais normais – sem indução de tumor e tratamento.

### 3.6 Testes biológicos *in vivo*

#### 3.6.1 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 camundongos fêmeas 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  $5 \times 10^6$  células/ml. 200  $\mu$ l desta suspensão foram inoculados subcutaneamente no flanco esquerdo de cada camundongo.

### 3.6.2 Inoculação intratumoral das substâncias

Abrina (7,5  $\mu$ g/kg), pulchelina (7,5  $\mu$ g/kg) na presença e ausência de  $\beta$ -D-galactose 0,2M, e Doxorrubicina (6 mg/kg) foram inoculadas nos tumores dos animais uma 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.

### 3.6.3 Obtenção dos tumores e avaliação do crescimento tumoral

O peso dos camundongos e o tamanho do tumor foram acompanhados e medidos em dias alternados até o tumor atingir o tamanho de 5 mm. Sete dias após o início do tratamento, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>.

Após a remoção dos tumores, eles foram medidos com paquímetro digital (Mitytoyo) e pesados. O volume do tumor foi determinado pela medida do maior diâmetro (a) e do menor diâmetro (b) do tumor, 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 foi calculada utilizando-se a fórmula a seguir:

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

### **3.7 Testes biológicos *in vitro***

#### **3.7.1 Obtenção das células do exsudato peritoneal**

Após 4 dias do término do tratamento dos tumores foram inoculados 3 mL de tioglicolato de sódio a 3% (Difco Lab. LTDA) que corresponde a 3 dias antes dos animais serem eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, com o intuito de concentrar as células na cavidade peritoneal. Estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (Veco), expondo o peritônio. Sofreram inoculação de 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 ressuspendido após a última lavagem em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2 $\beta$ -mercaptoetanol a  $2 \times 10^{-5}$  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).

#### **3.7.2 Obtenção de linfócitos esplênicos e do sobrenadante de cultura**

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  $5 \times 10^6$  células/mL para realização dos testes.

### **3.7.3 Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal**

A técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi empregada para a determinação da viabilidade celular das células, garantindo verificação da atividade e integridade mitocondrial, interpretada como uma medida de viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Esta metodologia baseou-se na redução do sal de MTT por enzimas microssomais e também pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis. Os produtos desta redução foram cristais de formazana, insolúveis e de cor púrpura, que se acumularam nas células devido à 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 possibilitou 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  $5 \times 10^6$  células/mL. 100  $\mu$ L dessas suspensões foram adicionados a placas de 96 cavidades (Corning), 100  $\mu$ L das RIPs (abrina e pulchelina) ou Doxorrubicina em diferentes concentrações: 1,5 ng/mL (concentração no poço), ou 50  $\mu$ L das RIPs na concentração citada acima e 50  $\mu$ L de  $\beta$ -D-galactose 0,2 M, ou 50  $\mu$ L de  $\beta$ -D-galactose 0,2 M e 50  $\mu$ L de RPMI-C, ou 100  $\mu$ L LPS a 10  $\mu$ 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 CO<sub>2</sub>. 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 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 (Mosmann, 1983).

#### **3.7.4 Avaliação da viabilidade celular de linfócitos esplênicos**

Alíquotas de 100 µl das suspensões de linfócitos, obtidas na concentração, conforme item 3.7.2, foram adicionadas em placas de 96 cavidades para cultivo de tecidos (Corning, Inc., EUA). Aos linfócitos foram adicionados 100 µl de abrina, pulchelina ou Doxorrubicina, em diversas concentrações, ou 50 µl de abrina ou pulchelina nas mesmas concentrações e 50 µl de β-D-galactose 0,2M, ou 50 µl de β-D-galactose e 50 µl de RPMI-C, ou 100 µl Concanavalina A 0,5µg/ml ou somente meio de cultura.

A incubação foi feita em estufa a 37°C, com tensão de 7,5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, EUA) por 24h. A seguir, foram adicionados 20 µl 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 CO<sub>2</sub> (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).

### **3.7.5 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 diazotação 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 et al. (1982).

As células do exsudato peritoneal dos animais foram obtidas como descrito no item 3.7.1 e ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL em RPMI-C. Alíquotas de 100µL foram adicionadas às placas de cultura de tecido de fundo plano contendo 96 cavidades (Corning, Inc.) e acrescentaram-se 100µL de abrina, puchelina ou doxorubicina em concentração que demonstraram viabilidade celular acima de 80% em macrófagos, ou 50 µL de abrina ou pulchelina na concentração acima citada, 50µL de galactose 0,2 M, ou 50 µL de galactose 0,2M e 50 µL de RPMI-C, como controle do açúcar. 100 µL de LPS foram adicionados às células a 10 µg/mL e 100µL de RPMI-C, como controle positivo ou somente RPMI-C, como controle de células. As placas foram incubadas por 24h em estufa a 37°C em atmosfera úmida com tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific). Alíquotas de 50µL de cada amostra foram transferidas para outra placa de cultura de células não estéril,

contendo 96 cavidades de fundo planas (Corning, Inc.) e acrescidas 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  $\mu\text{mols}$  de nitrito/mL.

### **3.8 Determinação de citocinas**

As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-12 foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais, (item 3.7.1), enquanto que IL-10 foi quantificada nos sobrenadantes de culturas de linfócitos (item 3.7.2), ambas através do teste imunoenzimático ELISA de captura. Para isso, o Kit BD OptEIA (BD Pharmigen) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 cavidades (Corning, Inc.) foram adsorvidas com anticorpos de captura, monoclonal, anticitocina de camundongo (100  $\mu\text{L}$  por cavidade), na concentração adequada para cada citocina em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,5 (TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12). As placas foram incubadas “overnight” à temperatura de 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com 300  $\mu\text{L}$  de PBS, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T), e posteriormente foram bloqueadas com 200  $\mu\text{L}$ /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  $\mu\text{L}$  do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As

placas ficaram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas 5 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 µL/cavidade de anticorpo monoclonal (anticorpo anticitocina de camundongo) marcado com biotina e estreptavidina-HRP, diluído à concentração adequada para cada citocina em PBS com 10% soro fetal bovino. As placas ficaram incubadas à temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas 5 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100µL/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 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.

### **3.9 Análise dos resultados**

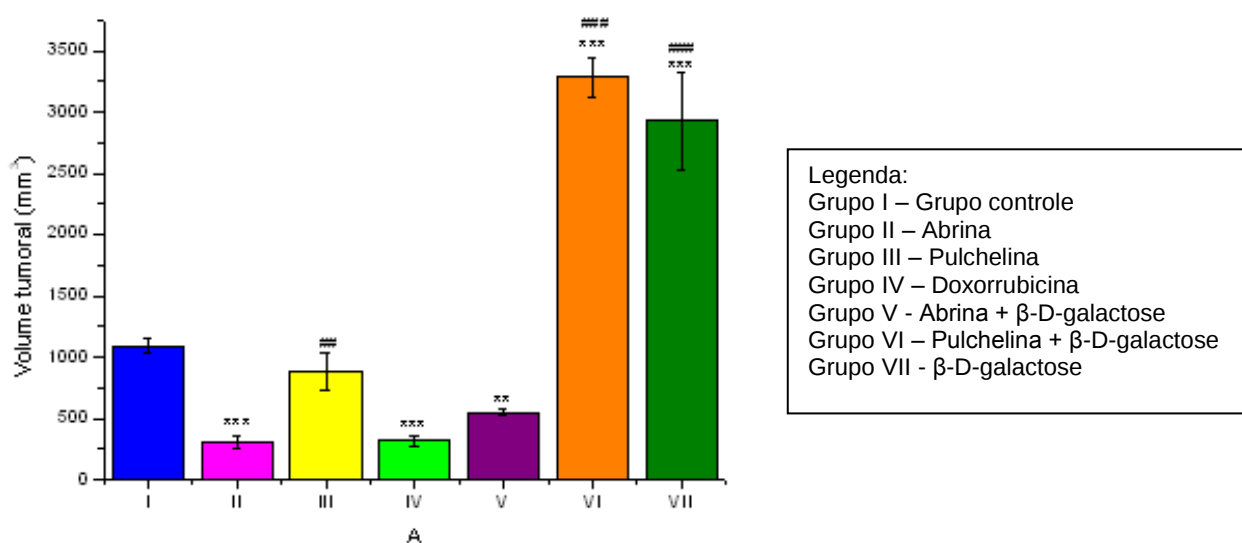
A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat aplicando-se análise de variância (ANOVA) com determinação do nível de significância para  $p < 0,05$ , e através de comparações múltiplas pelo teste de Tukey.

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 5.0.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 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 realizou-se o tratamento, de acordo com a especificação de cada grupo, constituindo a utilização de abrina (7,5 µg/kg), pulchelina (7,5 µg/kg) ambas na presença e ausência de β-D-galactose 0,2M, doxorrubicina (6 mg/kg) e PBS. Os animais foram eutanasiados após 7 dias do tratamento. Após o sacrifício, os tumores foram removidos, medidos com paquímetro digital (Mitytoyo) e pesados.



**Figura 1: Média dos volumes dos tumores.** A média foi calculada através do volume de 4 animais de cada grupo. \* p<0,05 e \*\*\* p< 0,001 quando comparado com o grupo I (controle tumoral), e ### p<0,001 e ## p<0,001 em relação ao grupo IV (droga padrão - doxorrubicina).

Os animais que receberam somente β-D-galactose ou pulchelina acrescida de β-D-galactose apresentaram um aumento do volume tumoral quando comparados com os animais que receberam PBS (Figura 1). Os tumores dos animais que

receberam Doxorrubicina (droga padrão) apresentaram menor volume que os animais que receberam abrina ou pulchelina na presença ou ausência da  $\beta$ -D-galactose. Contudo, o grupo tratado com abrina apresentou um volume tumoral (64,62% de inibição do crescimento tumoral) que não difere estatisticamente do grupo que recebeu a droga padrão (73,18% de inibição). Porém, pulchelina não apresentou redução significativa do volume tumoral. Assim, a ordem decrescente dos grupos quanto aos volumes dos tumores é pulchelina +  $\beta$ -D-galactose,  $\beta$ -D-galactose, PBS, pulchelina, abrina +  $\beta$ -D-galactose, abrina, Doxorrubicina.

Em relação ao peso dos tumores avaliado após remoção destes, os tumores dos animais que receberam pulchelina acrescida de galactose e que receberam galactose foram os que apresentaram maior peso, seguido dos animais que receberam PBS (Tabela 1).

**Tabela 1:** Peso dos tumores após eutanásia dos animais e extração.

| Grupos | Peso (g)        |
|--------|-----------------|
| I      | 1,08 $\pm$ 0,11 |
| II     | 0,83 $\pm$ 0,23 |
| III    | 1,02 $\pm$ 0,18 |
| IV     | 0,39 $\pm$ 0,18 |
| V      | 0,91 $\pm$ 0,25 |
| VI     | 2,98 $\pm$ 0,29 |
| VII    | 2,75 $\pm$ 0,93 |

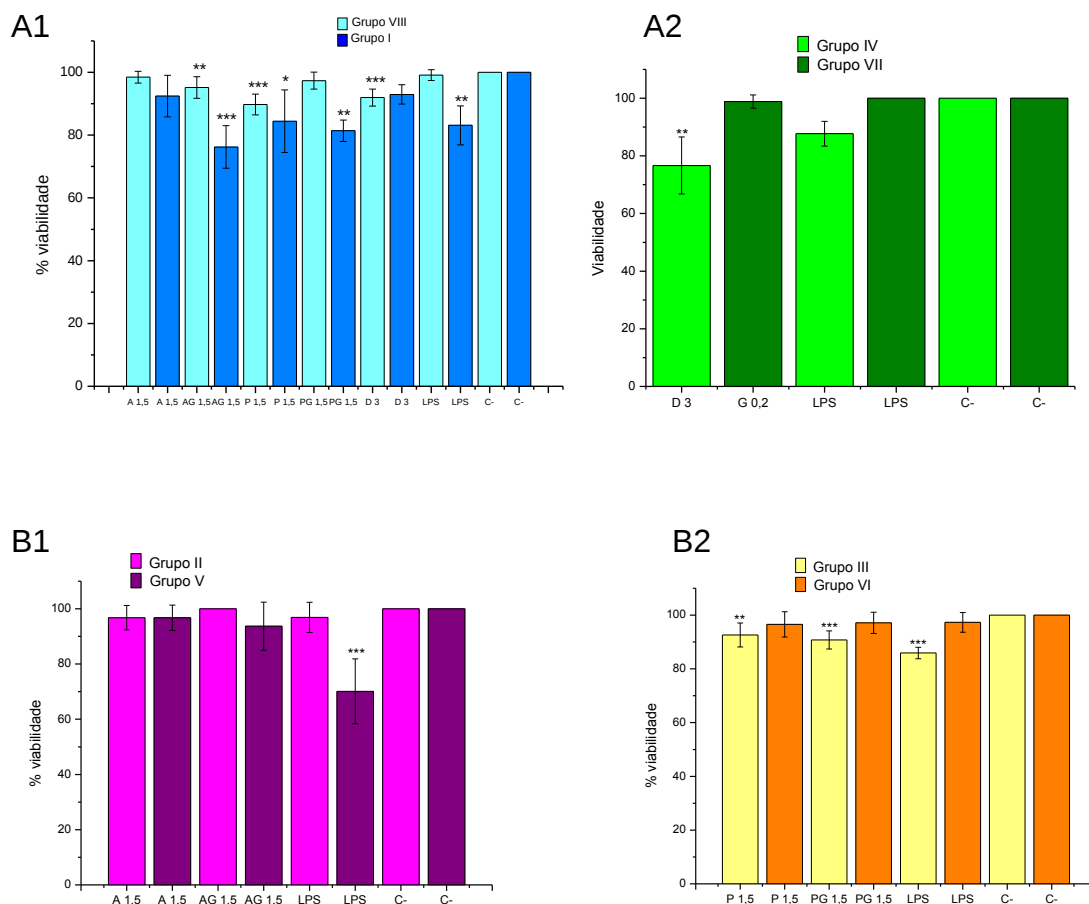
Legenda:  
 Grupo I – Grupo controle  
 Grupo II – Abrina  
 Grupo III – Pulchelina  
 Grupo IV – Doxorrubicina  
 Grupo V - Abrina +  $\beta$ -D-galactose  
 Grupo VI – Pulchelina +  $\beta$ -D-galactose  
 Grupo VII -  $\beta$ -D-galactose

Os tumores tratados com abrina e pulchelina associados à  $\beta$ -D-galactose apresentaram tamanho maior do que os tratados apenas com as RIPs. Isto

evidencia que a  $\beta$ -D-galactose atua na ação da toxicidade das proteínas, reduzindo a influência destas na inibição do crescimento tumoral. Possivelmente, pode haver um efeito de competição entre a  $\beta$ -D-galactose injetada e os resíduos de galactose presentes na superfície das células tumorais pelo sítio de ligação lectínico da abrina e pulchelina. Estas se ligando mais à galactose livre reduziria a internalização das proteínas nas células, resultando em uma redução da ação tóxica das RIPs às células tumorais. Outra hipótese é a que na qual a galactose pode estar agindo como um “alimento” para as células tumorais, pois os animais que foram tratados apenas com a  $\beta$ -D-galactose apresentaram um aumento de volume tumoral em relação do grupo controle. Esta hipótese só poderá ser comprovada com uma análise histopatológica dos tumores.

#### **4.2 Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal**

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



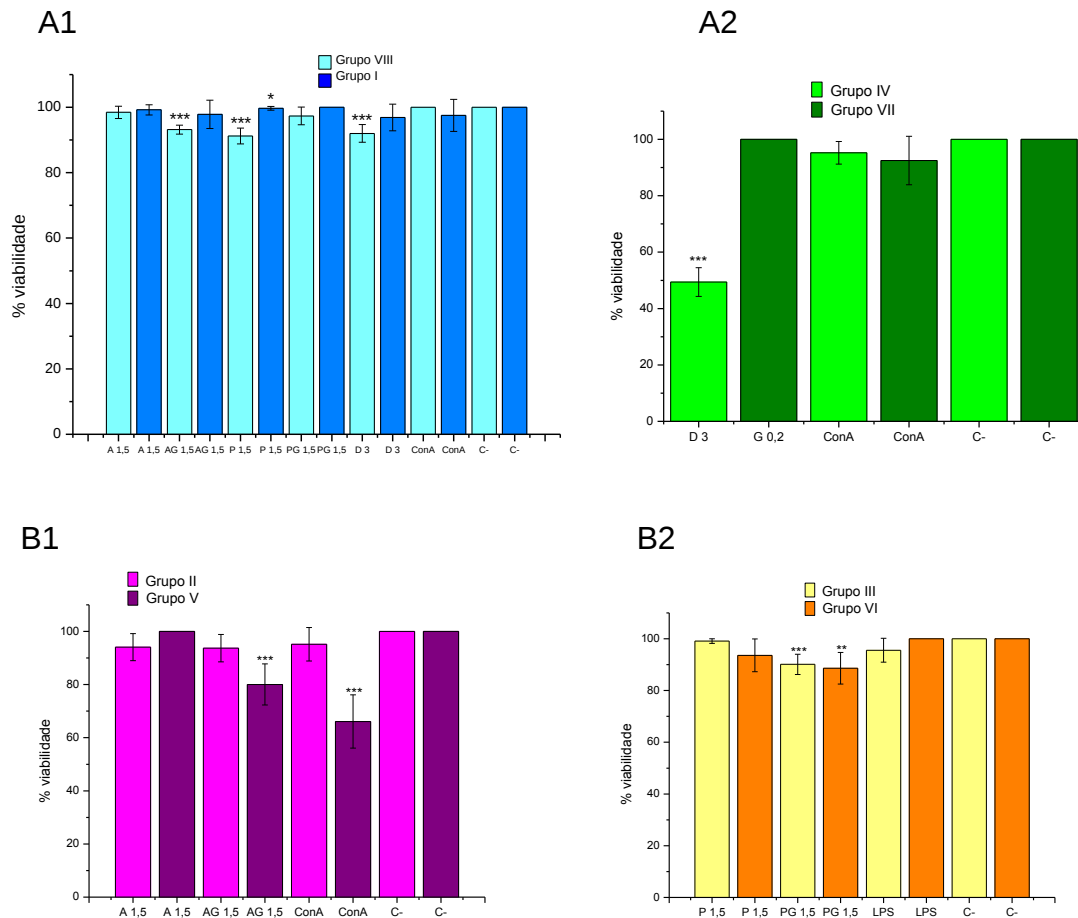
**Figura 2: Viabilidade celular de macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos em presença das substâncias em estudo.** A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão -  $\beta$ -D-galactose, respectivamente). B1 e B2 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/  $\beta$ -D-galactose, e Pulchelina - Pulchelina/  $\beta$ -D-galactose, respectivamente). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), P1,5 (pulchelina 1,5ng/ml), PG1,5 (pulchelina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorrubicina 3 $\mu$ g/ml), e G 0,2 (galactose 0,2M). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C), o que corresponde a 100% de viabilidade celular. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o controle negativo.

De acordo com a Figura 2, 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*, nos testes *in vitro* a presença de  $\beta$ -D-galactose não afetou expressivamente a citotoxicidade de abrina e pulchelina em macrófagos.

#### **4.3 Avaliação da 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 linfócitos foram expostos a todas as substâncias em estudo. O teste de citotoxicidade tem como objetivo comprovar a viabilidade celular dos linfócitos nas concentrações usadas das substâncias em estudo nos demais testes imunológicos.

Na figura 3, pode-se observar que a viabilidade celular dos linfócitos expostos às concentrações utilizadas na obtenção de sobrenadante para dosagem de citocinas foi superior a 80%.

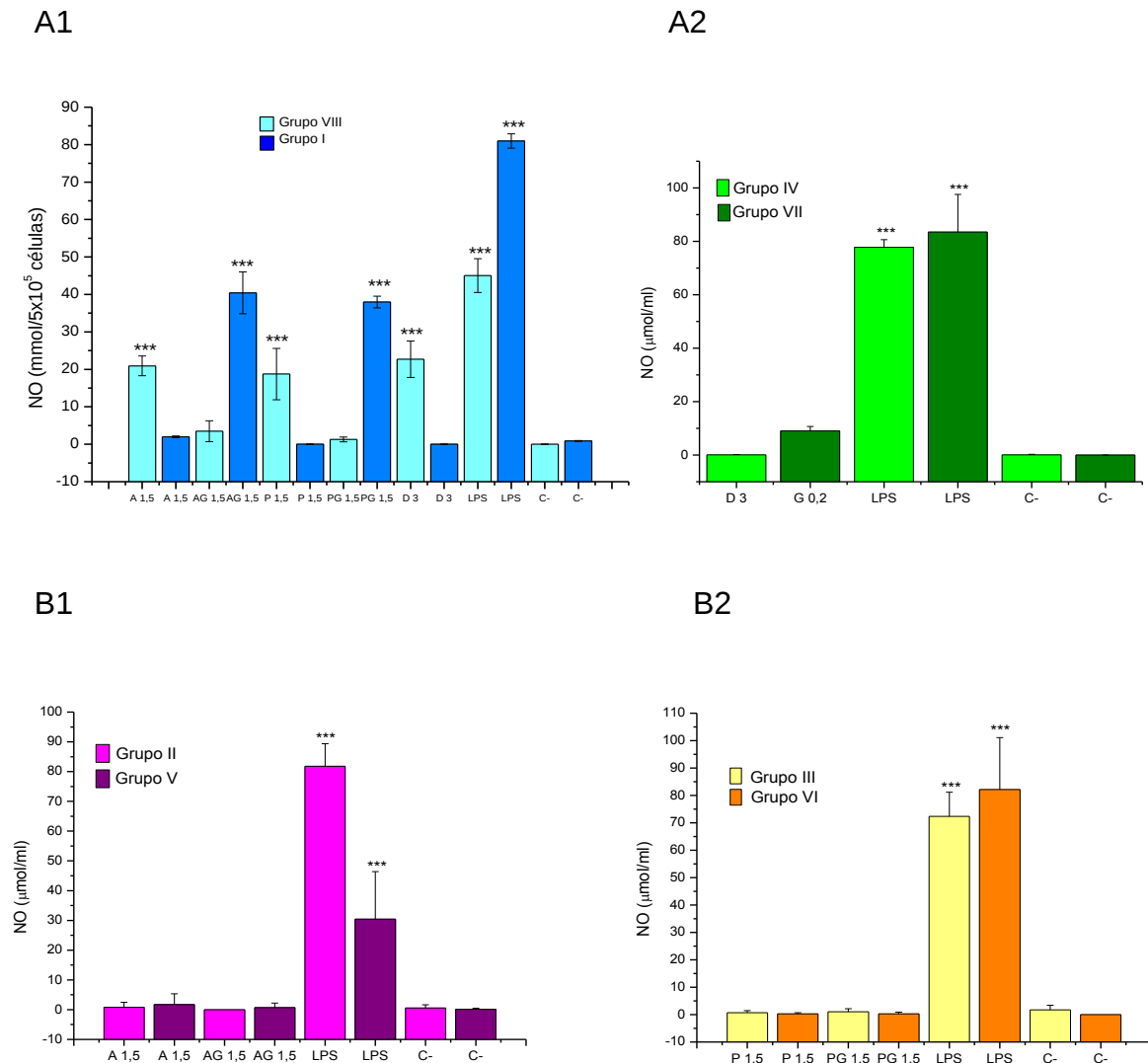


**Figura 3: Viabilidade celular de linfócitos esplênicos obtidos dos animais dos diferentes grupos em presença das substâncias em estudo.** A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 e B2 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose, e Pulchelina - Pulchelina/galactose, respectivamente). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), P1,5 (pulchelina 1,5ng/ml), PG1,5 (pulchelina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorrubicina 3µg/ml), e G 0,2 (galactose 0,2M) Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C), o que corresponde a 100% de viabilidade celular. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o controle negativo.

#### 4.4 Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO)

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.

Após 24 horas de incubação, abrina 1,5 ng/ml, pulchelina 1,5ng/ml e doxorrubicina 3µg/ml induziram níveis significativos de óxido nítrico somente no grupo VIII ( $p<0,001$ ), abrina 1,5 ng/ml e pulchelina 1,5ng/ml acrescidas de galactose 0,2M induziram NO no grupo I ( $p<0,001$ ) (**Figura 4**).



**Figura 4: 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 -  $\beta$ -D-galactose, respectivamente). B1 e B2 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/  $\beta$ -D-galactose, e Pulchelina - Pulchelina/  $\beta$ -D-galactose, respectivamente). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), P1,5 (pulchelina 1,5ng/ml), PG1,5 (pulchelina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorrubicina 3 $\mu$ g/ml), e G 0,2 (galactose 0,2M). Solução de LPS 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 variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

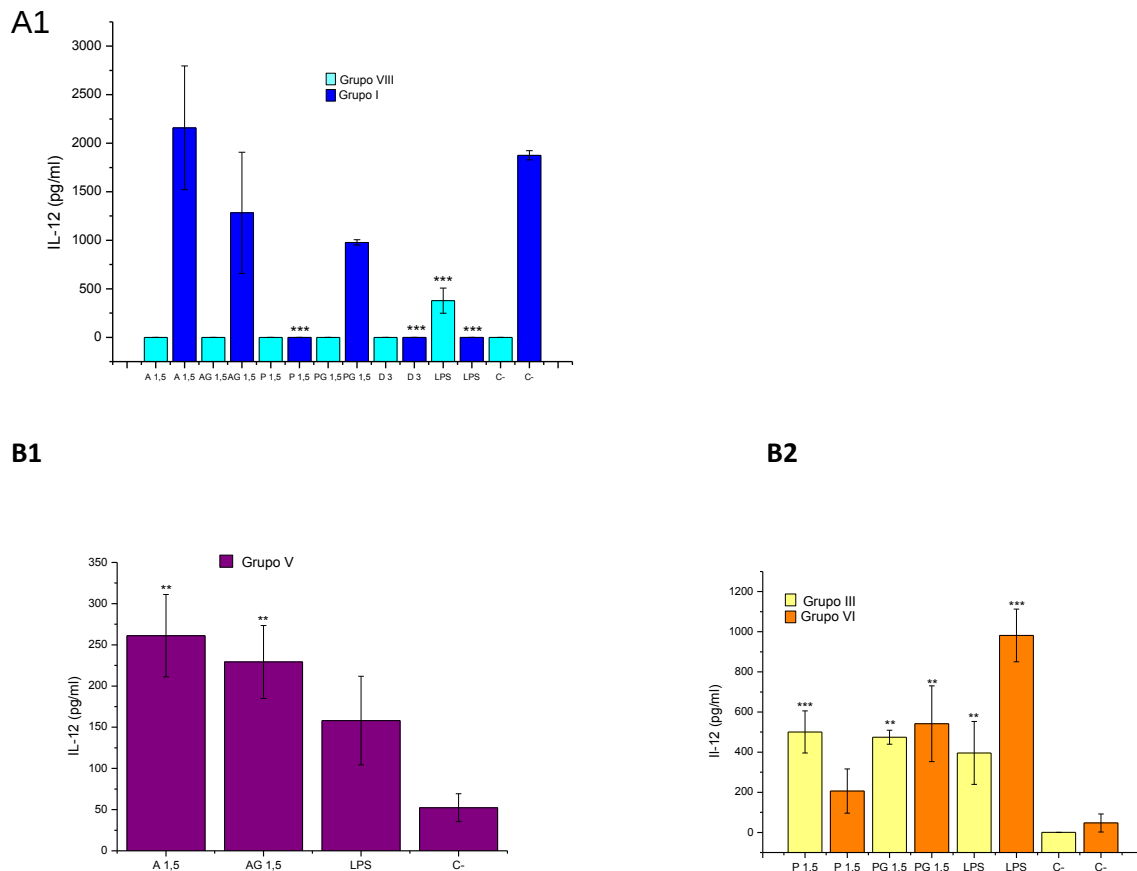
Em macrófagos obtidos dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais abrina, pulchelina e doxorubicina só foram capazes de induzir concentrações significativas de NO nos animais saudáveis, enquanto que abrina e pulchelina associadas à galactose 0,2M só induziram nos macrófagos de animais pertencente ao grupo controle tumoral. Estudos demonstram que baixas concentrações de NO induzem diferenciação de células Th1, mas não de células Th2, porém altas concentrações de NO inibem resposta Th1 e aumentam respostas Th2 (GAO, 2010).

#### **4.5 Determinação de citocinas**

Os macrófagos obtidos dos animais dos diferentes grupos experimentais foram reexpostos às 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. Solução de LPS e a Concanavalina A foram utilizados como controle positivo e somente meio de cultura celular RPMI-1640-C, como controle negativo.

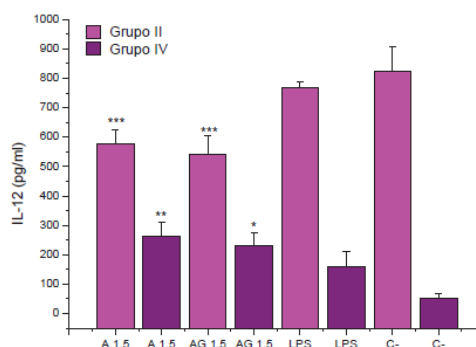
Infelizmente, não foi possível realizar a dosagem das citocinas IL-12 e IL-10 estudadas no grupo II por problemas técnicos no dia do experimento.

Em relação à produção de IL-12, no grupo I, nenhuma das substâncias induziu produção significativa de IL-12, enquanto que pulchelina, doxorubicina e LPS tiveram uma produção significativamente menor que o controle de células ( $p < 0,001$ ). Abrina e abrina acrescida de  $\beta$ -D-galactose induziram produção significativa de IL-12 ( $p < 0,01$ ); pulchelina induziu produção somente no grupo III e pulchelina acrescida de  $\beta$ -D-galactose teve moderada indução nos grupo III e VI. Nos grupos IV e VII, as substâncias não foram capazes de induzir a produção de IL-12 (**Figura 5**).



**Figura 5: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de IL-12 por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.** Solução de LPS e Concanavalina A foi utilizada como controle positivo (LPS). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), P1,5 (pulchelina 1,5ng/ml), PG1,5 (pulchelina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M) e D3 (doxorubicina 3µg/ml). Como controle negativo (C-), foi utilizado apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). A análise estatística foi realizada através de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Tukey. \*\*\* p<0,001, quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

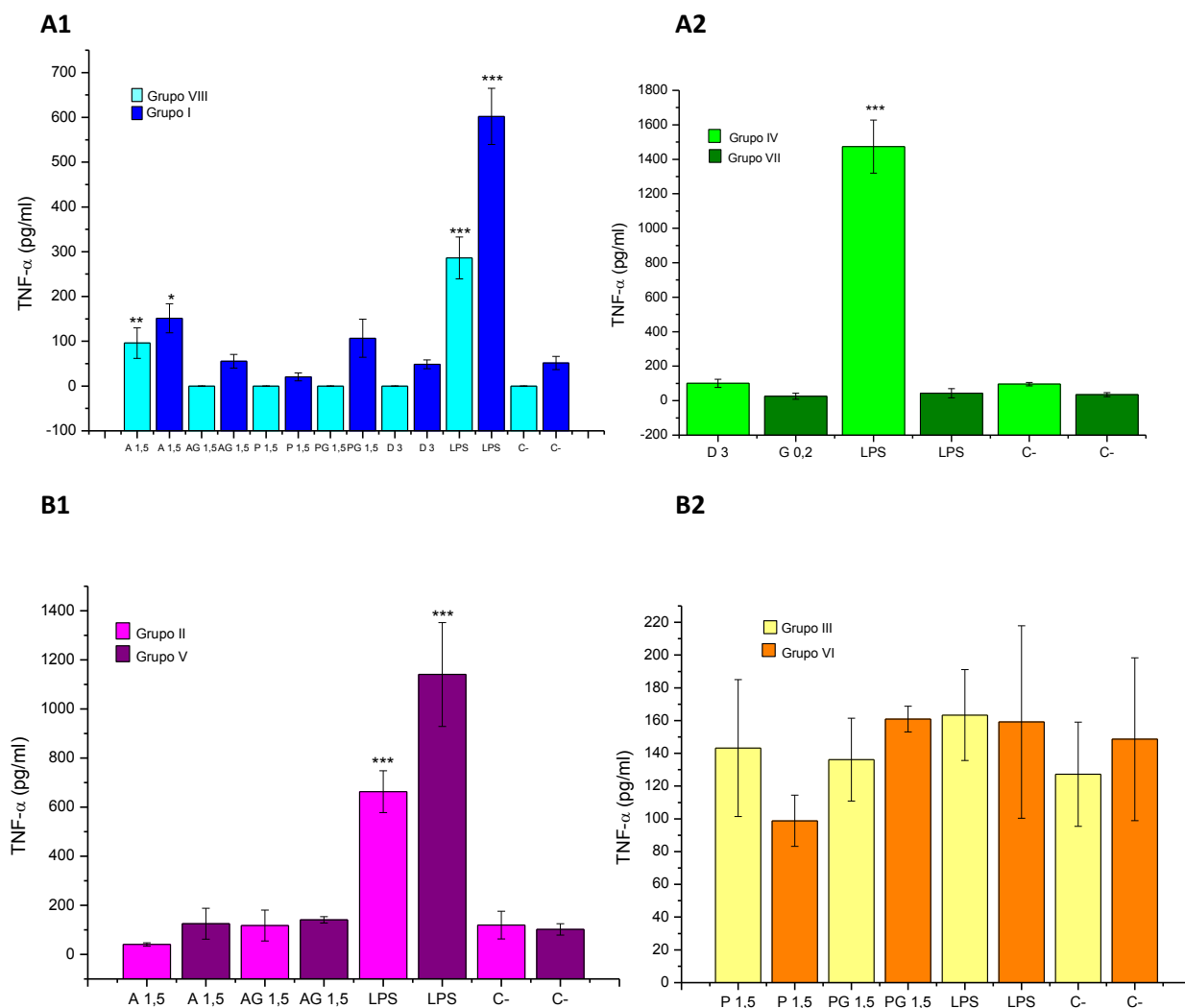
Em outro estudo obteve-se que o grupo da abrina (grupo II) e o controle negativo tiveram alta produção de IL-12, sendo que abrina 1,5ng/ml e abrina 1,5 ng/ml acrescida de  $\beta$ -D-galactose 0,2 M tiveram produção significativamente menor que as células em presença somente de meio RPMI-c (MATOS, 2012).



**Figura 6: Efeito das abrina e abrina acrescida de galactose sobre a produção de IL-12 por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.** Solução de LPS e Concanavalina A 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 variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$ , quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

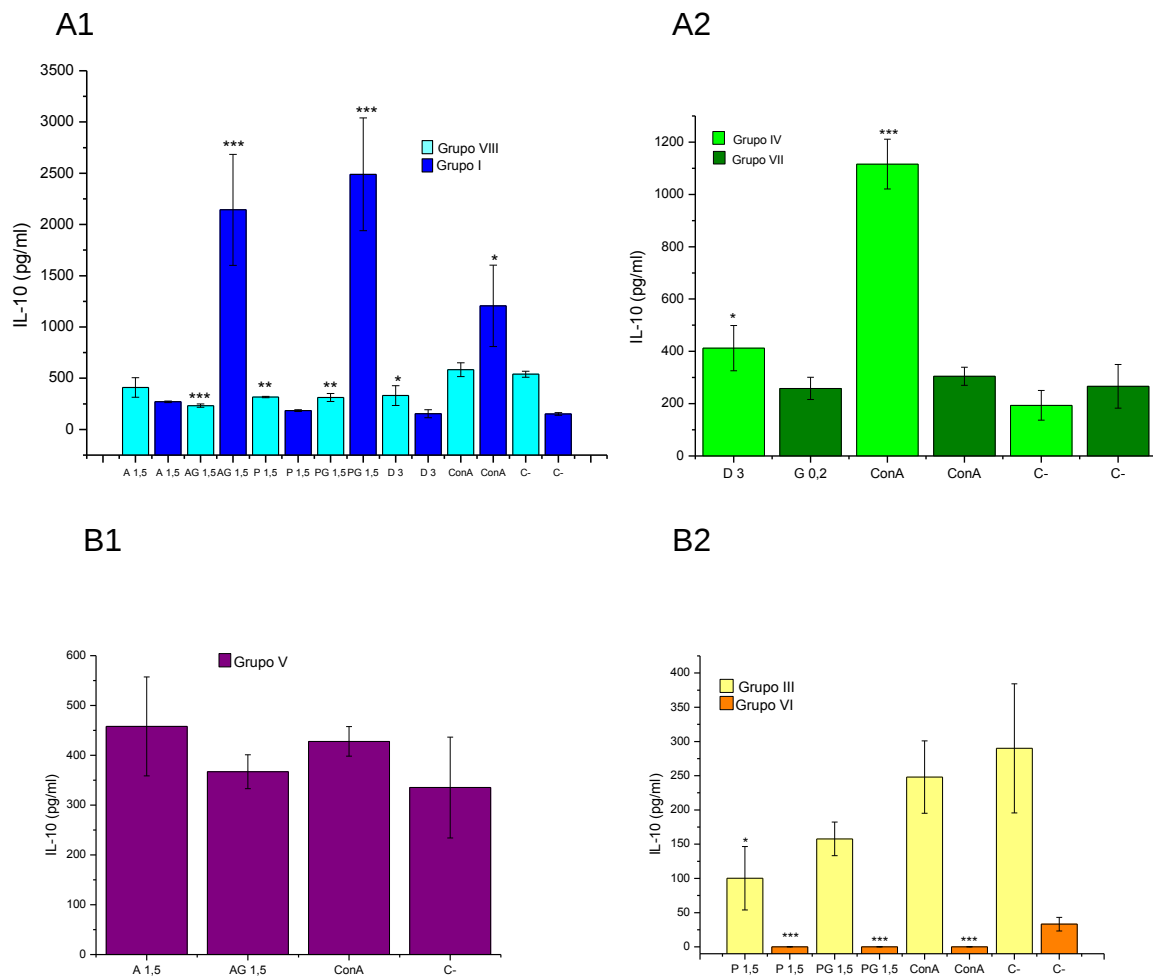
Fonte: (MATOS, 2012).

Em relação à produção de  $\text{TNF-}\alpha$ , nos grupos I e VIII, abrina apresentou leve e moderada produção desta citocina ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Pulchelina e pulchelina acrescida de  $\beta$ -D-galactose induziram de forma leve e alta a produção de  $\text{TNF-}\alpha$ , enquanto que as demais substâncias nos grupos experimentais não foram capazes de induzir a produção da citocina a nível significante (**Figura 7**). Em todos os grupos testados, os macrófagos peritoneais mantiveram a capacidade de responder ao efeito estimulante da produção do  $\text{TNF-}\alpha$  induzida por LPS, com exceção do grupo VII.



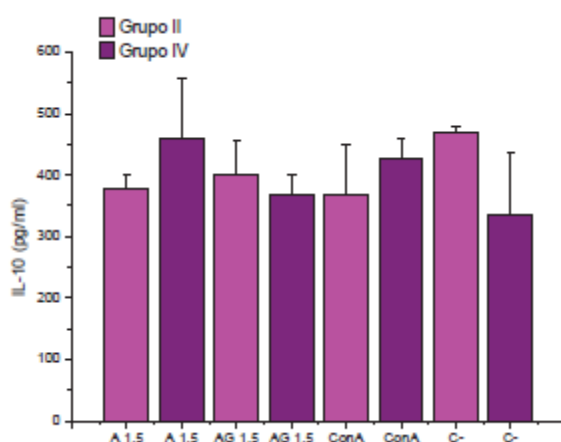
**Figura 7: Efeito das substâncias em estudo sobre a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos diferentes grupos.** A1 e A2 são os grupos controles (Normal - Tumoral e Droga Padrão - Galactose, respectivamente). B1 e B2 são os grupos experimentais (Abrina, e Pulchelina, respectivamente). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), P1,5 (pulchelina 1,5ng/ml), PG1,5 (pulchelina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorubicina 3 $\mu$ g/ml), e G 0,2 (galactose 0,2M). Solução de LPS 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 variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Tukey. \*\*\* p<0,001, ### p<0,001, # p<0,05 quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

A IL-10 foi quantificada a partir de linfócitos esplênicos, devido à sua ação imunossupressora de macrófagos ativados. Em relação à produção desta citocina, pode-se observar que, no grupo I, abrina e pulchelina acrescidas de galactose 0,2M apresentaram alta produção ( $p < 0,001$ ); no grupo III, pulchelina teve uma significativa reduzida na produção desta citocina em relação à produção pelas células com meio RPMI-c; no grupo IV, doxorubicina induziu uma leve produção de IL-4 ( $p < 0,05$ ); e no grupo VIII, doxorubicina, abrina acrescida de  $\beta$ -D-galactose 0,2M, pulchelina acrescida ou não de  $\beta$ -D-galactose 0,2M tiveram uma produção muito a moderadamente menor desta citocina em relação a produção quando só havia meio de cultura . Nos demais grupos (grupos VI e VII) as substâncias em estudo não estimularam a produção significativa de IL-10. **(Figura 8).**



**Figura 8: 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 e B2 são os grupos experimentais (Abrina – Abrina/galactose, e Pulchelina - Pulchelina/galactose, respectivamente). Sendo A1,5 (abrina 1,5ng/ml), AG1,5 (abrina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), P1,5 (pulchelina 1,5ng/ml), PG1,5 (pulchelina 1,5ng/ml acrescida de galactose 0,2M), D3 (doxorrubicina 3µg/ml), e G 0,2 (galactose 0,2M). Solução de Concanavalina A 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 variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

Em outro estudo, observou-se que abrina e abrina acrescida de galactose (**Figura 9**) não estimularam a produção de IL-10 de forma significativamente maior que células em meio de cultura (MATOS, 2012).



**Figura 9: Efeito da abrina e abrina acrescida de galactose em estudo sobre a produção de IL-10 por linfócitos esplênicos obtidos dos animais.** Solução de Concanavalina A 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 variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , quando comparado ao controle negativo do grupo experimental correspondente.

Fonte: (MATOS, 2012)

Os grupos que receberam tratamento com as substâncias em estudos apresentaram produção de citocinas com os perfis de citocinas Th1 (IL-12 e  $\text{TNF-}\alpha$ ) e Th2 (IL-10) em concentrações variáveis. Em geral, é conhecido que o desbalanço na produção de citocinas Th1/Th2 deve predispor a diferentes patologias, incluindo o câncer, e uma prolongada resposta inflamatória Th1 deve permitir que as células sejam induzidas à transformação neoplásica (SCOLA et al., 2009). Isto evidencia que as células imunes produziram mediadores inflamatórios para desencadear a

resposta imune, mas não há níveis muito significativos a ponto de combater o tumor. Através da estimulação de produção de citocinas pode ocorrer uma exacerbação do processo inflamatório, podendo culminar com a propagação do câncer. Isto pode ter ocorrido nos grupos abrina + galactose e pulchelina + galactose, nos quais expressaram altos níveis de IL-10, citocina que inativa os macrófagos com o intuito de manter o equilíbrio da ação de células imunes, causando um efeito exacerbado desta citocina e impedindo que mais células tumorais fossem combatidas, não reduzindo significativamente o tamanho do tumor.

## **5. Conclusão**

Pode concluir que, das RIPS testadas, abrina foi a substância mais tóxica às células tumorais, retardando a proliferação. Já os tumores tratados com abrina e pulchelina associados à galactose apresentaram tamanho maior do que os tratados apenas com as RIPS. Isto evidencia que a  $\beta$ -D-galactose atua na ação da toxicidade das proteínas, reduzindo a influência destas na inibição do crescimento tumoral.

Em relação aos resultados obtidos na determinação de óxido nítrico, pode-se concluir que são benéficos para resposta antitumoral, pois um perfil imunológico Th1 é necessário para o combate ao câncer (DISIS, PARK, 2009).

Em relação à produção de citocinas, as substâncias testadas apresentaram os perfis de citocinas Th1 (IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-10) em concentrações variáveis, incluindo estimulação de produção de citocinas importantes no combate ao câncer, como IL-12.

## 6.Referências Bibliográficas

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**, vol. 2, p. 151–160, 1983.

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.

CARLI, C.B.A. ; MATOS, D.C. ; LOPES, F.C.M. ; MAIA, D.C.G. ; Dias, M. B. ; SANNOMYA, M. ; RODRIGUES, C.M. ; ANDREO, M.A. ; VILEGAS, W. ; COLOMBO, L.L. ; CARLOS, I. Z. . Isolated flavonoids against mammary tumour cells LM2. Zeitschrift für Naturforschung. C, **A Journal of Biosciences**, v. 64, p. 32-36, 2009.

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. Progesterin 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.

COSTA, M.T.; FABENI, R. de C.; APTEKMANN, K.P.; MACHADO, R.R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**. v. 33, n. 5, p. 967-974, 2003.

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.

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**, vol. 9, p. 651-7, 2002;

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 Immunopharmacology**, v. 6, p. 1323–1330, 2006.

GADADHAR, S.; KARANDE, A. A. Abrin Immunotoxin: Targeted Cytotoxicity and Intracellular Trafficking Pathway. **PLoS ONE** 8(3): e58304. doi:10.1371/journal.pone.0058304, 2013.

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

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v. 43, p. 374-379, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acessado em 20/08/2013.

JAKÓBISIAK, M. ; LASEK, W. ; GOLAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, vol. 90, p. 103-122, 2003.

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.

MATOS, V.C. **Gomas endospérmicas de Delonix regia e Schizolobium parahybae**. 2000. 126f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

MATOS, D.C. et al. Immunological response in mice bearing LM3 breast tumor undergoing Pulchellin treatment. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2012.

MATOS, D. C. **Estudo da atividade anti-tumoral de abrina em tumor mamário murino e sua influência no sistema imune**. 2012. 124f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

MOREIRA, R.A. **Lectinas vegetais: uma abordagem química e físicoquímica.**

Tese de Titular, UFC, 600p, 1998.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S.G.

Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annual Review of Immunology*, v. 29, p. 71-109, 2011.

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 Research**, v., 9, p. R69, 2007.

RENGARAJAN, J.; SZABO, S.J.; GLIMCHER, L.H. Transcriptional regulation of

Th1/Th2 polarization. **Immunol Today**, v. 21, n. 9, p. 479-483, 2000.

SZALA, S.; MITRUS, I.; SOCHANIK, A. Can inhibition of angiogenesis and

stimulation of immune response be combined into a more effective antitumor therapy? **Cancer Immunol Immunother**, v.59, p.1449–1455, 2010.

STIRPE, F.; BATTELLI, M.G. Ribosome-inactivating proteins: progress and

problems. **Cell. Mol. Life Sci.**, vol. 63, p. 1850-1866, 2006.

WALSH, M. J.; DODD, J. E.; HAUTBERGUE, G. M. Ribosome-inactivating proteins-

Potent poisons and molecular tools. **Landes Bioscience**, v4:8, p. 774–784, 2013