

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

ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E
ANTI-TUMORAL DE PROTEINAS INATIVADORAS DE RIBOSSOMOS
EXTRAÍDAS DE PLANTAS

DJAMILE CORDEIRO DE MATOS

**ARARAQUARA – SP
2008**



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

ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E
ANTI-TUMORAL DE PROTEÍNAS INATIVADORAS DE RIBOSSOMOS
EXTRAÍDAS DE PLANTAS

DJAMILE CORDEIRO DE MATOS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Análises Clínicas
da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas – UNESP, Campus de
Araraquara, como pré-requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Análises Clínicas

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

**ARARAQUARA – SP
2008**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

M433e Matos, Djamile Cordeiro
Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e anti-tumoral de proteínas inativadoras de ribossomos extraídas de plantas. / Djamile Cordeiro Matos. – Araraquara, 2008.
116 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas
Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

. 1.Câncer de mama. 2.Câncer de pulmão. 3. Citocinas. 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 CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior).

*Aos meus pais,
Vania e Everardo,
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 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.

Ao pesquisador Dr. André Luiz Coelho, por todo apoio dado no início da pesquisa na forma de informações e material e quando houve problema com as amostras, dando informações de como resolver.

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

À Profa. Dra. Ana Cristina Moreira pela ajuda dada no isolamento das proteínas, que sem essa ajuda eu não teria conseguido isolar sozinhas as proteínas e, provavelmente, eu não teria sido capaz de realizar este trabalho.

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. Além de me ajudarem em todas as etapas desta pesquisa, corrigindo meus erros, apontando soluções para os problemas que surgiram. Minha eterna gratidão a vocês por serem pais tão especiais e queridos. Melhores pais eu não poderia pedir a Deus.

Ao meu querido amigo Kico por ter sempre estado ao meu lado, dando-me apoio nos momentos em que estava cansada e desanimada, sempre conversando comigo até eu dormir, quando eu tinha insônia.

Aos meus amigos e colegas do laboratório por todo apoio e companheirismo no tempo que passamos juntos.

À Marisa, que sempre me ajudou em todas as etapas desta pesquisa. Obrigada por tudo, Marisa, do fundo do meu coração. Sem você me ajudando, não sei o que teria sido de mim.

À Carol, por todos os momentos de descontração, pela companhia às idas às compras, pelas brincadeiras e tudo mais que passamos juntas.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XI
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
<i>Capítulo 1</i>	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 – Câncer	4
2.2 – Sistema Imune	5
2.3 – Medicamentos de origem vegetal usados no tratamento do câncer	11
2.4 – RIPs (Proteínas Inativadoras de Ribossomos)	12
2.4.1 – Usos das RIPs na área de saúde	15
2.5 – <i>Abrus precatorius</i> L.	16
2.6 – <i>Ricinus communis</i> L.	20
2.7 – <i>Abrus pulchellus tenuiflorus</i>	24
3. OBJETIVOS	28
3.1 – Geral	28
3.2 – Específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 – Origem das amostras	29
4.2 – Etapa química	29
4.2.1 – Obtenção do extrato bruto das plantas <i>A.</i> <i>precatorius</i> e <i>R. Communis</i>	29
4.2.2 – Purificação da abrina e ricina	30
4.3 – Etapa Imunológica	30
4.3.1 – Animais	30
4.3.2 – Obtenção das células do exudato peritoneal	30
4.3.3 – Obtenção dos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal	31

4.3.4 – Obtenção das células esplênicas	32
4.3.5 – Obtenção dos sobrenadantes das culturas de células esplênicas	33
4.3.6 – Linhagens celulares	33
4.3.6.1 – Células LM3 e LP07	33
4.3.7 – Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal	34
4.3.8 – Avaliação da viabilidade celular das células esplênicas	35
4.3.9 – Determinação da produção de óxido nítrico	35
4.3.10 – Determinação da atividade inibitória da abrina, da ricina e da pulchelina em cultura de células peritoneais de camundongos quanto à produção de NO	36
4.3.11 – Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	36
4.3.12 – Determinação da atividade inibitória da abrina, da ricina e da pulchelina em cultura de células peritoneais de camundongos quanto à produção de H ₂ O ₂	37
4.3.13 – Cálculo da percentagem de inibição	37
4.3.14 - Dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ	38
4.3.15 – Determinação da atividade anti-proliferativa em células LM3 e LP07	39
4.3.16 – Análise estatística dos Resultados	40
5. RESULTADOS	41
5.1 – Isolamento das proteínas	41
5.2 – Viabilidade celular em células peritoneais e células esplênicas	41
5.3 – Determinação da produção de óxido nítrico	45
5.4 – Determinação da produção de peróxido de hidrogênio	48
5.5 – Determinação da atividade inibitória quanto à produção de NO e H ₂ O ₂	51

5.6 – Dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-10	53
5.7 – Determinação da atividade anti-proliferativa em células LM3 e LP07	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
Capítulo II	
ARTIGO	99
9. APÊNDICE	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de viabilidade celular em PEC e células esplênicas murinas	44
Tabela 2 – Efeitos das RIPs abrina, ricina e pulchelina na produção de óxido nítrico em culturas de células peritoneais	47
Tabela 3 – Efeitos das RIPs abrina, ricina e pulchelina na produção de peróxido de hidrogênio em culturas de células peritoneais	50
Tabela 4 – Porcentagem de inibição das RIPs sobre a produção de H ₂ O ₂ e NO em macrófagos peritoneais	52
Tabela 5 – Indução de citocinas por abrina, ricina e pulchelina em células peritoneais (IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α) e em células esplênicas (IL-10 e IFN- γ)	56
Tabela 6 – Valores de IC 50 dos compostos para as células LM3 e LP07 após 24 horas de exposição	58
Tabela 7 – Valores de IC 50 dos compostos para as células LM3 e LP07 após 48 horas de exposição	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura molecular do Taxol [®]	12
FIGURA 2: Alinhamento esquemático das RIPs representando uma comparação entre suas estruturas primárias	14
FIGURA 3: Fotos das flores, frutos, sementes e da planta <i>Abrus precatorius</i> L.	18
FIGURA 4: Fotos da planta, das flores e sementes e da planta <i>Ricinus communis</i> L.	21
FIGURA 5: Fotos da planta, vagem e flor de <i>Abrus pulchellus</i> subespécie <i>tenuiflorus</i>	25
FIGURA 6: Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações da abrina, ricina e pulchelina.	42
FIGURA 7: Viabilidade de células do exsudato peritoneal e células esplênicas de camundongos Swiss na presença das proteínas abrina, ricina e pulchelina	43
FIGURA 8: Produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos Peritoneais	46
FIGURA 9: Produção de peróxido de hidrogênio em cultura de células do exsudato peritoneal	49
FIGURA 10: Indução de citocinas por abrina, ricina e pulchelina em macrófagos peritoneais	54
FIGURA 11: Indução de citocinas por abrina, ricina e pulchelina em células esplênicas	55

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	Microgramas
µg/Sq	Micrograma por Square metre
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µmols	Micromols
Å	Angstroms
ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	Fator de ativação de protease apoptótica 1
BSA	Buffer Storage Area
BSS	Buffer Based Scheduler
BMS	Bristol-Myers Squibb
Células NK	Células <i>natural killer</i>
Cys	Cisteína
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbon
ConA	Concanavalina A
ConBr	Concanavalina Br – lectina de <i>Concavalia brasiliensis</i>
cNOS	Óxido nítrico sintetase constitutiva
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D.O.	Densidade óptica
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Retículo endoplasmático
EUA	Estados Unidos da América
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GM-CSF	Fator estimulante de colônia granulócitos-macrófagos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IFN-γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
kDa	Quilodaltons
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4

IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
LM3	Linhagem de adenocarcinoma de mama
LP07	Linhagem de adenocarcinoma de pulmão
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Metro
M	Molar
MAPK	Proteinoquinase ativada por mitógeno
MEM	Minimum Essencial Medium
mg/Kg	Miligramas por quilograma
Min.	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MMPs	metaloproteinases de matriz
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF- κ B	Fator nuclear κ B
ng/mL	Nanogramas por mililitro
nm	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
O ₂	Gás oxigênio
O ₂ ^{•-}	Íon superóxido
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAP	Pokeweed antiviral proteins
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PEC	Células do exsudato peritoneal
PMA	Acetato de forbol miristato
Pser	Serina fosforilada
RIPs	Proteína inativadoras de ribossomos
RNA	Ácido ribonucléico

rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura – série 1640)
Th1	Tipo de linfócito T <i>helper</i>
Th2	Tipo de linfócito T <i>helper</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-R1	Receptor do fator de necrose tumoral
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

RESUMO

O câncer é a segunda maior causa de morte em países industrializados, sendo superado somente para as doenças cardíacas. Os dois tipos de cânceres de maior incidência no homem são o de próstata e de pulmão, e entre as mulheres são de mama e de cólon do útero. Abrina, ricina e pulchelina são proteínas inativadoras de ribossomos do tipo II (RIPs), possuidoras de duas cadeias polipeptídicas, uma com atividade enzimática N-glicosidase e a outra lectínica. Neste trabalho, a resposta imune desencadeada pelas RIPs e a atividade anti-proliferativa contra células tumorais de mama (LM3) e de pulmão (LP07) foram avaliadas. Abrina, ricina e pulchelina mostraram-se muito tóxicas aos macrófagos ($IC_{50} = 6,4 \pm 1,53$, $11,8 \pm 1,66$ e $19,3 \pm 4,0$, respectivamente), sendo a abrina a mais tóxica de todas, seguida pela ricina e esta pela pulchelina. As proteínas não estimularam a produção de NO e H₂O₂ em células do exsudato peritoneal, mas causaram leve inibição da produção de NO estimulada por LPS e uma forte inibição da produção de H₂O₂ estimulada pelo PMA. As proteínas testadas estimularam resposta do tipo Th1 e Th2, pois induziram a produção de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-10. As células LM3 (adenocarcinoma de mama murino) e LP07 (adenocarcinoma de pulmão murino) foram mais sensíveis ao potencial tóxico de abrina, ricina e pulchelina do que do Taxol após 24 e 48 horas de incubação.

PALAVRAS-CHAVE: câncer de mama, câncer de pulmão, abrina, ricina, pulchelina, taxol, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, citocinas.

ABSTRACT

Cancer is the second major cause of death in industrialized countries, second only to cardiac diseases. The two more incident cancer types in men are prostate and lung cancer, and in women are breast and colon cancer. Abrin, ricin and pulchellin are type II ribosome inactivating proteins (RIPs); they have two polypeptide chains, one with N-glycosidase activity, and the other lectinic. In this research, we evaluated the immune response induced by these RIPs and the anti-proliferative activity against tumoral cells of breast (LM3) and lung (LP07). Abrin, ricin and pulchellin showed cytotoxicity to exsudate peritoneal cells ($IC_{50} = 6.4 \pm 1.53, 11.8 \pm 1.66$ e 19.3 ± 4.0 , respectively). The abrin was the most toxic of all, followed by ricin and pulchellin. Abrin, ricin and pulchellin didn't stimulate NO and H_2O_2 production in PEC, although they caused a low inhibition of LPS' NO production stimulation, and a high inhibition of PMA's H_2O_2 production stimulation. The proteins induced a Th1 and Th2 response; characterized by their ability to stimulated IL- 1β , TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-10 production. The LM3 cells (murine breast adenocarcinoma) and LP07 cells (murine lung adenocarcinoma) were more sensible to the proteins' cytotoxicity than Taxol's cytotoxicity after 24 and 48 hours of incubation.

Key-words: breast cancer, lung cancer, abrin, ricin, pulchellin, Taxol, nitric oxide, hydrogen peroxide, cytokines.

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 metastisar para outras regiões do corpo (Instituto Nacional de Câncer, 2008).

A estimativa de pesquisadores era de que o número de casos novos de câncer no mundo seria de mais de 10 milhões, dentre os quais, 53% dos casos ocorreriam nos países em desenvolvimento. Os tumores de pulmão (902.000 casos novos) e próstata (543 mil) foram os mais freqüentes no sexo masculino, enquanto que no sexo feminino observaram-se as maiores ocorrências nos tumores de mama (1 milhão de casos novos) e colo do útero (471.000) (PARKIN et al., 2001).

O câncer de pulmão vem representando um grande desafio para os oncologistas, uma vez que, apesar de todos os avanços diagnósticos e terapêuticos, a taxa de sobrevida global em cinco anos permanece inalterada em 13% ao longo das últimas décadas. Clinicamente, o câncer de pulmão é classificado em carcinoma de pulmão de células não-pequenas (CPCNP) e carcinoma de pulmão de células pequenas (CPCP). O CPCNP é o mais freqüente, 75 a 80% de todos os casos, e nestes pacientes o estadiamento clínico é fundamental para estabelecer a estratégia terapêutica (GINSBERG, VOKES, RABEN, 1997).

Inicialmente o tratamento de carcinoma pulmonar era a cirurgia, fornecendo uma sobrevida de 3 a 4 meses, sendo posteriormente substituído por radioterapia, permitindo 6 meses de sobrevida, e, finalmente por quimioterapia sistêmica, esta fornecendo uma maior sobrevida, de 14 meses nos pacientes tratados (JOHNSON, GRECO, 1986).

A maioria dos tumores de mama tem seu crescimento relacionado com os níveis de estrógeno. Com isso, os cânceres de mama ocorrem, principalmente, em mulheres pós-menopausa, quando a produção de estrógeno pelos ovários está prejudicada (ACKERMAN et al., 1981). Carcinoma de mama em homens é raro, mas representa 1% dos casos de câncer masculino. Muitos dos fatores de risco de câncer de mama em homens envolvem anormalidades no balanço estrógeno e andrógeno.

Fagócitos mononucleares são de extrema importância para a defesa imunológica do organismo, sendo os macrófagos bem conhecidos por iniciarem uma resposta imune inata efetiva contra microrganismos (TAYLOR et al., 2005). Os macrófagos são capazes de orientar a resposta imune adaptativa através da produção de diversas moléculas e apresentação de antígenos às células T, conduzindo à expansão e diferenciação de linfócitos específicos para corpos estranhos e células tumorais (POZZI et al., 2005; PREYNAT-SEAUVE et al., 2006).

A fauna e flora brasileira são importantes fontes de novas substâncias com potencial terapêutico. As plantas usadas na medicina tradicional e popular têm sido aceitas, atualmente, como uma fonte importante no descobrimento e desenvolvimento de drogas para a quimio-prevenção de câncer (ABDULLAEV, 2001).

As espécies sub-arbustivas brasileiras *Abrus precatorius* (jequiriti) e *Abrus pulchellus subsp. tenuiflorus*, pertencem à família Papilionoideae, tribo Abrae e ao gênero *Abrus* (MOTA, 1997). O *Ricinus communis* (mamona) pertence à família Euphorbiaceae e ao gênero *Ricinus* (STIRPE, BARBIERI, 1986). A partir das sementes destas plantas obtêm-se abrina (*A. precatorius*), ricina (*R. communis*) e pulchelina (*A. pulchellus*). Estas são proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo II, possuindo duas cadeias peptídicas unidas por ponte dissulfídicas, sendo que uma das cadeias possui atividade enzimática N-glicosilase, e a outra cadeia, possui atividade lectínica.

As RIPs manifestam uma série de atividades biológicas incluindo atividades de inibição de tradução, e atividades RNA N-glicosilases, antimitogênica, imunomoduladora, antiproliferativa e antifúngica. Além disso, as RIPs têm efeitos imunossupressores, tanto sobre a resposta humoral como mediada por células, com isso, sua administração previne a formação de anticorpos e retarda a rejeição de transplantes (SPREAFICO et al., 1983; DESCOTES et al., 1985; BENIGNI et al., 1995). Contudo, essas proteínas são extremamente imunogênicas (THORPE et al., 1989).

Neste trabalho procuramos, através de testes *in vitro* de citotoxicidade e determinação de mediadores produzidos por células do exsudato peritoneal e células esplênicas, verificar o efeito da abrina, ricina e pulchelina sobre o sistema imunológico murino. Além disso, através de testes *in vitro* de citotoxicidade

procuramos verificar sua atividade antiproliferativa sobre células de adenocarcinoma de mama e de pulmão murinos (LM3 e LP07, respectivamente).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- CÂNCER

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 et al., 1994).

O câncer é a segunda maior causa de morte em países industrializados, perdendo somente para as doenças cardíacas. Embora as taxas de mortalidade estejam diminuindo nos últimos anos, devido ao diagnóstico precoce e as diversas opções de tratamento, a perspectiva para certos cânceres continua desanimadora (WORKMAN, KAYE, 2002).

No Brasil, as estimativas para 2008 apontam que, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os câncer de mama e de cólon do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (Instituto Nacional do Câncer, 2008).

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. Dois exemplos de linhagens tumorais são: a linhagem LM3, obtida a partir de cultura primária de adenocarcinoma de mama murino (M3) em BALB/c (BAL DE KIER JOFFÉ et al., 1983), e a linhagem LP07, obtida a partir de cultura primária de adenocarcinoma de pulmão murino (P07) em BALB/c (URTREGER et al., 2001), obtidos no Instituto H. Roffo, em Buenos Aires-Argentina.

As células LM3 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).

Em relação à linhagem LP07, esta é composta por células poliédricas epitelióides heterogêneas que proliferam lentamente. Somente algumas células de LP07 expressam citoqueratinas enquanto a maioria delas foi positiva para vimentina (componente dos filamentos intermediários presentes em astrócitos). Através de estudos de ultra-estrutura, pesquisadores mostraram que as células LP07 estabelecem uniões rudimentares entre si, formam ductos tipo glandular e apresentam grânulos secretórios proeminentes, sugerindo uma origem epitélio-glandular, com componentes neuroendócrinos (URTREGER et al., 2001).

2.2- SISTEMA IMUNE

Há uma correlação direta entre resposta imunológica e inflamação. Uma atividade inflamatória de curta duração geralmente traz benefícios para o organismo hospedeiro na presença de agentes agressores, contudo a persistência do processo inflamatório freqüentemente resulta em dano tecidual e do DNA contribuindo para o desenvolvimento do câncer (DE VISSER et al., 2006).

Os macrófagos participam tanto na imunidade inata como na adquirida através de várias atividades, que incluem: fagocitose, produção de agentes microbicidas, secreção de citocinas, processamento de antígenos e apresentação de epítomos aos linfócitos T (MLAMBO, SIGOLA, 2003). Através da fagocitose, os macrófagos destroem muitos microrganismos, produzem diversas moléculas e apresentam antígenos às células T. Tanto macrófagos como células dendríticas orientam a resposta imune adaptativa conduzindo à expansão e diferenciação de linfócitos específicos para microrganismos invasores e também células cancerígenas (POZZI et al., 2005; PREYNANT-SEAUVE et al., 2006).

Macrófagos executam funções inflamatórias dentro do contexto da resposta inata e participam da resposta adaptativa apresentando epítomos aos linfócitos T auxiliares. As atividades dos macrófagos durante o câncer são predominantemente inespecíficas e induzem citotoxicidade às células tumorais suprimindo respostas de células T e NK. Estas funções dos macrófagos podem ser mediadas, entre outros

fatores, por reativos intermediários do nitrogênio, reativos intermediários do oxigênio ou TNF- α (ALLEVA, BURGER, ELGERT, 1994).

Em décadas passadas, macrófagos ativados eram definidos como células que secretavam mediadores inflamatórios e eliminavam patógenos intracelulares (NORTH, 1978). Contudo, atualmente, pesquisadores observam que os macrófagos podem ser um grupo de células mais heterogêneo, com diferentes fisiologias e executando funções imunologicamente distintas (MOSSER, 2003).

A ativação dos macrófagos ocorre em um ambiente de mediadores tais como citocinas tipo I (IFN- γ , TNF- α) ou sob reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs, (LPS, lipoproteínas, etc.) e sinais de perigo endógenos (proteínas de choque térmico). Os macrófagos têm importante papel na proteção contra patógenos intracelulares e, sob certas condições, contra células tumorais (VAN GINDERACHTER et al., 2006).

Além disso, os macrófagos exercem atividades anti-proliferativas e citotóxicas, resultando parcialmente de sua habilidade em secretar espécies reativas do nitrogênio e oxigênio (óxido nítrico, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio, superóxido) e citocinas pro-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6) (URBAN et al., 1986; STUEHR, NATHAN, 1989; MYTAR et al., 1999; BONNOTTE et al., 2001).

O NO é sintetizado por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintetases (NOS), que convertem a L-arginina em NO e L-citrulina. Três isoenzimas foram identificadas como responsáveis pela produção de NO e foram denominadas de neuronal (nNOS ou NOS 1), induzível (iNOS ou NOS 2) e endotelial (eNOS ou NOS 3). A iNOS foi originalmente purificada e clonada a partir de macrófagos ativados, embora células musculares cardíacas, células de músculo liso vascular e células da glia também produzam NO a partir da iNOS (LOPES-FARRÉ et al., 1998; SARIH et al., 1993). Enquanto que a NOS neuronal e endotelial são constitutivamente expressas (cNOS). A produção de NO é primariamente regulada pela flutuação dos níveis intracelulares de cálcio. Sob estimulação, cNOS produz uma quantidade pequena de NO por somente pequenos períodos, mediando funções fisiológicas como transmissão neuronal e regulação do tônus vascular (NATHAN, 1992; MARLETTA, 1993).

A iNOS é primariamente expressa em macrófagos ativados em resposta a citocinas, tais como interferon- α , - β , e - γ (IFN- α , - β , e - γ), interleucina-1 α e -1 β (IL-1 α

e -1β), fator de necrose tumoral- α e $-\beta$ (TNF- α e $-\beta$), e endotoxinas (LPS) (NATHAN, 1992). A iNOS é induzida sob diversas condições, como: endotoxemia, choque hemorrágico, sepse, infecção, hepatite, exposição ao ozônio. Sendo que, uma vez estimulada, gera uma grande quantidade de NO (μ M) ao longo da vida da enzima ativa (por horas ou dias) e ela serve como um importante regulador e efetor durante inflamação e infecção, executando um importante papel na defesa do hospedeiro contra patógenos e células tumorigênicas (HIBBS et al., 1987; NATHAN, 1992).

Contudo, espécies de NO de macrófagos ativados podem agir contra células epiteliais saudáveis vizinhas, danificando seu DNA e induzindo a carcinogênese. O NO também medeia a vascularização tumoral e o fluxo-sangüíneo tumoral. Observa-se que baixas concentrações podem ter efeito anti-apoptótico, mas, altas concentrações de NO podem induzir apoptose em células suscetíveis (HOFSETH et al., 2003).

Um nível elevado de expressão de NOS induzível e/ou constitutiva é também observado em uma variedade de cânceres humanos. Nos últimos anos, estudos têm descrito seu envolvimento em diversos papéis biológicos, afetando a carcinogênese, incluindo iniciação, promoção, progressão, metástase, microcirculação tumoral e angiogênese (HOFSETH et al., 2003).

Outro mediador químico produzido pelos macrófagos é o peróxido de hidrogênio, que é produzido durante o processo redox e, recentemente, passou a ser considerado como um mensageiro nas cascatas de sinalização intracelular (RHEE, 1999). A produção celular de O_2^- e H_2O_2 favorece a formação de outras espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (radical hidroxila e peroxinitrito), sendo que uma produção excessiva desses compostos causa stress oxidativo e pode exercer um importante papel na carcinogênese (KLAUNIG, KAMENDULIS, 2004). Além disso, o peróxido de hidrogênio pode causar peroxidação de lipídeos e danos no DNA, induzindo desta forma apoptose em muitos tipos diferentes de células (HALLIWELL, ARUOMA, 1991; YOSHIKAWA et al., 2006).

As citocinas são mediadores solúveis liberados por linfócitos e células do sistema fagocitário, essenciais na comunicação intracelular e em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos. Elas também modulam a inflamação e a imunidade regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e também de células não leucocitárias (OPPENHEIM et al., 1994).

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 e 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 et al., 2000). As células Th3, descobertas posteriormente, produzem elevados níveis de fator de transformação e crescimento beta (TGF- β) com quantidades variáveis de IL-4 e IL-10, sendo o TGF- β uma citocina com atividade imunossupressora sobre células apresentadoras de antígenos e células T (RONCAROLO; LEVINGS, 2000).

O interferon- γ é um exemplo de citocina pró-inflamatória. É o único membro da segunda classe de interferons, sendo induzido em células tanto do sistema imune inato como adquirido, principalmente, células T e células NK. Tem a capacidade de promover imunidade celular contra patógenos intracelulares, possuindo também um papel importante nas doenças inflamatórias crônicas, ativando a resposta inflamatória dos macrófagos presentes no tecido lesado (BOEHM et al., 1997; GATTONI et al., 2006).

Oh e colaboradores (2007) observaram que tanto IFN- γ com NF- κ B são importantes indutores da produção de NO em células mesenquimais. Também demonstraram que LPS, flagelina, TNF- α e IL-1 β , em combinação com IFN- γ , podem induzir a produção de NO por células do estroma mesenquimal (MSC).

Fator de necrose tumoral alfa, outra citocina pró-inflamatória, é uma glicoproteína produzida predominantemente por macrófagos ativados e células T, que desencadeia uma grande variedade de respostas biológicas, incluindo inflamação, proliferação, diferenciação e apoptose celular (LIU, 2005). TNF- α parece atuar na estimulação da iniciação e progressão tumoral, em parte, pela indução da produção de fatores angiogênicos, quimiocinas, metaloproteinases de matriz (MMPs) e pela estimulação do crescimento e função de fibroblastos (BALKWILL, 2002). Contudo, TNF- α também é associado com regressão do tumor e aumento do tempo de sobrevivência de pacientes portadores de câncer (NAKAMOTO et al.,

2000). Nesta situação, TNF- α atua ativando a imunidade celular do hospedeiro para destruir diretamente as células tumorais. No local do tumor, o TNF- α induz apoptose celular dentro da vasculatura angiogênica, conduzindo à necrose hemorrágica (ANDERSON et al., 2004). A ligação do TNF- α ao receptor TNF-R1 promove o recrutamento de diversos adaptadores intracelulares, que por sua vez, ativam múltiplas vias de transdução de sinais (DEMPSEY et al., 2003).

A interleucina 1 é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune contra infecções e agressões. Ela é produzida principalmente por monócitos e macrófagos (BIRD et al., 2002).

A IL-1 exerce influência em diversas funções biológicas (DINARELLO, 1988): aumenta a quimiotaxia de linfócitos T e B; estimula a síntese de tromboxanos por neutrófilos e macrófagos; estimula liberação de histamina por basófilos e degranulação dos eosinófilos; citotoxicidade para células tumorais; estimula a síntese de Interferon β 1 e β 2; age como um pirógeno endógeno; induz a síntese de proteínas de fase aguda (ex. proteína C reativa e fibrinogênio) em hepatócitos (ENDERS, VAN DER MEER, DINARELLO, 1987); ativa linfócitos T (MIZEL, 1982) e aumenta a síntese de anticorpos pelas células B (FALKOFF et al., 1983).

IL-1 α e β são dois agonistas funcionais da família da IL-1. Acredita-se que elas induzem respostas celulares idênticas, mas há relatos de diferenças nas suas atividades. Por exemplo, a produção de anticorpos dependente de célula T é mediada pela IL-1 β , mas não pela IL-1 α (NAKAE et al., 2001).

A interleucina 12 é uma proteína heterodimérica de 70 kDa composta por 2 subunidades, IL-12 p35 e IL-12 p40. Esta citocina é produzida por monócitos/macrófagos, células B e possivelmente outros tipos de células acessórias primariamente em resposta a bactérias ou produtos bacterianos (KOBAYASHI et al., 1989; WOLF et al., 1991; GUBLER et al., 1991; D'ANDREA et al., 1992). A IL-12 regula fortemente respostas TH1 e induz citotoxicidade contra patógenos intracelulares pela ativação de respostas imunes mediadas por células (BODDUPALLI et al., 2007). Ela possui diversos efeitos sobre as células T e Natural Killer (NK), tais como, a habilidade de induzir secreção de IFN- γ por células NK e T, agir como fator de crescimento para células ativadas, aumentar a atividade lítica de células NK ativadas por linfocina e facilitar respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos (TRINCHIERI, 1994; HENDRZAK, BRUNDA, 1995). Além disso, exerce

um papel único na regulação do balanço Th1/Th2, no qual células Th1 produzem IFN- γ e IL-2 promovendo imunidade celular, enquanto células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 promovendo imunidade humoral (MOSMANN, COFFMAN, 1989; SCOTT, 1993). Foi observado que óxido nítrico pode inibir a indução de IL-12 em macrófagos ativados (HUANG et al., 1998; MUKHOPADHYAY et al., 1999).

A interleucina 6 é um exemplo de citocina das doenças alérgicas e parasitárias, correspondendo a uma proteína de 21 kDa, produzida por diversas células incluindo macrófagos, células endoteliais, neutrófilos e linfócitos. Algumas de suas funções são estimulação e diferenciação de células B (HIRANO et al., 1986), suporte de crescimento celular de hibridomas e plasmocitomas e estimulação da síntese de proteínas de fase aguda hepáticas, após exposição a materiais tóxicos ou agressão (SCHREIBER et al., 1989). Ela modula diversos processos como proliferação e diferenciação celular, respostas imunológicas e inflamação (FARIVAR et al., 2006). Está envolvida na iniciação e manutenção da resposta inflamatória de fase aguda. A IL-6 aumenta proteínas de resposta de fase aguda associadas com inflamação e agressão (MATZARAKI et al., 2007).

Em relação às citocinas imunossupressoras, um exemplo é a IL-10. Ela é um produto de vários tipos celulares incluindo monócitos e células B e T, que diferente da IL-12, é associado com diferenciação de células Th2 (MOORE et al., 1988; FIORENTINO, BOND, MOSMANN, 1989). Ela inibe a produção de citocinas de linfócitos particularmente IFN- γ , por células T e NK, e também inibe proliferação de células T, agindo primariamente em nível de células acessórias monócitos/macrófagos (FIORENTINO et al., 1991; HSU, MOORE, SPITS, 1992; TAGA, TOSATO, 1992). A inibição da produção do IFN- γ ocorre através da prevenção da produção IL-12 e, em parte, das citocinas co-estimuladoras (IL-1 β e, possivelmente TNF- α) (D'ANDREA et al., 1993). Além disso, IL-10 inibe fortemente a produção das citocinas pro-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α por monócitos ativados por LPS, IFN- γ , ou LPS e IFN- γ . IL-10 é um potente inibidor de funções de monócitos/macrófagos, incluindo burst oxidativo, produção de óxido nítrico, citotoxicidade, e produção de citocinas, tais como TNF- α e IL-1 (BOGDAN, VODOVOTZ, NATHAN, 1991; DE WAAL MALEFYT et al., 1991; FIORENTINO et al., 1991; GAZZINELI et al., 1992; RALPH et al., 1992; OSWALD et al., 1992).

2.3 – MEDICAMENTOS DE ORIGEM VEGETAL USADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

O câncer pode ser tratado por cirurgia, radiação, hormônios, imunoterapia e quimioterapia (American Cancer Society, 2006). A quimioterapia é realizada através da administração de medicamentos antineoplásicos. Estes podem ser agrupados nas seguintes categorias: agentes alquilantes polifuncionais, antimetabólicos, alcalóides vegetais, antibióticos antitumorais, hormônios, (KATZUNG, 2003).

Os alcalóides vegetais são medicamentos originados de plantas, tendo como exemplos, a vimblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel (TAXOL[®]), docetaxel, camptotecinas (topotecana e irinotecana) e podofilotoxinas (etoposida e teniposida). A vimblastina e vincristina são alcalóides derivados da vinca (*Vinca rosea*), vinorelbina é um alcalóide semi-sintético da vinca, o paclitaxel é um éster alcalóide derivado do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*) e do teixo europeu (*Taxus baccata*), o docetaxel é um derivado semi-sintético análogo ao paclitaxel, e as podofilotoxinas são derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, que é extraída da raiz do podofilo (*Podophyllum peltatum*) (KATZUNG, 2003).

O Taxol[®], paclitaxel, uma nova droga antineoplásica, é obtido da planta *Taxus brevifolia* Nutt., sendo isolado pela primeira vez em 1969. Sua estrutura molecular foi publicada pela primeira vez em 1971 (Figura 1). Em 1994, a empresa Bristol-Myers Squibb licenciou um processo semi-sintético para produzir o taxol[®], resolvendo um problema com ambientalistas que receavam a extinção das florestas do Noroeste do Pacífico, nos EUA. Contudo, atualmente a BMS produz taxol[®] através da sua extração de cultura de tecidos de *T. brevifolia* (KINGSTON, 2007).

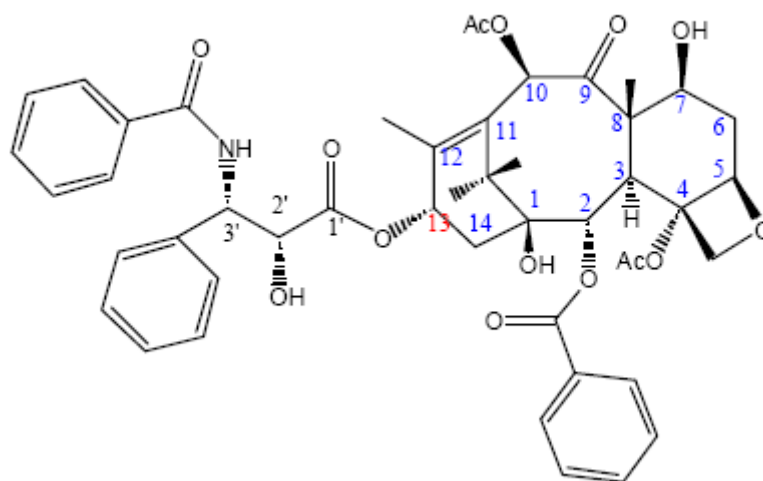


Figura 1: Estrutura molecular do Taxol[®] (KINGSTON, 2001).

O mecanismo de ação do taxol[®] é aumentar a polimerização de microtubulos (SCHIFF et al., 1979). Ele também é capaz de bloquear a mitose, induzir extensiva formação de conjunto de microtubulos em células, e induzir multinucleação de células durante a interfase (FUCHS, JOHNSON, 1978; SCHIFF, HORWITZ, 1980; ROWINSKY et al., 1988).

O taxol[®] completou seus estudos pré-clínicos em 1982, iniciou seus estudos clínicos de fase I em 1984 e de fase II em 1985 (KINGSTON, 2007). Ele é usado atualmente, isoladamente ou em combinação com outros agentes antineoplásicos, tais como cisplatina, no tratamento de câncer de ovário (PICCART; CARDOSO, 2003), câncer de mama (OZOLS, 2003) e câncer de pulmão (DAVIES et al., 2003).

2.4- RIPS (PROTEÍNAS INATIVADORAS DE RIBOSSOMOS)

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) são proteínas de plantas que inativam ribossomos de animais. 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 et al., 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:

- RIPs tipo I: são enzimas monoméricas, de massa molecular entre 25 kDa e 30 kDa (LING, LIU, WAG, 1994), com um domínio RNA N-glicosilase que não possuem uma cadeia ligante a glicoconjugados e apresentam baixa citotoxicidade. Algumas delas podem entrar na célula através do mecanismo do endocitose 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 protéica (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).

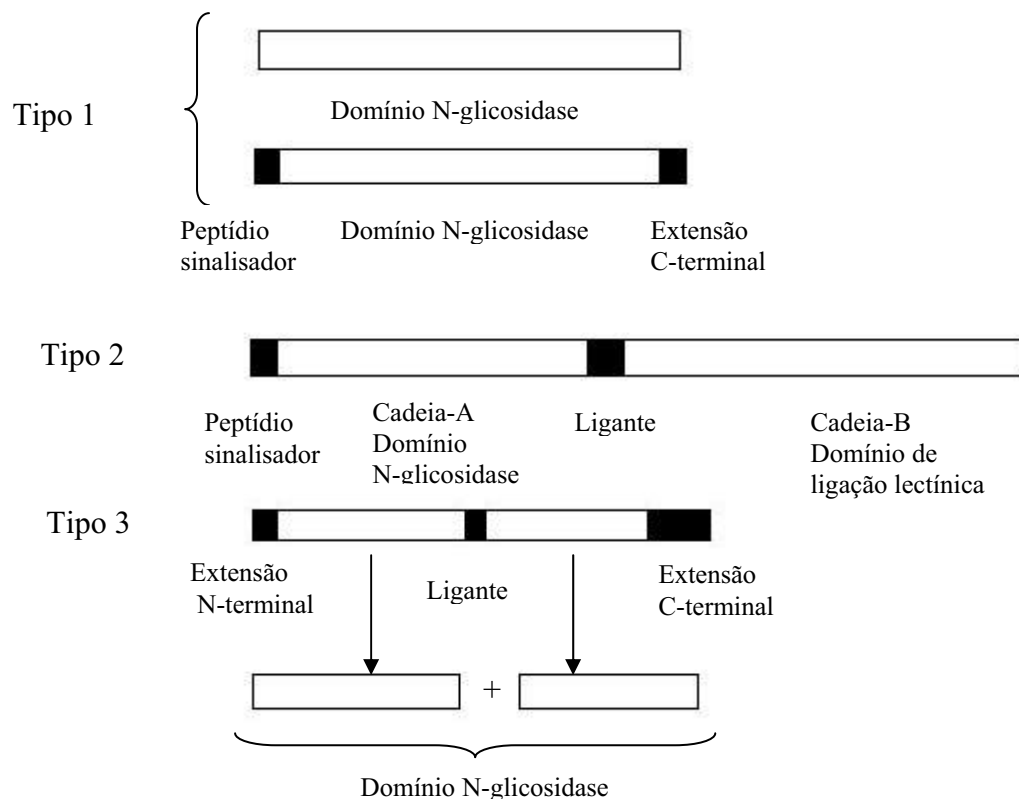


Figura 2. Alinhamento esquemático das RIPs representando uma comparação entre suas estruturas primárias (NIELSEN, BOSTON, 2001).

A comparação da seqüência de aminoácidos de RIPs tipo 1 e tipo 2 revela notável similaridades entre cadeias-A de RIPs tipo 1 e RIPs tipo 2, tão bem quanto entre as cadeias-B de diferentes RIPs tipo 2. Uma análise acurada indica que a similaridade da seqüência entre as regiões amino-terminal e a central das RIPs é muito maior que aquela das seqüências 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 carboxil-terminal e estruturas da superfície do loop. Essas diferenças podem

explicar as diferenças na atividade e especificidade do substrato das diferentes RIPs (PEUMANS et al., 2001).

RIPs tipo 2 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 2 são usualmente associadas com proteínas altamente tóxicas (BARBIERI, BATTELLI, STIRPE, 1993). Contudo, RIPs tipo 2 mostram marcadas diferenças em citotoxicidade. Ricina, por exemplo, causa 50% de morte celular em concentrações abaixo de 1ng/ml, enquanto que RIP tipo 2 do fruto do sabugueiro não mostram efeito a 1mg/ml (BATTELLI et al., 1997).

As RIPs tipo II têm a capacidade de ligar-se a glicoproteínas e glicolipídeos 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 et al., 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 isomerase dissulfídica (SPOONER et al., 2004). A cadeia A livre no lúmen do RE pode ser interpretada como um peptídeo não-ligado e enviada ao citosol pelo sistema de controle de qualidade do RE (LORD, ROBERTS, 1998). As RIPs tipo II são retro-translocadas utilizando a via de degradação associada ao RE usualmente seguida por proteínas não-envelopadas, que no citosol são poliubiquitadas e degradadas por proteases, denominadas proteossomas (TSAI et al., 2002)

2.4.1- USOS DAS RIPs NA ÁREA DE SAÚDE

RIPs apresentam diversas atividades biológicas incluindo atividades de inibição da tradução, N-glicosidases, antimitogênica, imunomoduladora, antiproliferativa e antifúngica. Imunotoxinas baseadas em RIPs têm sido construídas e usadas em terapia de câncer. Plantas transgênicas carregando o gene de RIP são menos susceptíveis às infecções virais (NG, WANG, 2004).

As propriedades anti-tumorais das RIPs contra diversos tipos de cânceres, principalmente abrina e ricina, têm sido comprovadas por diversos cientistas. Mosinger (1951) relatou a ação tóxica da ricina contra sarcoma de ratos, enquanto Reddy e Sirsi (1969) reportaram a ação inibitória de extrato de jequiriti (*A. precatorius*) sobre o crescimento do Sarcoma de Yoshida. Segundo Fodstad e colaboradores (1984), os resultados dos testes anti-tumorais em animais, com abrina e ricina, mostraram-se promissores e os estudos clínicos de fase I começaram, mas foram interrompidos porque foram observados efeitos não vistos anteriormente em ratos e foram observados, também, remissões nos pacientes testados. Atualmente, outra ferramenta contra o câncer utilizando essas toxinas é a produção de imunotoxinas, que consiste em anticorpos monoclonais, contra antígenos de superfície celular, ligados a cadeia A das toxinas. Contudo, Olsnes e colaboradores (1989) relataram a menor toxicidade contra os tumores desses conjugados do que da toxina nativa.

Ricina e abrina também foram usadas no bioterrorismo como armas biológicas, tendo o seu uso aumentado nos últimos tempos devido à facilidade de obtenção destas, principalmente, ricina. Esta foi estudada na Primeira Guerra Mundial, e foi desenvolvida uma arma com a toxina na Segunda Guerra Mundial, porém, esta arma nunca foi utilizada (CRAIG et al., 1952).

2.5- *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 uma vagem, 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 esfumada textura lustrosa, e uma mancha preta no topo (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 3. 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. Com quatro isoformas (a, b, c, e d) isoladas (LIN et al., 1981, 1982). McPherson e colaboradores (1973) observaram em cristais de abrina quatro moléculas protéicas numa unidade assimétrica, sendo que esses cristais difratam a uma resolução de 3 Å. Mais recentemente, Tahirov e colaboradores (1994) observaram uma única molécula numa unidade assimétrica que difratou a uma resolução de 2,1 Å.

A abrina 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.

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 pode ser atribuído à sua instabilidade molecular.

Abrina e ricina inibem a síntese protéica igualmente bem em todas as linhagens de células epiteliais polarizadas testadas por Melby e colaboradores (1993) se elas forem adicionadas apicalmente ou basolateralmente. Sítios de ligação para abrina e ricina são ubíquos em células de mamíferos e seria esperada estarem em ambos os lados apical e basolateral. Abrina intoxicou células MDCK-I e BeWo quando adicionada apicalmente e basolateralmente.

Abrina é capaz de induzir apoptose em células HeLa, estas exibindo características morfológicas e bioquímicas apoptóticas como: encolhimento celular, fragmentação internucleossomal de DNA, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, quebra de cadeia simples de DNA, externalização de fosfatidilserina (PS), liberação de citocromo c e ativação de caspases (caspases 3 e 9). A liberação do citocromo C da mitocôndria no citosol inicia uma cascata que induz a ativação de caspase 3 através da associação de caspase 9 e Apaf-1 (QU; QING, 2003).

Narayanan, Surolia e Karande (2004) reportaram que o sinal para apoptose é acionado a um ponto de tempo após a inibição da síntese protéica. Esta via apoptótica induzida por abrina é caspase-3 dependente e caspase-8 independente e envolve danos ao potencial de membrana mitocondrial com produção de espécies

reativas de oxigênio. A sobre-expressão do proto-oncogene 2 de células B de leucemia linfocítica bloqueia esta via apoptótica.

Ohba e colaboradores (2004) ao testarem abrina-a com 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.

2.6- *Ricinus communis* L.

Arbusto com aproximadamente 2,5 m de altura, caule ramificado, coloração verde ou avermelhada. Suas folhas são simples, longo-pecioladas, palmatilobadas com 7 a 11 lobos de bordos serrados e ápice acuminado. As flores são distribuídas em racemos terminais, com flores femininas ocupando a porção superior da inflorescência. Os frutos são cápsulas tricocas, espinhosas, triloculares, com uma semente em cada lóculo, estas sendo lisas, brilhantes, negras com manchas brancas (OLIVEIRA, 2007). Floresce ao longo de todo o ano e propaga-se exclusivamente por sementes. Possui ciclo de vida curto, em torno de 2-3 anos. Espécie heliófita e seletiva higrófitas; desenvolve-se como planta espontânea. Desenvolve-se melhor em solos férteis e bem drenados, nas regiões com precipitação anual de pelo menos 700 mm. O excesso de nitrogênio estimula o crescimento vegetativo à custa da produção de sementes (Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental, 2007).



Figura 4. Fotos da planta, das flores e sementes de *Ricinus communis* L. (CICERAN, 2008).

Das sementes da mamona obtém-se uma proteína pertencente ao grupo de proteínas inativadoras de ribossomos do tipo 2, chamada ricina. Como os outros componentes deste grupo, a ricina também é composta por duas cadeias polipeptídicas ligadas por uma ligação dissulfídica. A cadeia A é uma enzima globular de 267 aminoácidos, com um número de elementos estruturais secundários. Ela tem um sítio ativo pronunciado capaz de reconhecer e acomodar o loop-suporte do rRNA que é seu alvo (ROBERTUS, MONZINGO, 2004). A cadeia B é uma proteína em forma de halteres com dois domínios: o domínio I consiste de 1-135 resíduos e o domínio 2 de 136-262 resíduos. Sendo esses domínios homólogos e cada um é composto por 3 sub-domínios homólogos, chamados de α , β e γ juntos com uma unidade ligante não relacionada, ou α (RUTENBER, READY, ROBERTUS, 1987). Esses subdomínios têm aproximadamente 40 resíduos de comprimento. Embora os subdomínios α , β e γ exibam a mesma prega básica, somente as unidades 1α e 2γ na extremidade final da cadeia B retêm a habilidade de ligar a galactosídeos. Resíduos conservados no subdomínio γ do domínio C-terminal ligam um segundo galactosídeo de uma forma similar (ROBERTUS; MONZINGO, 2004).

A cadeia B da ricina liga galactosídeos de superfície celular (BAENZIGER, TIETE, 1979) e é internalizada por endocitose dependente e independente de clatrina (SANDVIG, VAN DEURS, 1996). A maioria da toxina endocitada é transportada a endossomos e lisossomos, mas uma fração da toxina ligada à superfície alcança o aparato de Golgi (VAN DEURS et al., 1988). Ricina é, então, transportada retrogradamente ao retículo endoplasmático (ER) (RAPAK et al., 1997). A ligação dissulfídica intersubunidade é clivada (MASUHO et al., 1982), e a cadeia A translocada ao citosol onde síntese protéica é cataliticamente inativada pela depurinação de uma adenina crítica do fator de elongação ligando o sítio numa estrutura de base do loop de rRNA (ENDO, TSURUGI, 1987).

Fodstad e colaboradores (1984) realizaram um estudo de fase 1 com ricina, sendo dado na forma de injeções intra venosas a cada duas semanas em doses variando de 4,5 a 23 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de área superficial corporal estimada. Nesses níveis e em níveis maiores, observaram que sintomas tipo resfriado com dor e fadiga muscular apareceram e, em alguns pacientes, náusea e vômito também ocorreram. Mielossupressão não foi observada. Anticorpos anti-ricina foram detectados no soro após 2 a 3 injeções de ricina. Observaram uma cinética de primeira ordem na

eliminação de ricina do sangue. A cada nível de dose, houve pequenas diferenças entre os pacientes com relação às concentrações plasmáticas e os efeitos colaterais. A maior dose dada, $23 \mu\text{g}/\text{m}^2$, elevou as concentrações plasmáticas em duas vezes daquelas encontradas previamente ser efetivo terapeuticamente em camundongos hospedando tumor. Nos pacientes portando diferentes tipos de câncer, observou-se parcial melhora, e recomendaram a dose de $23 \mu\text{g}/\text{m}^2$ para um estudo de fase 2 de ricina.

Ricina tem sido usada na produção de imunotoxinas, um protótipo de soroterapia anti-tumoral, formada por anticorpos específicos para antígenos presentes em células tumorais, e toxinas com atividade anti-tumoral. Grossbard e colaboradores (1993) observaram que esses imunoconjugados produzem hepatotoxicidade reversível com transaminasemia, toxicidade megacariocítica com trombocitopenia e dano endotelial vascular com febre, náusea, dores de cabeça, mialgias, hipoalbuminemia, dispnéia e edema.

Morlon-Guyot e colaboradores (2003) descobriram que ricina tem um sítio ativo funcional de lipase na interface entre as duas subunidades (cadeia A e B). Mutação para alanina da serina 221 catalítica na cadeia A aboliu a atividade de lipase da ricina, sendo que esta é necessária para uma eficiente translocação da cadeia A e citotoxicidade. Com isso, observou-se que esta mutação reduziu a taxa de translocação da cadeia A e inibiu a toxicidade em 35%.

Gonzalez e colaboradores (2006) observaram, em seus experimentos, que ricina induz macrófagos/monócitos humanos a secretar IL-8 pela ativação da via p38 MAPK. Outros pesquisadores observaram também que ricina estimula macrófagos murinos e células mononucleares de sangue periférico humano a secretar TNF- α e IL-1 β (LICASTRO et al., 1993; HASSOUN, WANG, 2000; HIGUCHI et al., 2003).

2.7- *Abrus pulchellus tenuiflorus*

Abrus pulchellus, subespécie *tenuiflorus*, pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, contém em sua semente uma RIP chamada pulchelina (RAMOS et al., 1998).

No Brasil, a espécie *Abrus pulchellus* (Figura 6) pode ser encontrada principalmente na região Nordeste. Essa espécie é uma trepadeira perene, cujos cipós auxiliam no suporte da planta. Os ramos geralmente são finos, pouco lenhosos, alcançando em média de 2 a 4 m de comprimento. As folhas são compostas contendo de 5 a 20 pares de folíolos dispostos opostamente ao longo da raque, cujo comprimento pode variar de 5 a 10 cm. As flores são pequenas, organizadas em cachos e apresentam uma cor violeta clara. O ovário tem uma placentação marginal. O fruto é uma vargem de 3 a 5 cm de comprimento, deiscente, contendo de 3 a 6 sementes por fruto. Diferente da espécie *Abrus precatorius*, as sementes de *Abrus pulchellus* possuem uma cor marrom clara alternada com marrom escuro, apresentando em média 0,5 cm de comprimento.



Figura 5. Fotos da planta, vagem e flor de *Abrus pulchellus* subespécie *tenuiflorus*.
Figura cedida por André Luiz Coelho Silva.

Desta planta também se pode obter uma proteína inibidora de ribossomos, esta sendo chamada de pulchelina. Ela foi isolada inicialmente por Ramos e colaboradores (1998) de sementes de *Abrus pulchellus* por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B. A pulchelina é uma RIP do tipo 2 heterodimérica sendo constituída por uma cadeia com atividade enzimática RNA N-glicosilase (cadeia A) ligada a uma cadeia lectínica galactose/N-acetilgalactosamina (cadeia B) por uma ligação dissulfeto. A cadeia A tem uma massa molecular de aproximadamente 29k Da e a cadeia B de 31 kDa. Sua toxicidade em mamíferos foi próxima a da ricina e abrina (DL_{50} = 30 mg/Kg de peso corpóreo). Igualmente às outras RIPs tipo 2, a pulchelina é uma proteína rica em aminoácidos ácidos e certa quantidade de aminoácidos sulfurados (TAHIROV et al., 1995; HERMANN, BEHNKE, 1981).

Na pesquisa realizada por Ramos e colaboradores (1998), eles isolaram a pulchelina e observaram que esta, como outras lectinas tóxicas de plantas, foi inibida por galactose, açúcares contendo galactose e derivados: galactosamina, α -D-malibiose, lactose e rafnose. Além disso, a pulchelina mostrou toxicidade contra camundongos mesmo na presença do açúcar ligante, a não inibição da essa toxicidade não pode ser explicada por remoção metabólica do açúcar, pois este se encontrava em grande quantidade.

Ramos e colaboradores (1998) observaram, também, que anticorpos anti-pulchelina reconheciam parcialmente a abrina, mas não reconheciam a ricina, isto provavelmente aconteça porque a abrina e pulchelina são obtidas de plantas pertencentes ao mesmo gênero (*Abrus*). Silva e colaboradores, em 2005, observaram uma alta identidade da seqüência de aminoácidos da cadeia A da pulchelina com da abrina-c (86%), da abrina-a (78%) e da ricina (38%), demonstra essa similaridade entre abrina e pulchelina; e Goto e colaboradores (2003) demonstraram a ocorrência de similaridade entre a seqüência de aminoácidos da cadeia B da pulchelina com abrina-a (81%) e ricina (58%).

Castilho e colaboradores (2008) isolaram 4 isoformas da pulchelina, e determinaram a DL_{50} em camundongos da isoforma 1 foi 25 μ g/Kg, da isoforma 2 foi 15 μ g/Kg, da isoforma 3 foi 70 μ g/Kg e da isoforma 4 foi 60 μ g/Kg. Além disso, as isoformas foram testadas quanto à capacidade hemaglutinante usando sangue humano, de coelho e cavalo. Eles observaram que as isoformas 1 e 2 promoveram hemaglutinação de sangue humano nas concentrações de 22,5 e 27,5 ng/mL,

contudo somente a 2 aglutinou sangue de coelho (27,5 ng/mL) e cavalo (41,7 ng/mL). Enquanto as isoformas 3 e 4 aglutinam somente sangue de coelho (18,5 ng/mL e 12,3 ng/mL, respectivamente).

3- OBJETIVOS

3.1 - Geral

- Avaliar as atividades antiinflamatórias e anti-tumorais no controle de células tumorais de mama (LM3) e pulmão (LP07) das proteínas abrina, ricina e pulchelina.

3.2 - Específicos

Utilizando abrina, ricina e pulchelina em várias concentrações:

- Determinar a toxicidade dessas proteínas para células do exsudato peritoneal (PEC) e células esplênicas murinas.
- Analisar o efeito sobre a produção de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 em culturas de PEC e $\text{IFN-}\gamma$ e IL-10 em culturas de células esplênicas.
- Detectar ação antiinflamatória exercida por essas proteínas pelo seu efeito sobre a produção de Óxido Nítrico (NO) e Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por PEC murinos.
- Pesquisar o nível de toxicidade sobre linhagens de células tumorais de mama e de pulmão (LM3 e LP07, respectivamente).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Origem das amostras

As toxinas abrina, ricina e pulchelina foram extraídas das sementes de *Abrus precatorius*, *Ricinus communis* e *Abrus pulchellus subsp. tenuiflorus*, respectivamente. Sementes maduras de *Abrus pulchellus tenuiflorus* foram coletadas de plantas cultivadas no Instituto de Física de São Carlos – USP. As sementes selecionadas de *Ricinus communis* foram compradas da EMBRAPA. 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. A pulchelina foi fornecida pela professora Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, do Instituto de Física de São Carlos - USP.

4.2- Etapa química

O processo de obtenção das toxinas (abrina e ricina) 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 das plantas *A. precatorius* e *R. communis*

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 e ricina

O extrato bruto foi aplicado a uma coluna de galactomanana, obtida de *Adenanthera 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 diafiltradas 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- Etapa imunológica

4.3.1- Animais

Em cada experimento foram utilizados 05 camundongos Swiss machos de 6 semanas, pesando entre 18 e 15g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, situado na cidade de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina) *ad libitum* em local climatizado (23°C ± 2°C, 56 ± 2% de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas. Parecer do Comitê de Ética n° 32/2006.

4.3.2- Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio (DIFCO Lab. LTDA) a 3,0%, três dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram eutanasiados por inalação 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. Na porção mediana superior do abdômen foram injetados 5,0 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril em pH 7,2 e a 4°C, com auxílio de seringa e agulhas também estéreis. Uma leve massagem manual foi realizada e as células do exsudato peritoneal foram coletadas com a mesma seringa e dispensadas em tubo cônico estéril (Corning, Inc., EUA) para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5 ml de PBS (pH 7,2) e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos em centrífuga (Fanem, Ind. Bras.) à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol (Sigma) a 2x10⁻⁵M, penicilina 100 U/mL (Sigma), estreptomicina 100 U/mL (Sigma), L-glutamina 2mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cutilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) com a utilização de 10 µL da suspensão celular diluída em 90 µL do Líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração ideal para cada ensaio em meio RPMI-1640-C.

4.3.3- Obtenção dos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal

Sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12. As células do exsudato peritoneal foram ajustadas à concentração de 5 x 10⁶ células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecido de 24 cavidades (Corning, Inc., EUA). A cada cavidade foi adicionado 1,0 mL da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 min em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após essa incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640-C. Na avaliação da produção de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12 (item.4.3.16) foi adicionado aos macrófagos aderidos a placa 1mL de RPMI-1640-C e 1mL das RIPs (abrina, pulchelina e ricina) a 0,39 e

0,78 ng/mL (concentração no poço) ou LPS a 10 µg/mL (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma Chemical Co., EUA) como controle positivo ou somente RPMI-1640-C como controle de células. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa (Forma Scientific, EUA) com tensão constante de 5% de CO₂ por mais 24 h. Os sobrenadantes das culturas foram então coletados, centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha) a 7800 x g durante 10 minutos, aliquotados em microtubos e estocados a -80°C até o momento da determinação das citocinas através do teste imunoenzimático ELISA de captura.

4.3.4- Obtenção das Células Esplênicas

Para o estudo da produção de IL-10 e IFN-γ foram utilizadas culturas de células esplênicas. Os animais foram eutanasiados por inalação em câmara de CO₂ e, em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco), tiveram a pele da região abdominal retirada e o peritônio aberto para a extração do baço. O baço foi retirado e transportado para uma placa de Petri estéril (Corning, Inc.) contendo 3,0 mL de BSS (Balanced Salt Solution), pH 7,2, gelado, onde foi macerado cuidadosamente com o auxílio de pinças estéreis para liberação das células. O conteúdo da placa foi aspirado várias vezes por seringa de 3,0 mL e agulha 25 x 7,0 para obtenção de suspensão celular homogênea. Após este procedimento as células foram transferidas para tubo cônico estéril (Corning, Inc., EUA) de 15,0 mL e centrifugadas em BSS três vezes a 200 x g por 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). As células sedimentadas foram ressuspensas em 1,0 mL de meio RPMI-1640-C e a contagem do número de células viáveis foi feita em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) através da técnica de exclusão com Azul de Trypan (Vetec) a 0,04% em PBS. Após a contagem, as suspensões celulares foram ajustadas à concentração de 5x10⁶ células/mL para determinação da produção de IL-10 e IFN-γ.

4.3.5- Obtenção dos sobrenadantes da cultura de células esplênicas

A suspensão de células esplênicas foram ajustadas a 5×10^6 células/mL, obtidas como descrito no item 4.3.4. Na avaliação da produção de IL-10 e IFN- γ , a suspensão de células foi distribuída em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc., EUA), 500 μ L por cavidade e acrescentadas de 500 μ l da solução de RIPs (abrina, pulchelina e ricina) em 0,39 e 0,78 ng/mL (concentração no poço) ou Concanavalina A (ConA) na concentração de 0,5 μ g/mL, usada como controle positivo, ou ainda somente meio de cultura nos controles de células. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific) por 24 h. Os sobrenadantes das culturas foram então coletados, centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha) a 7800 xg durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram aliquotados em *eppendorfs* e estocados a -80°C para posterior dosagem de IL-10 e IFN- γ liberado nos sobrenadantes.

4.3.6- Linhagens celulares

4.3.6.1- Células LM3 e LP07

As linhagens tumorais de adenocarcinoma de pulmão LP07 e LM3 murinos foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina.

A linhagem LP07 foi derivada do tumor P07 mantido por diversas passagens subcutâneas. A partir da linhagem *in vivo*, se obteve a linhagem *in vitro* chamada LP07. Essas células se metastatizam espontaneamente no pulmão com alta frequência. Tanto as células P07 quanto LP07 produzem síndromes paraneoplásicas como hiperleucocitose, por produção de GM-CSF, hipercalcemia e caquexia (URTREGER et al., 2001).

A linhagem LM3 é originada de um adenocarcinoma mamário obtido em camundongo Balb/c, transplantável, com metástase para o pulmão (URTREGER et al., 1997).

4.3.7- 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 microssomais 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, é 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, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/ml. 100 μ l dessas suspensões foram adicionados em placas de 96 cavidades (Corning) e 100 μ l das RIPs (abrina, ricina e pulchelina) em diferentes concentrações: 0,39, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50, 500, 5000 e 12500 ng/mL (concentração no poço), LPS a 10 μ g/mL, PMA 0,2 μ g/mL (acetato de forbol miristato, Sigma Chemical. Co., EUA) 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 μ L 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).

4.3.8- Avaliação da Viabilidade Celular das células esplênicas

Alíquotas de 100 μ L das suspensões de linfócitos, obtidas na concentração conforme item 4.3.4, foram adicionadas em placas de 96 cavidades para cultivo de tecidos (Corning, Inc., EUA). Aos linfócitos foram adicionados 100 μ L das RIPs (abrina, ricina e pulchelina) nas concentrações de 0,39 e 0,78 ng/mL, concentração no poço, (concentrações em que se obteve viabilidade celular acima de 80% em células peritoneais murinas).

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 20 μ L de uma solução concentrada de MTT (5mg/mL e 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 100 μ L de álcool isopropílico (Mallinckrodt, México) em cada cavidade. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems, Filândia) em comprimento de onda de 570nm (Bautista et al., 2000).

4.3.9- Determinação da produção de óxido nítrico

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess com NaNO₂ como padrão (Green et al., 1982).

A suspensão celular obtida foi ajustada a 5×10^6 células/ml em meio de RPMI-1640. Foram distribuídos 100 μ L dessa suspensão celular em placa de 96 cavidades estéreis. Em algumas cavidades da placa, foram adicionados 100 μ L da abrina, ricina ou pulchelina a 0,39 e 0,78 ng/mL (concentração no poço), em outras, 100 μ L da solução de LPS a 10 μ g/ml como agente estimulante (controle positivo), e em outras cavidades ainda, foram adicionadas 100 μ L de meio RPMI-1640 à suspensão celular, como controle de células (controle negativo). A placa assim constituída foi incubada

por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de CO₂ (5%). Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50 µl de cada amostra, sendo passadas para outra placa e adicionados mais 50 µl/cavidade de reagente de Griess, constituído de 0.1% de N-1-naphthyl-etilenodiamina, 0,1% de sulfanilamida em solução ácido fosfórico a 3%. Após 10 minutos à temperatura ambiente no escuro, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) com filtro de 540 nm. As concentrações de nitrito de sódio foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI-1640. Os testes foram realizados em triplicata e os valores expressos em µmols de NO/5x10⁵ células.

4.3.10- Determinação da atividade inibitória da abrina, da ricina e da pulchelina em culturas de células peritoneais de camundongos quanto à produção de NO

Células do exsudato peritoneal, na concentração de 5 x 10⁶ células/ml, foram utilizadas. As PEC foram incubadas em presença concomitante de 100 µl de solução de LPS (10 µg/ml) e 100µl da abrina, ricina ou pulchelina a 0,39 e 0,78 ng/mL (concentração no poço). A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 7,5% de CO₂. A produção de NO foi medida espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito no meio de cultura com a utilização do reagente de Griess de acordo com o item 4.3.11.

4.3.11- 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 4.3.2 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 para placas de cultura de tecido de fundo plano contendo 96 cavidades (Corning, Inc.) e acrescentadas de 50µl de abrina, ricina ou pulchelina a 0,39 e 0,78 ng/mL (concentração no poço), de PMA a 0,2 µM (Sigma) em tampão fosfato de potássio (controle positivo) ou somente solução de vermelho de fenol, como controle de células, e 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 foram feitas leituras em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland), com filtro de 620nm. As amostras foram ensaiadas em triplicata. Os resultados foram expressos em nmols de H₂O₂/2x10⁵ células peritoneais, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H₂O₂ em tampão de vermelho de fenol.

4.3.12- Determinação da atividade inibitória da abrina, da ricina e da pulchelina em culturas de células peritoneais de camundongos quanto à produção de H₂O₂

Células do exsudato peritoneal na concentração de 2x10⁶ células/ml foram utilizadas. As PEC foram incubadas na presença de 50µl de PMA (0,2 µM) e 50 µl de abrina, ricina ou pulchelina a 0,39 e 0,78 ng/mL (concentração no poço) durante 1 hora em estufa à 37°C com tensão constante de 7,5% de CO₂. A produção de H₂O₂ foi medida espectrofotometricamente de acordo com o item 4.3.13.

4.3.13- Cálculo da porcentagem de inibição

Foram calculadas as porcentagens de inibição, através de comparação com os controles, nos experimentos onde as preparações obtidas a partir das toxinas apresentavam efeitos inibitórios sobre a produção de NO e H₂O₂. A equação foi utilizada para o cálculo.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

Onde A, B e C correspondem a:

A = PMA (+), proteína (-)	}	No teste H ₂ O ₂
B = PMA (+), proteína (+)		
C = PMA (-), proteína (-)		
A = LPS (+), proteína (-)	}	No teste NO
B = LPS (+), proteína (+)		
C = LPS (-), proteína (-)		

4.3.14- Dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ .

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α foram quantificadas no sobrenadante obtido da cultura de macrófagos, e IL-10 e IFN- γ no sobrenadante de células esplênicas através do teste imunoenzimático ELISA, utilizando Kit Pharmingen de acordo com as instruções do fabricante. As microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Corning Inc., NY) foram adsorvidas com um anticorpo de captura (soro de rato) anti- IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-12, anti-TNF- α ou anti-IFN- γ de rato purificado a 4 μ g/ml (100 μ l/cavidade) em tampão PBS e incubadas “overnight” à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 (PBS) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, foram bloqueadas com 300 μ l de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T. Foram adicionados à placa 100 μ l de cada citocina padrão ou sobrenadantes das culturas de células peritoneais. As placas foram

incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas 4 vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 µl/cavidade de anticorpo monoclonal de cabra anti- IL-1β, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-12, anti-TNF-α e anti- IFN-γ de rato marcado com biotina na concentração de 400 ng/ml em diluente de reagente (1%BSA, 0,05% de Tween 20 em tampão Tris-NaCl). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 µl do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS/BSA e incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e 100 µl do substrato (10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina [SIGMA] e 1,2 mM de H₂O₂) foram adicionados em cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µl de H₂SO₄ 2N. A absorbância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/visível de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) e as concentrações das citocinas foram quantificadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α, ou IFN-γ padrão. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picogramas/ml.

4.3.15- Determinação da atividade anti-proliferativa em células LM3 e LP07

A avaliação da atividade da pulchelina, abrina e ricina sobre o crescimento celular foi realizada utilizando-se linhagens tumorais murinas LM3 (adenocarcinoma de mama) e LP07 (adenocarcinoma de pulmão).

As linhagens celulares foram mantidas 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 x 10⁴ 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 pulchelina, ricina e abrina, em diferentes concentrações: 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 1000 e 10000 ng/mL (concentração no poço) foram adicionados e incubados por mais 24 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 peritoneais, como droga padrão foi usado Taxol[®] (Sigma) a 0,12, 0,24, 0,49, 0,98, 1,95, 3,91, 7,81, 15,63, 31,25, 62,50, 125 e 250µg/mL (concentração no poço). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

4.3.16- *Análise Estatística dos Resultados*

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

5. RESULTADOS

5.1- Isolamento das proteínas

A pulchelina, 1,25 mg/mL, solubilizada em Tris 20mM NaCl 10mM pH 8,0 apresenta D.O. (densidade óptica) de 1,0, o que equivale à concentração de 1,25 mg/mL no comprimento de onda de 280nm (Mota, 1997).

No isolamento da abrina e ricina obteve-se soluções puras em PBS, nas concentrações 2,024 e 1,78 mg/mL, respectivamente. A D.O. da abrina apresentam o valor de 1,24 (Ishiguro, et al., 1964), e ricina de 1,156 (Lin et al., 1969).

Observamos que as proteínas ao serem tratadas com 2-mercaptoetanol e aplicadas no gel de eletroforese SDS-PAGE, mostraram-se em duas bandas no gel, correspondendo às duas cadeias polipeptídicas, uma de 30 kDa e 33 kDa para abrina, e uma de 31 kDa e 33 kDa para ricina.

5.2- Viabilidade celular em células peritoneais e células esplênicas

Nos ensaios de determinação da viabilidade celular foi verificado que os macrófagos são sensíveis ao potencial tóxico das proteínas abrina, ricina e pulchelina. Os valores dos IC₅₀, em 24 h de incubação, para abrina foi $6,4 \pm 1,53$ ng/mL, para ricina $11,8 \pm 1,66$ ng/mL e para pulchelina $19,3 \pm 4,0$ (Fig. 6).

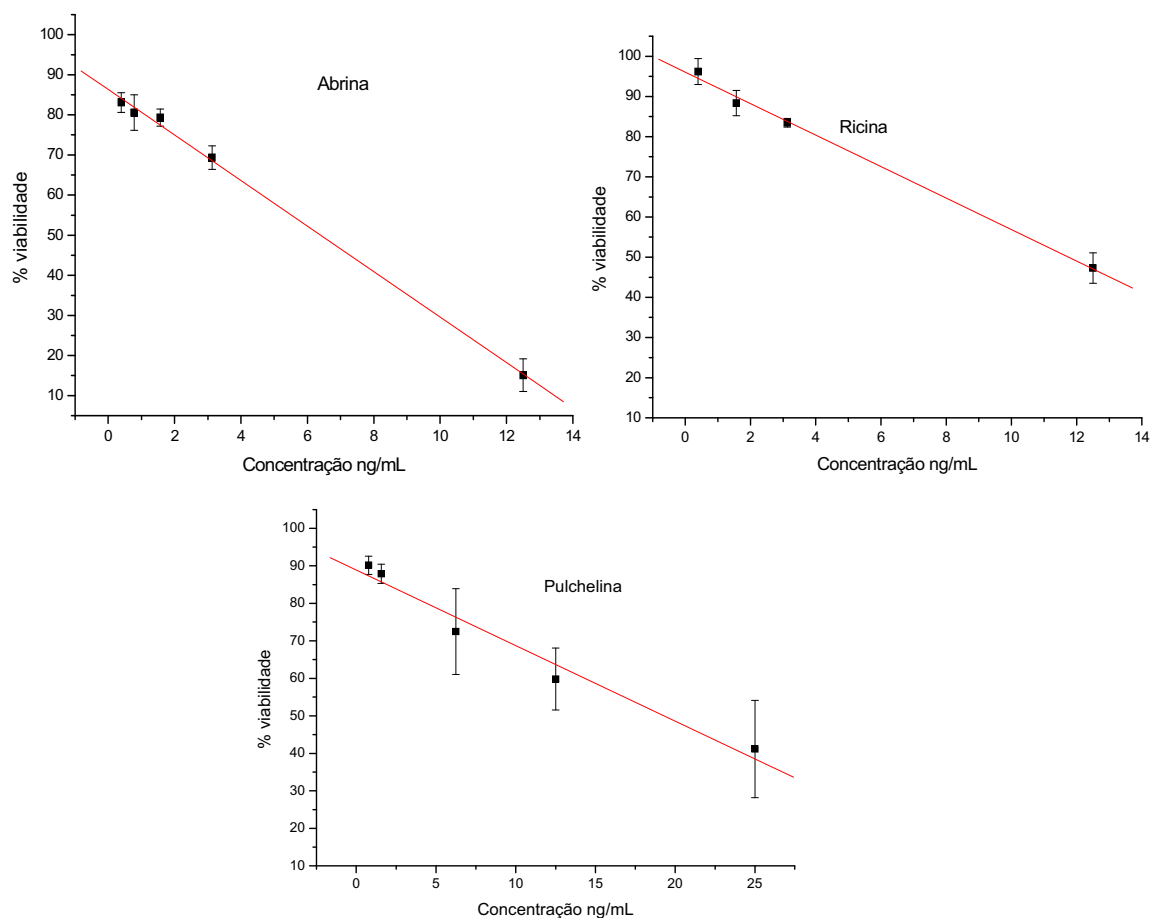


Figura 6. Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações da abrina, ricina e pulchelina. Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ou de células esplênicas ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL. Solução de MTT foi adicionada às PEC previamente incubados com soluções de abrina, ricina ou pulchelina em diversas concentrações durante 24h de incubação.

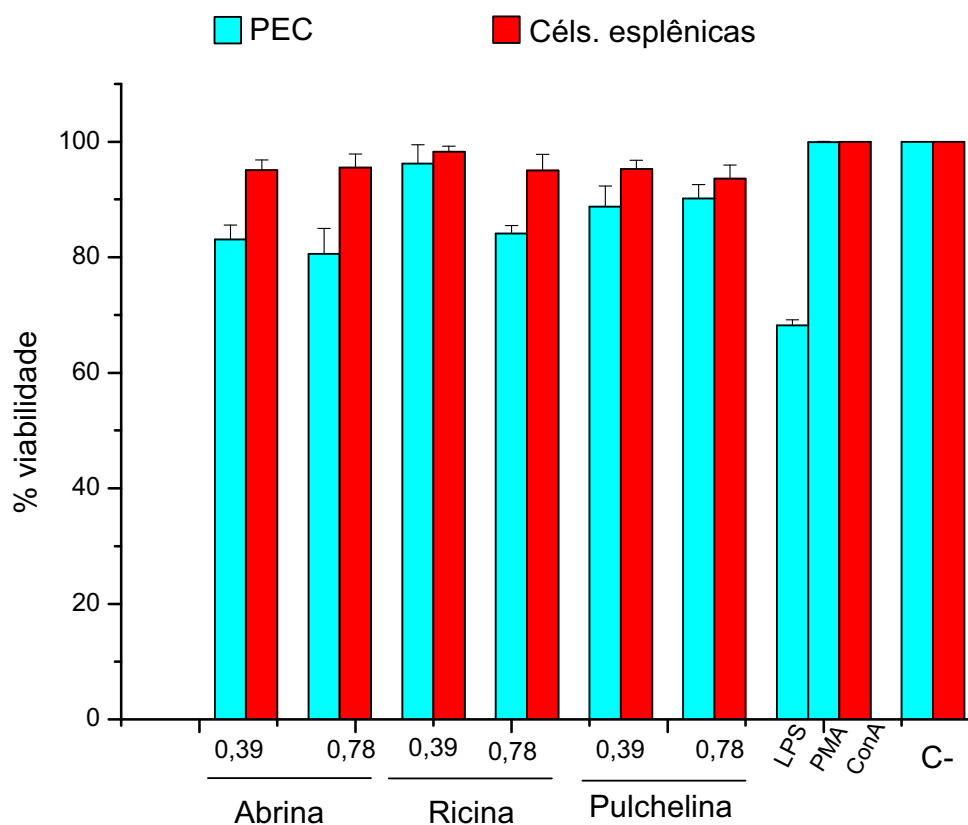


Figura 7: Viabilidade de células do exsudato peritoneal e células esplênicas de camundongos Swiss na presença das proteínas abrina, ricina e pulchelina.

Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ou de células esplênicas ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL. Solução de MTT foi adicionada aos macrófagos/linfócitos previamente incubados com soluções de 0,39 e 0,78 ng/mL de abrina, ricina ou pulchelina, ou LPS 10µg/mL (macrófagos), ou Concanavalina A 0,5µg/mL (linfócitos) durante 24h de incubação. As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de triplicata de 5 animais.

*** $p < 0,001$, significativo em relação ao controle negativo.

** $p < 0,01$, significativo em relação ao controle negativo.

* $p < 0,05$, significativo em relação ao controle negativo.

Tabela 1 – Porcentagem de viabilidade celular em PEC e células esplênicas murinas após exposição às concentrações de 0,39 e 0,78 ng/mL

	<i>Viabilidade (%)</i>	
	Macrófagos	Linfócitos
Abrina 0,39 ng/mL	84,03 ± 1,46	95,60 ± 1,59
Abrina 0,78 ng/mL	83,90 ± 2,56	96,50 ± 0,96
Ricina 0,39 ng/mL	97,14 ± 2,86	98,65 ± 0,41
Ricina 0,78 ng/mL	84,34 ± 1,49	96,00 ± 1,96
Pulchelina 0,39 ng/mL	98,68 ± 1,53	95,74 ± 1,27
Pulchelina 0,78 ng/mL	90,61 ± 2,54	94,27 ± 2,06
LPS 10 µg/mL	71,08 ± 0,16	-----
PMA 0,2 µg/mL	99,92 ± 0,15	-----
ConA 0,5 µg/mL	-----	100 ± 0,00

As concentrações de 0,39 e 0,78 ng/mL foram escolhidas para a realização dos demais testes, pois macrófagos e linfócitos apresentaram viabilidade acima de 80% em presença das proteínas nestas concentrações (Figura 7 e Tabela 1).

5.3- Determinação da produção de óxido nítrico

As células do exsudato peritoneal dos camundongos foram incubadas em triplicata com as soluções de abrina, ricina e pulchelina nas concentrações de 0,39 e 0,78 ng/mL, além do LPS (controle positivo) ou apenas meio RPMI-1640-C (controle negativo).

Após incubação por 24h, as proteínas não induziram níveis de NO estatisticamente significativos ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo. (Fig. 8 e Tabela 2).

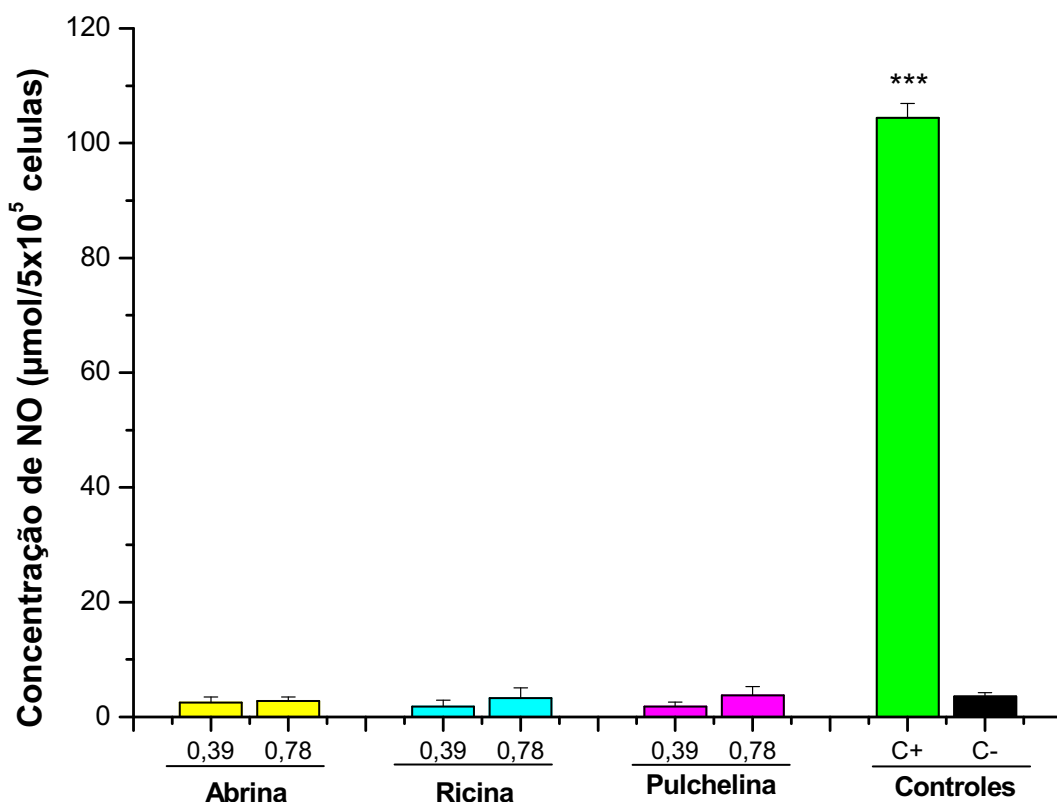


Figura 8. Produção de óxido nítrico em cultura de células do exsudato peritoneal. Os macrófagos peritoneais foram cultivados em meio RPMI-1640-C (C-) e com o LPS (C+). Os macrófagos peritoneais foram incubados com as soluções das proteínas por 24h nas concentrações de 0,39 e 0,78 ng/mL. Aos sobrenadantes das culturas, foi adicionado o reagente de Griess, e após 10 min. a placa foi lida em espectrofotômetro a 540nm. A concentração de nitrito foi obtida de uma curva padrão com quantidades conhecidas de NaNO₂. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicata de 5 animais.

***p<0,001, estatisticamente significante em relação ao controle negativo.

Tabela 2. Efeitos das RIPs abrina, ricina e pulchelina na produção de óxido nítrico em culturas de células peritoneais

<i>Produção de NO ($\mu\text{mols}/5\times10^5$ células)</i>					
Abrina (ng/mL)		Ricina (ng/mL)		Pulchelina (ng/mL)	
0,39	0,78	0,39	0,78	0,39	0,78
2,51 $\pm$ 0,99	2,80 $\pm$ 0,67	1,59 $\pm$ 0,70	3,29 $\pm$ 0,59	1,81 $\pm$ 0,76	3,56 $\pm$ 0,96
				104,44 $\pm$ 2,48	3,58 $\pm$ 0,63

5.4- Determinação da produção de peróxido de hidrogênio

As células do exsudato peritoneal dos camundongos foram incubadas em triplicata com as soluções de abrina, ricina e pulchelina nas concentrações de 0,39 e 0,78 ng/mL, além de PMA (controle positivo) ou tampão completo de vermelho de fenol (controle negativo).

As proteínas nas concentrações citadas acima não induziram níveis de H_2O_2 estatisticamente significativos ($p>0,05$) em relação ao controle negativo (Fig. 9 e Tabela 3).

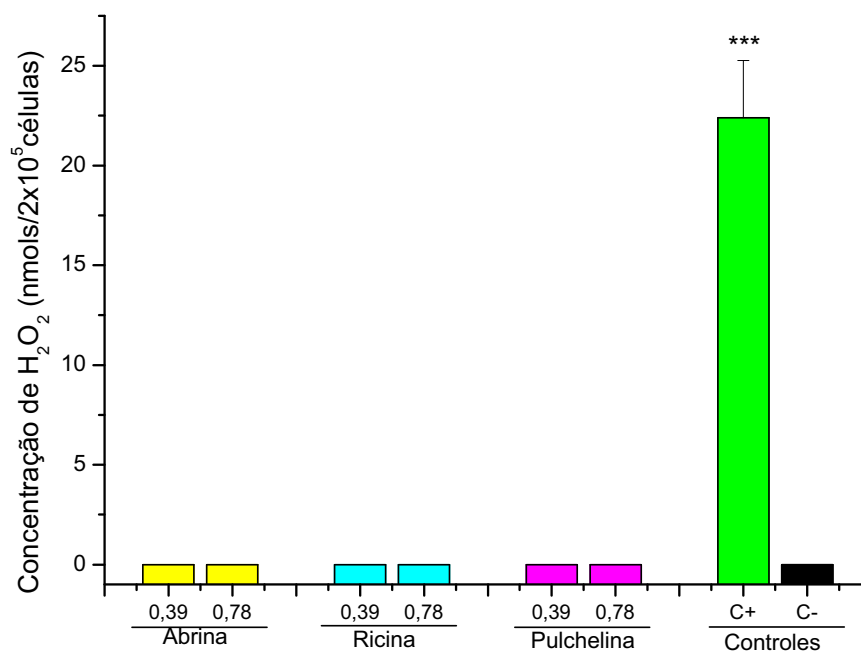


Figura 9. Produção de peróxido de hidrogênio em cultura de células do exsudato peritoneal. As células peritoneais foram cultivadas em vermelho de fenol completo (C-) ou com o PMA (C+). As células foram incubadas com as soluções de proteínas por 1h (0,39 e 0,78 ng/mL). A reação foi interrompida, e a seguir foram lidas em espectrofotômetro a 620nm. Os resultados foram expressos em nanomols de H₂O₂/2x10⁵ células, como a média ± desvio-padrão de triplicata de 5 animais.

***p<0,001, estatisticamente significativo em relação ao controle negativo.

Tabela 3. Efeitos das RIPs abrina, ricina e pulchelina na produção de peróxido de hidrogênio em culturas de células peritoneais

<i>Produção de H₂O₂ (nmols/2x10⁵ células)</i>						
Abrina (ng/mL)		Ricina (ng/mL)		Pulchelina (ng/mL)		Cont. Neg.
0,39	0,78	0,39	0,78	0,39	0,78	
0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
				22,39 ± 2,87		

5.5- Determinação da atividade inibitória quanto à produção de NO e H₂O₂

Para a realização desses testes, a viabilidade celular das células do exsudato peritoneal foi testada na presença concomitante das proteínas e dos agentes estimulantes (PMA ou LPS), demonstrando uma viabilidade superior a 80%, satisfatória para a realização dos ensaios.

As soluções de abrina, ricina e pulchelina inibiram a liberação de H₂O₂ após 1 hora de incubação nas concentrações de 0,39 e 0,78 ng/mL, confirmando o fato de não induzirem a sua produção (Fig. 9). As porcentagens de inibição das proteínas sobre a produção de H₂O₂ estão ilustradas na Tabela 4.

As proteínas abrina, ricina e pulchelina inibiram fracamente a produção de NO após 24 horas de incubação. As porcentagens de inibição das proteínas sobre a produção de NO estão ilustradas na Tabela 4.

Tabela 4 – Percentagem de inibição das RIPs sobre a produção de H₂O₂ e NO em células peritoneais

Inibição (%)						
	Abrina (ng/mL)		Ricina (ng/mL)		Pulchelina (ng/mL)	
	0,39	0,78	0,39	0,78	0,39	0,78
NO	20,13 ± 5,70	21,56 ± 2,38	16,59 ± 4,02	11,22 ± 4,34	21,18 ± 3,21	10,28 ± 4,50
H ₂ O ₂	76,04 ± 1,09	70,11 ± 2,26	71,09 ± 1,95	57,74 ± 0,23	86,81 ± 2,80	20,68 ± 2,03

5.6- Dosagens das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ e IL-10

As soluções de abrina, ricina e pulchelina nas concentrações de 0,39 e 0,78 pg/mL foram testadas em macrófagos para determinar se as mesmas são capazes de induzirem a produção de IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α , e em linfócitos para IL-10 e IFN- γ .

A abrina em todas as concentrações testadas não induziu a produção de IL-6 e TNF- α , contudo induziu levemente a produção de IL-1 β e fortemente a produção de IL-10, IL-12 e IFN- γ , sendo que para IL-12, a estimulação foi muito maior do que a exercida pelo LPS.

A ricina em todas as concentrações testadas não induziu a produção de IL-6, contudo, na concentração de 0,78 pg/mL, houve a indução de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-12, tendo resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$). Na concentração de 0,39 pg/mL, houve indução de IL-1 β , IL-12, IL-10 e IFN- γ .

Com relação à pulchelina, não houve estimulação da produção de IL-6 e IL-1 β , mas houve estimulação de TNF- α , IL-10, IFN- γ , na concentração de 0,39 pg/mL, e de IL-10, IFN- γ e IL-12, na concentração de 0,78 pg/mL.

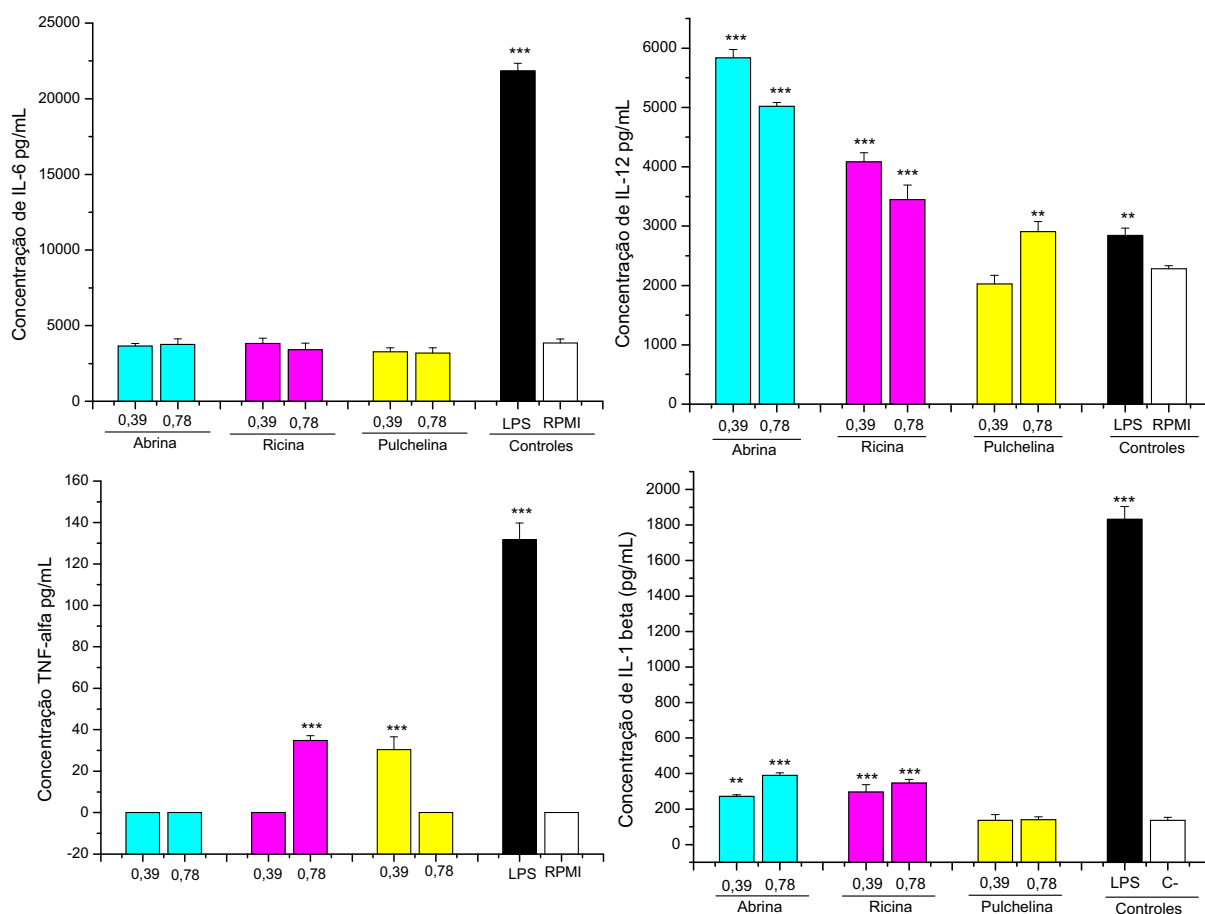


Figura 10: Indução de citocinas por abrina, ricina e pulchellina em macrófagos peritoneais. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de LPS (1 μ g/mL), ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C-). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Turkey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao controle negativo (RPMI-C).

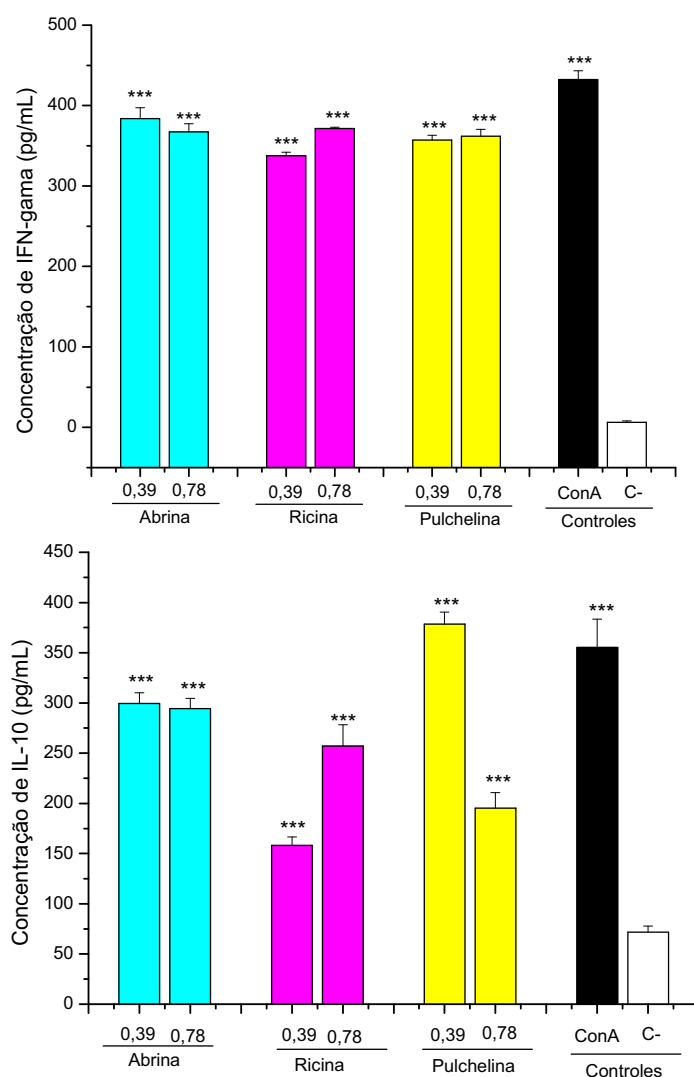


Figura 11: Indução de IFN- γ e IL-10 por abrina, ricina e pulchelina em células esplênicas. Sobrenadantes de linfócitos incubados somente na presença de solução de Conconavalina A ($0,5\mu\text{g/mL}$), ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente como controle positivo e negativo. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Turkey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao controle negativo (RPMI-C).

Tabela 5. Indução de citocinas por abrina, ricina e pulchelina em células peritoneais (IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α) e em células esplênicas (IL-10 e IFN- γ).

		Produção (pg/mL)							
		Abrina (ng/mL)		Ricina (ng/mL)		Pulchelina (ng/mL)			
		0,39	0,78	0,39	0,78	0,39	0,78	LPS/ConA	RPMI-C
IL-1 β	270,90 $\pm$ 8,79	390,06 $\pm$ 14,02	296,07 $\pm$ 41,4	346,34 $\pm$ 20,84	135,61 $\pm$ 33,55	139,34 $\pm$ 16,58	1832,53 $\pm$ 71,04	136,03 $\pm$ 17,63	
IL-6	3657,89 $\pm$ 172,34	3757,06 $\pm$ 373,76	3828,10 $\pm$ 351,16	3402,37 $\pm$ 436,20	3282,16 $\pm$ 262,22	3189,14 $\pm$ 355,72	21834,77 $\pm$ 506,09	3855,44 $\pm$ 267,88	
IL-10	305,27 $\pm$ 37,53	321,64 $\pm$ 39,55	158,26 $\pm$ 8,26	196,93 $\pm$ 44,68	365,04 $\pm$ 35,13	195,34 $\pm$ 15,20	355,15 $\pm$ 28,30	71,83 $\pm$ 5,98	
IL-12	5837,15 $\pm$ 139,58	5017,75 $\pm$ 63,81	4082,59 $\pm$ 156,31	3445,40 $\pm$ 245,81	2023,64 $\pm$ 148,05	2905,74 $\pm$ 170,15	2844,12 $\pm$ 122,62	2281,41 $\pm$ 51,67	
TNF- α	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	34,84 $\pm$ 2,25	30,44 $\pm$ 6,12	0,00 $\pm$ 0,00	131,64 $\pm$ 8,08	0,00 $\pm$ 0,00	
IFN- γ	383,89 $\pm$ 13,41	367,29 $\pm$ 10,30	337,51 $\pm$ 4,62	371,46 $\pm$ 1,68	357,00 $\pm$ 6,22	361,84 $\pm$ 8,57	432,26 $\pm$ 10,91	6,00 $\pm$ 2,03	

5.7- Determinação da atividade anti-proliferativa em células LM3 e LP07

As células de carcinoma de mama (LM3) e pulmão (LP07) foram incubadas em triplicata por 24 horas com as proteínas abrina, ricina e pulchelina nas concentrações de 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 1000 e 10000 ng/mL e meio MEM (controle negativo). O Taxol foi utilizado como droga padrão nas concentrações de 0,12, 0,24, 0,49, 0,98, 1,95, 3,91, 7,81, 15,63, 31,25, 62,50, 125 e 250 µg/mL.

Nos ensaios para determinação de atividade anti-proliferativa, verificou-se que as células LM3 e LP07 são sensíveis ao potencial tóxico das proteínas abrina, ricina e pulchelina, isoladamente, além da droga padrão, Taxol®. Os valores médios de IC₅₀ para as células LM3 e LP07 por 24 e 48 horas de exposição, estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 – Valores de IC 50 dos compostos para as células LM3 e LP07 após 24 horas de exposição

IC₅₀ (ng/mL)	LM3	LP07
Abrina	81,54 ± 2,56	175,2 ± 2,60
Ricina	822 ± 1,45	1084,9 ± 2,75
Pulchelina	74,98 ± 2,69	1127,0 ± 2,41
Taxol [®]	193,89.10 ³ ± 1,36	134,0.10 ³ ± 1,15

Tabela 7 – Valores de IC 50 dos compostos para as células LM3 e LP07 após 48 horas de exposição

IC₅₀ (ng/mL)	LM3	LP07
Abrina	42,8 ± 6,36	37,44 ± 5,52
Ricina	590,3 ± 2,26	609,2 ± 4,0
Pulchelina	91,94 ± 4,58	80,11 ± 5,76
Taxol [®]	12,65.10 ³ ± 2,7	85,84.10 ³ ± 1,99

6- DISCUSSÃO

Primeiramente, neste trabalho, foi determinada a concentração inibitória 50% (IC_{50}) das proteínas sobre macrófagos murinos. Em seguida, analisamos a viabilidade celular em macrófagos e em linfócitos tratados com as proteínas nas concentrações que seriam utilizadas nos testes imunológicos propriamente ditos, na presença e ausência de LPS ou PMA, de forma que se assegurasse a capacidade destas células responderem aos estímulos utilizados mostrando-se viáveis.

Em ratos, os sintomas de intoxicação por ricina são lesões necróticas graves no fígado, pâncreas e rins, inflamação e hemorragia graves no intestino, ascite maciça e efusão pleural (DERENZINI et al., 1976). Baseado nisso, procuramos encontrar, através do teste de viabilidade celular, uma concentração das proteínas que não apresentasse efeitos tóxicos, mas possuísse valor terapêutico.

A determinação do IC_{50} foi realizada em células peritoneais murinas com tempo de incubação de 24 horas. Pelos resultados apresentados na Figura 7, observa-se que os macrófagos mostraram-se muito sensíveis ao potencial tóxico das proteínas, sendo a abrina ($IC_{50} = 6,4 \pm 1,53$ ng/mL) mais tóxica do que a ricina ($IC_{50} = 11,8 \pm 1,66$ ng/mL), e esta que a pulchelina ($IC_{50} = 19,3 \pm 4,0$ ng/mL).

As diferenças observadas na toxicidade de diferentes RIPs não podem ser conferidas somente pela capacidade da proteína entrar nas células, o que é conferido pela presença da cadeia B (cadeia lectínica), pois depende também da capacidade da proteína escapar, ao menos em parte, 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.

Os resultados da viabilidade celular em linfócitos tratados com abrina, ricina e pulchelina nas concentrações utilizadas na dosagem das citocinas IL-10 e IFN- γ demonstraram uma viabilidade acima de 90%, o que garante uma resposta imunológica adequada (Fig. 7 e Tabela 1).

A função primordial do sistema imune é proteger o hospedeiro contra invasão de patógenos através de diferentes componentes celulares incluindo macrófagos, neutrófilos, linfócitos (T e B). Essas células em resposta a danos teciduais migram rapidamente para o sítio de agressão iniciando uma resposta inflamatória produzindo vários mediadores que se inter-relacionam.

Os macrófagos podem ser ativados a partir da estimulação com LPS e IFN- γ . Uma das principais características dos macrófagos ativados é o aumento de sua capacidade de liberar mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos como intermediários do oxigênio e nitrogênio, enzimas hidrolíticas e citocinas as quais podem agir na destruição de antígenos. No entanto, esses mediadores não são específicos e a liberação em excesso e descontrolada pode destruir tecidos normais (MONCADA et. al., 1991).

Outra característica dos macrófagos ativados é a capacidade de distinguir células normais das células com mitose estimulada ou células tumorais, e lisar apenas as tumorais. Esse reconhecimento seletivo pode ocorrer pela ligação de macrófagos ativados na superfície da membrana celular (FILDER e SCHROIT, 1998).

Os macrófagos quando ativados produzem diversos mediadores químicos e biológicos, como espécies reativas do nitrogênio e oxigênio e citocinas. O óxido nítrico é o componente principal do grupo chamado espécies reativas do nitrogênio. Ele exerce diversas funções no organismo como, neurotransmissão, homeostasia vascular, regulação imune e defesa do organismo (GATTI et al., 2004). Segundo Salvemini e colaboradores (1996), o óxido nítrico é um potente vasodilatador e seu envolvimento na resposta inflamatória pode ter relação com sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sangüíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Nos últimos anos, estudos demonstraram que o NO está envolvido em diversos processos biológicos afetando a carcinogênese, incluindo iniciação, promoção, progressão, metástase, micro-circulação tumoral e angiogênese (HOFSETH et al, 2003).

Durante a defesa contra organismos patogênicos, o NO produzido por macrófagos ativados pode atuar contra células epiteliais saudáveis vizinhas, danificando seu DNA e promovendo a carcinogênese. Baixas concentrações desse

mediador podem ter efeito anti-apoptótico, enquanto que altas concentrações podem induzir apoptose em células suscetíveis (HOFSETH et al., 2003).

Com relação à produção de NO pelas proteínas no presente estudo, não foi observada uma estimulação significativa (Fig. 8 e Tabela 2), e as proteínas exerceram uma leve inibição da produção do NO estimulada pelo LPS (Tabela 4), variando de $10,28 \pm 4,5$ a $21,56 \pm 2,38$ por cento.

Narayanan e colaboradores (2004) observaram através de seus estudos que a brina induz apoptose em células JR4 Jurkat, o que pode ser através da via mitocondrial, além disso, eles relataram que a brina induz a produção ROS, este sendo um efeito da perda do potencial de membrana da mitocôndria, que desencadeia eventos apoptóticos.

O peróxido de hidrogênio corresponde a outro mediador químico produzido por macrófagos ativados durante uma resposta inflamatória, sendo ele um dos principais componentes do grupo de espécies reativas do oxigênio (ROS). O peróxido de hidrogênio passou a ser considerado como um mensageiro nas cascatas de sinalização intracelular (RHEE, 1999). Níveis intracelulares moderados de ROS mostraram-se importantes como um estimulador de proliferação celular, porém, altos níveis podem resultar em dano celular, incluindo peroxidação dos lipídeos, danos ao DNA, oxidação de proteínas e inativação de enzimas, que podem conduzir à morte celular (BURDON, 1996; DREHER, JUNOD, 1996).

As proteínas avaliadas não induziram a produção de H_2O_2 (Fig. 9 e Tabela 3), porém elas exerceram uma forte inibição de sua produção (Tabela 4), ao redor de 70%, sendo esses resultados inéditos para a ricina e a pulchelina. É interessante notar que uma substância com capacidade inibidora de H_2O_2 pode apresentar grande potencial antiinflamatório e, conseqüentemente, contribuir ao não surgimento da carcinogênese. Resultados similares foram observados em trabalho anterior realizado em nosso laboratório utilizando a fração acetato de etila obtida da planta *Alchornea glandulosa* (LOPES et al., 2005).

A partir das sementes de *A. precatorius* pode-se obter quatro isoformas de brina (A-D) e uma aglutinina, esta sendo muito menos tóxica ($DL_{50} = 5 \text{ mg/Kg}$) em relação à brina ($DL_{50} = 2,8 \text{ } \mu\text{g/Kg}$) (OLSNES, PHIL, 1973). Em experimentos utilizando a aglutinina na forma nativa, tem-se observado que ela estimula macrófagos murinos a produzir $150 \text{ } \mu\text{M}$ de óxido nítrico quando as células foram tratadas com 10 ng/mL da aglutinina. Além disso, a aglutinina também estimulou alta

liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos, sendo esta estimulação independente da concentração de aglutinina testada (TRIPATHI, MAITI, 2003).

Os fagócitos podem migrar até os sítios de inflamação direcionados por um processo denominado quimiotaxia. Receptores específicos são encontrados na membrana dessas células e a ligação fator quimiotático/receptor pode desencadear uma série de eventos celulares e bioquímicos, incluindo alterações no potencial de membrana e fluxo de íons, rearranjo do citoesqueleto, extravasamento do conteúdo citoplasmático, liberação de vários mediadores como as citocinas (HAMPTON et al., 1998; FORMAN e TORRES, 2001; LUM et al., 2002).

Citocinas são peptídeos endógenos envolvidos na resposta imune. O delicado equilíbrio das citocinas e de outros mediadores inflamatórios parece ser o fator principal que pode conduzir a uma hiper-inflamação ou uma hiper-imunossupressão, ambos podendo afetar órgãos vitais não envolvidos na agressão inicial (DELONG, BORN, 2004).

Interleucina-1 é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, monócitos e células epiteliais. A secreção de IL-1 ativa uma cascata pró-inflamatória, incluindo proliferação de células Th1, produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-12. Produção aumentada de IL-1 é uma característica de desordens auto-imunes, como artrite reumatóide (DINARELLO, 1991). A atividade da IL-1 β diretamente influencia a severidade das doenças inflamatórias auto-imunes crônicas, tais como esclerose múltipla, doença óssea inflamatória e artrite reumatóide (DINARELLO, 1991; BIOQUE et al., 1995).

Enquanto que o TNF- α é o principal mediador da inflamação, com ações diretas sobre a destruição tecidual e reparação de lesões (BEUTLER, 1999). Além disso, TNF- α medeia muitos eventos cruciais para a iniciação de eventos inflamatórios agudos e crônicos, incluindo sobre-regulação da expressão de moléculas de adesão (SPRINGER et al., 1987; SPINGER, 1990), indução de outras citocinas de resposta precoce (IL-1 e IL-6) (LUKACS, STRIETER, KUNKEL, 1993) e a ativação de citocinas quimiotáticas específicas para leucócitos (quimiocinas) (OPPENHEIM et al., 1991). O TNF- α também tem a capacidade de estimular a produção de NO em macrófagos através da expressão de iNOS, então estimulando a atividade microbicida destas células (CARLOS et al., 2004)

No presente trabalho, observou-se uma produção de IL-1 β , estatisticamente significativa, pela abrina e ricina nas concentrações testadas ($p < 0,001$), contudo a

pulchelina não apresentou estimulação significativa ($p>0,05$). Em relação à produção de TNF- α , somente a ricina (0,78 ng/mL) e a pulchelina (0,39 ng/mL) apresentaram produção significativa ($p<0,001$) ao redor de 34,84 pg/mL e 30,44 pg/mL, respectivamente (Fig. 10 e Tabela 5). Nossos resultados em relação à pulchelina são inéditos sem nenhum relato na literatura.

Korcheva e colaboradores (2007) demonstraram que ricina na concentração de 10 ng/mL estimulou a produção de TNF- α (aproximadamente 20 pg/mL) em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6J (5×10^6 células), valor diferente do encontrado neste trabalho. Um dos fatores que poderia estar influenciando nesse resultado é que os pesquisadores americanos não realizaram o teste do sal de tetrazólio, MTT, que nos assegura a viabilidade celular intrínseca do teste.

Licastro e colaboradores (1993) relatam a indução da liberação de IL-1 β e TNF- α por células mononucleares humanas do sangue periférico quando tratadas com abrina. A liberação de TNF- α foi dose-dependente. A máxima liberação destas citocinas ocorreu quando as células foram tratadas com abrina 5,0 pM, sendo que, quando usado concentrações maiores da proteína não ocorreu liberação delas, após 24 horas de incubação. Além disso, observaram que quando o tempo de incubação foi aumentado para 48 horas, houve uma menor produção de TNF- α e maior produção de IL-1 β , quando comparado com incubação de 24 horas. Os autores sugeriram que estas citocinas produzidas por macrófagos estimulados e/ou lesados pela abrina podem contribuir para a patogênese das lesões e outros efeitos observados após intoxicação por abrina.

Ricina também estimulou a produção de TNF- α em células RAW 264.7, uma linhagem de macrófagos murinos, sendo também dose-dependente até a concentração de 100 ng/mL de ricina, e concentrações acima desta induz menor produção da citocina (KORCHEVA et al., 2005).

Além dos macrófagos serem potentes células secretoras de citocinas, os linfócitos T compartilham essa atividade. Células T são freqüentemente classificadas em 2 categorias, tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2). Células Th1 são as principais produtoras de IFN- γ e IL-2, e células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. As citocinas Th1 aumentam a imunidade mediada por células e as citocinas Th2 aumentam a imunidade humoral (MOSMANN et al., 1986).

Interferon- γ é uma glicoproteína homodimérica produzida por ambas as células T CD4⁺ e CD8⁺ e células NK (YOUNG, HARDY, 1990). No caso de células CD4⁺, IFN- γ é primariamente produzido pelo subconjunto Th1. IFN- γ exibe várias propriedades clássicas de ativação de macrófagos (FARRAR, SCHREIBER, 1993). Ele aumenta a expressão de antígenos de MHC classe II, induz produção de vários intermediários reativos do oxigênio, e potencializa síntese de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6. IFN- γ potencializa a produção de TNF- α em monócitos estimulados com LPS pelo aumento tanto da transcrição de TNF- α como da estabilidade do mRNA do TNF- α (HAYES, FREEMAN, DONNELLY, 1995). Nossos resultados de produção de IFN- γ mostram em todas as concentrações testadas, alta produção de IFN- γ (ao redor de 300 pg/mL, $p < 0,001$, comparados com o controle negativo) (Fig. 11 e Tabela 5).

O IFN- γ tem demonstrado potencializar a inibição do crescimento de células de câncer de mama *in vitro* (CORADINI et al., 1997; LINDNER e BORDEN, 1997). Estudo demonstrou que os linfócitos e IFN- γ colaboram para a proteção contra o desenvolvimento de sarcomas carcinógeno-induzidos, carcinomas epiteliais espontâneos e também para a seleção por células tumorais com imunogenicidade reduzida (SHANKARAN et al., 2001).

O IFN- γ foi originalmente definido como um agente com ação antiviral, mas suas propriedades incluem a regulação de vários aspectos da resposta imune, como a estimulação da atividade microbida dos macrófagos, estimulação da apresentação de antígenos pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal, coordenação das interações entre os leucócitos e o endotélio, efeitos na proliferação celular e na apoptose, bem como na estimulação e repressão de vários genes cuja significância funcional ainda permanece obscura (BOEHM *et al.*, 1997).

Quando uma resposta inflamatória aguda é ativada, a sequência de citocinas pró-inflamatórias inicia-se com a produção imediata de IL-1 e TNF- α . Eles estimulam a liberação de IL-6 que realiza um importante papel iniciando a reação hepática de fase aguda (LUSTER et al., 1994).

A Interleucina-6 é uma citocina multifuncional com vários efeitos estimuladores sobre o crescimento celular e inflamação. A IL-6 é produzida por células B e T, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e células epiteliais. Ela está envolvida na iniciação e manutenção da resposta inflamatória de fase aguda. Além disso,

aumenta proteínas de resposta de fase aguda associadas com inflamação e dano tecidual, tem sido implicada na diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas, na proliferação e diferenciação de uma variedade de tipos celulares, por exemplo, células neuronais e mielóides (SCHELLER, OHNESORGE, ROSE-JOHN, 2006). IL-6, como outras citocinas cujos receptores compartilham a subunidade de transdução gp130, tem sido mostrada inibir a produção de TNF- α tanto *in vivo* e como *in vitro* (ADERKA, LE, VILCEK, 1989).

Nossos resultados mostram uma produção de IL-6 (Fig 10 e Tabela 5) pelas proteínas nas concentrações testadas similar à observada no controle de células (células somente com meio de cultura), ou seja, não observamos liberação de IL-6 estatisticamente significativas pelas proteínas. Diferente de nossos resultados, Korcheva e colaboradores (2005) observaram um aumento nos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no soro de camundongos, 24 horas após serem tratados por via intravenosa com ricina (12 μ g/100g de peso corpóreo).

A IL-12 é uma citocina imuno-reguladora que promove imunidade mediada por células. Ela estimula a produção de IFN- γ por células NK e T. A IL-12 está envolvida na indução e manutenção de respostas Th1 (BROMBACHER, KASTELEIN, ALBER, 2003). Altos níveis de IL-12 produzidos por células dendríticas ativam células T CD4 para secreção de citocinas Th1. Contudo, células dendríticas secretoras de IL-12 não polarizam fortemente a secreção de citocinas por células T CD8+, mas aumenta bastante a avidéz funcional das células T, provavelmente em parte através da expressão aumentada de CD8 $\alpha\beta$ (XU et al., 2003).

Outra citocina determinada foi IL-12, na qual observamos uma alta indução desta citocina pelas proteínas, sendo maior que a indução pelo LPS, utilizado como controle positivo. Contudo a produção desta citocina pela pulchelina na concentração 0,39 ng/mL não foi estatisticamente significativa, sendo levemente menor que a encontrada no controle negativo (células somente na presença do meio de cultura) (Fig. 10 e Tabela 5).

Um dado importante que nos chama a atenção é a produção de mediadores antiinflamatórios. A resposta antiinflamatória inicia-se com a produção de IL-1ra, receptor solúvel de TNF- α e IL-10. Isto reduz os níveis e atividade de IL-1 e TNF- α . Dependendo do estímulo físico, outras citocinas como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de transformação e crescimento beta (TGF- β) são

produzidos e desempenham um papel no processo de remodelação do tecido (KELLY, 1990; RUBIN et al. 1995).

A IL-10 é produzida por várias células, incluindo linhagem de monócitos/macrófagos, queratinócitos, linfócitos T e B e mastócitos. Ela possui atividades imuno-modulatórias potentes, afetando múltiplos tipos celulares em diferentes formas. Então, IL-10 induz proliferação ou diferenciação de mastócitos, linfócitos T citotóxicos, células B, e timócitos; aumenta citotoxicidade dependente de antígeno mediada por monócito, e respostas de células T a IL-2. A IL-10 também possui funções imunossupressoras, diminuindo a atividade de células T e NK e inibindo função de apresentação de antígenos. IL-10 é também um potente inibidor de monócitos/macrófagos, suprimindo sua capacidade de secretar citocinas e servir como células acessórias para estimulação da função de célula T (PARRY et al., 1997).

A produção de IL-10 em culturas de linfócito na presença das proteínas em estudo mostra valores de moderados a altos (Fig. 11, Tabela 5), demonstrando que as RIPs do gênero *Abrus* induziram maiores liberações, podendo significar proteínas com capacidade antiinflamatória.

Mota (1997) observou que a isoforma 3 da pulchelina induziu significativamente exsudação de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos Swiss após 6 horas da injeção intraperitoneal. Além disso, todas as isoformas apresentaram atividade quimiotática *in vitro* para neutrófilos humanos.

A IL-10 tem sido sugerida como um potente sinal de recrutamento para migração de leucócitos *in vivo* (PARRY et al., 1997) e assim sendo essa migração de neutrófilos pode ser devido à estimulação da produção de IL-10 pela pulchelina observada no presente estudo. Outro dado que corrobora com a produção de IL-10 é de que a administração de ricina induz uma resposta de IgE, aumentando também a resposta contra outros antígenos administrados concomitantemente (THORPE et al., 1989).

Tudo leva a crer que abrina, ricina e pulchelina, por serem imunogênicas, podem funcionar como coadjuvantes contribuindo para o aumento da resposta imune contra diversos antígenos a que o organismo se exponha conjuntamente. Isso reflete diretamente nas observações atuais de que as imunizações mais eficientes englobam ambas as respostas Th1 e Th2. Nesse ponto particular, em nosso estudo,

essas proteínas induziram esses dois tipos de resposta imune observada a partir de seu perfil de citocinas:

- abrina promoveu a produção de IL-1 β , IL-12, IFN- γ e IL-10;
- ricina produziu IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-10;
- pulchelina promoveu a produção de IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-10.

Sabe-se que as interações entre as células tumorais com seu microambiente podem afetar o crescimento tumoral e a formação de metástase. O microambiente tumoral pode variar entre os tipos de tumores e os estágios da doença, fato que é complexo e consiste de muitos fatores e tipos celulares. Dentre os componentes do microambiente tumoral, as células inflamatórias e as citocinas têm demonstrado desempenhar um papel-chave no câncer de mama (BEN-BARUCH, 2003). Outro fato, não menos importante quanto às proteínas em análise, é que pela presença de forte toxicidade, elas podem ser utilizadas como antitumorais.

Em 2005, o câncer foi o responsável por 13% de todas as mortes no mundo. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: pulmão, estômago, fígado, cólon e mama. No Brasil, as estimativas para 2008 apontam que, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata de pulmão no sexo masculino e os câncer de mama e de cólon do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (Instituto Nacional do Câncer, 2008).

O câncer de pulmão está associado ao ato de fumar. A contínua exposição aos carcinógenos do cigarro resulta no acúmulo de diversas alterações de genes relacionados à tumorigênese conduzindo a lesões bronquiais neoplásicas (PANANI, ROUSSOS, 2006).

Com relação ao câncer de mama, o histórico familiar e a exposição acumulativa ao longo da vida a hormônios reprodutivos, este sendo o mais significativo e bem caracterizado fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de tumor (POLYAK, 2006).

Mulheres, que entraram na menarca precocemente, ou que entraram na menopausa tardiamente, podem desenvolver câncer de mama pelo prolongamento do tempo de exposição ao estrógeno. Este induz a proliferação celular, tanto benigna como maligna e induz a secreção de fatores de crescimento mitógenos por estimulação direta (SCHNITT et al., 1988).

O papel do sistema imune na proteção contra o câncer tem sido marcado por duas posições extremas. Sugere-se que a imuno-vigilância seja responsável pela detecção e eliminação das células tumorais, sendo o principal mecanismo pelo qual o desenvolvimento tumoral é controlado. Por outro lado, a imuno-estimulação prediz que baixa reatividade imune contra tumores, como é usualmente observada em pacientes com câncer, é estimulante para o crescimento das células tumorais (JAKÓBISIAK, LASEK, GOLAB, 2003). A infiltração tumoral por células inflamatórias tem sido detectada em humanos e em tumores experimentais. Sendo estes infiltrados predominantemente compostos por linfócitos e macrófagos, mas células dendríticas, granulócitos e mastócitos também podem estar presentes (BOON et al., 1994).

A presença de anticorpos, em pacientes com tipos distintos de tumores, que reconhecem antígenos e que pode estar vinculada com síndromes paraneoplásicas, o que indica uma resposta policlonal e multifuncional nestes pacientes (ANTOINE et al., 1999; BAZHIN et al., 2001; FERNANDEZ MADRID et al., 2005).

Deve-se levar em conta que as proteínas com elevada expressão nas células tumorais, poderiam estar atuando como antígenos desencadeando uma resposta imune humoral em portadores de tumor (FISZMAN et al., 2005). Baseados nessa descoberta, pesquisadores estão desenvolvendo um novo tratamento contra o câncer chamado imunotoxinas, nas quais as moléculas de toxicidade conhecida são acopladas às moléculas de anticorpos contra antígenos específicos tumorais. Os anticorpos funcionam direcionando as toxinas para as células tumorais.

Algumas imunotoxinas têm sido produzidas utilizando-se proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) dos tipos I e II. Contudo, as RIPs do tipo II não podem ser usadas sem passarem por tratamento, bloqueando-se seus sítios de ligação lectínica, para que as imunotoxinas não se liguem às células saudáveis que possuem receptores contendo carboidratos em sua composição. Outra opção foi utilizar somente a cadeia com atividade enzimática, cadeia A, das RIPs tipo II, na produção das imunotoxinas, que tem se mostrado mais promissoras (FRACASSO et al., 2004).

Realizando-se a técnica colorimétrica, que utiliza solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), demonstramos a citotoxicidade, após 24 e 48 horas de incubação, em linhagens de câncer de mama (LM3) e câncer de pulmão (LP07) murinos (Tabelas 6 e 7), através da determinação do IC₅₀ da abrina, da ricina e da pulchelina em diversas concentrações, e comparamos os resultados obtidos

com os encontrados quando utilizamos soluções em diversas concentrações de Taxol[®], um medicamento antineoplásico utilizado em rotina contra câncer de pulmão (DAVIES et al., 2003) e de mama (OZOLS, 2003).

Em nosso trabalho, observamos que as proteínas se mostraram extremamente mais tóxicas às células tumorais do que o Taxol[®] tanto em 24 horas (Tabela 6), como em 48 horas de incubação (Tabela 7). A citotoxicidade da abrina, ricina e taxol[®], com exceção da pulchelina, elevou-se com o aumento do tempo de incubação com as células LM3. As proteínas mostraram maior toxicidade às células LM3 do que às LP07 após 24 horas de incubação, enquanto que com tempo de incubação de 48 horas, a toxicidade às duas linhagens celulares é equivalente. Em relação ao Taxol[®], este se mostrou mais tóxico às células LP07 com 24 horas de incubação, a situação se invertendo com o tempo de incubação de 48h, onde o Taxol[®] mostra maior toxicidade às células LM3.

Estudos realizados com diferentes tipos celulares mostram alta variabilidade na sensibilidade entre as RIPs. Experimentos utilizando células mutantes com várias alterações no transporte intracelular de proteínas mostraram que elas são mais resistentes às RIPs do que células normais (ROFF et al., 1990; LAURIE; ROBBINS, 1991). Resultados de experimentos sugerem que existe uma correlação entre a citotoxicidade das RIPs e a rota intracelular delas nas células, o que pode variar entre diferentes tipos celulares dependendo da expressão de diferentes tipos de moléculas-ligantes na superfície celular, da variedade de ligantes conduzindo-as a diferentes compartimentos e a disponibilidade de várias vias de transporte das RIPs para o alvo citosólico (SANDVIG et al., 2002).

Abrina-a, uma isorforma da abrina, mostrou atividade citotóxica e cito-aglutinante contra diversas linhagens tumorais como Jurkat, CCRF-HSB-2, MOLT-4, RPMI8402 e BALL-1. CCRF-CEM e BALM-1 foram fracamente aglutinadas pela abrina-a, mas elas foram muito sensíveis ao potencial tóxico da abrina-a. Enquanto que, as células NALM-6 foram fortemente aglutinadas, mas mostrando pouco menos sensíveis ao citotoxicidade promovida pela toxina (MORIWAKI et al., 2000).

Fodstad e colaboradores (1977) transplantaram células ascíticas de Ehrlich em camundongos e depois trataram esses camundongos com abrina e ricina. Observaram que a abrina aumentou o tempo de sobrevivência dos camundongos entre 43 e 93%, em relação aos camundongos não tratados com a proteína, os animais apresentaram somente uma pequena perda de peso, que foi recuperado

após o sexto dia. Contudo, a ricina só aumentou o tempo de sobrevida em 29%, mas as duas proteínas promoveram uma considerável redução na formação de ascites.

7 - CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os macrófagos murinos mostraram-se sensíveis ao potencial tóxico da abrina, ricina e pulchelina: abrina >ricina>pulchelina;
- As concentrações das proteínas utilizadas nos testes imunológicos determinaram viabilidade acima de 80% em culturas de células do exsudato peritoneal e células esplênicas;
- A abrina, ricina e pulchelina não induziram a estimulação da produção de óxido nítrico, exercendo uma leve inibição sobre a produção deste mediador estimulada pela presença do LPS;
- A abrina, ricina e pulchelina não induziram a estimulação da produção de peróxido de hidrogênio, exercendo uma forte inibição sobre a produção deste mediador estimulada pela presença do PMA.
- Quanto à produção das citocinas:
 - a abrina promoveu a produção de IL-1 β , IL-12, IFN- γ e IL-10.
 - a ricina produziu IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-10 e TNF- α .
 - e a pulchelina promoveu a produção de IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-10.As proteínas apresentaram tanto uma resposta Th1 (resposta imune celular) como Th2 (resposta imune humoral).
- A abrina, ricina e pulchelina nas concentrações testadas não induziram a produção de IL-6 pelos macrófagos.
- Quanto à citotoxicidade das proteínas sobre as células LM3 e LP07:
 - As proteínas mostraram-se mais tóxicas do que a droga controle, Taxol, em ambos os tempos de incubação.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAEV, F.I. Plant-derived agents against cancer. In: GUPTA, S.K. (Ed) Pharmacology and therapeutics in the new millennium. New Delhi: **Narosa Puplising House**, 2001. p. 345-354.

ACKERMAN, G.E.; SMITH, M.E.; MENDELSON, C.R.; MACDONALD P.C.; SIMPSON, E.R. Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. **J. Clin Endocrinol. Metab.**, v. 53, p. 412-417, 1981.

ADERKA, D.; LE, J.; VILCEK, J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. **J Immunol**, v. 143, p. 3517-3523, 1989.

ALLEVA, D.C.; BURGER, C.J.; ELGER, K.D. Tumor-Induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF- α production: role of tumor-derived IL-10, TGF- β , and prostaglandin E₂. **J Immunol**, v. 153, p. 1674-1686, 1994.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures 2004. Atlanta, 2004. 60 p. Disponível em: www.cancer.org Acesso em: 13 nov. 2006.

ANDERSON, G.M.; NAKADA, M.T.; DEWITTE, M. Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment of cancer. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 4, n. 4, p. 314-320, 2004.

ANTOINE, J.C.; ABSI, L.; HONNORAT, J.; BOULESTEIX, J.M.; DE BROUKER, T.; VIAL, C.; BUTLER, M.; DE CAMILLI, P.; MICHEL, D. Antiampiphysin antibodies are associated with various paraneoplastic syndromes and tumors. **Arch Neurol**, v. 56, p. 151-152, 1999.

BAENZIGER, J.; TIETE, D. Structural determinants of Ricinus communis agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 4147-4151, 1979.

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.

BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, n. 2, p. 135-141, 2002.

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

BARBIERI, L.; VALBONESI, P.; BONORA, E.; GORINI, P.; BOLOGNESI, A.; STIRPE, F. Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 518–522, 1997.

BASS, H. W.; OBRIAN, 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.

BAZHIN, A.V.; SHIFRINA, O.N.; SAVCHENKO, M.S.; TIKHOMIROVA, N.K.; GONCHARSKAIA, M.A.; GORBUNOVA, V.A.; SENIN, I.I.; CHUCHALIN, A.G.; PHILIPPOV, P.P. Low titre against recoverin in sera of patients with small cell lung cancer without a loss of vision. **Lung Cancer**, v. 34, p. 99-104, 2001.

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.

BEN-BARUCH, A. Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions. **Breast Cancer Res.**, v. 5, n. 1, p. 31–36, 2003.

BENIGNI, F.; CANEVARI, S.; GADINA, M.; ADOBATI, E.; FERRERI, A.J.M.; FERRARIS DI CELLE, E.; COMOLLI, R.; COLNAGHI, M.I. Preclinical evaluation of the ribosome-inactivating proteins PAP-1, PAP-S and RTA in mice. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 17, p. 829–839, 1995.

BEUTLER, B.A. The role of tumor necrosis factor in health and disease. **J Rheumatol Suppl.**, v. 57, p. 16-21, 1999.

BIOQUE, G.; CRUSIUS, J.B.; KOUTROUBAKIS, I.; BOUMA, G.; KOSTENSE, P.J.; MEUWISSEN, S.G.; PEÑA, A.S. Allelic polymorphism in IL-1 β and IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) genes in inflammatory bowel disease. **Clin Exp Immunol**, v.102, p. 379–383, 1995.

BIRD, S.; ZOU, J.; WANG, T.; MUNDAY, B.; CUNNINGHAM, C.; SECOMBES, J. Evolution of interleukin-1 β . **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, p. 483–502, 2002.

BODDUPALLI, C. S.; GHOSH, S.; RAHIM, S. S.; NAIR, S.; EHTESHAM, N. Z.; HASNAIN, S. E.; MUKHOPADHYAY, S. Nitric oxide inhibits interleukin-12 p40 through p38 MAPK-mediated regulation of calmodulin and c-rel. **Free Radic Biol Med.**, v. 42, n. 5, p. 686-697, 2007.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 749–795, 1997.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J. Extx Med.**, v. 174, p. 1549, 1991.

BONNOTTE, B.; LARMONIER, N.; FAVRE, N.; FROMENTIN, A.; MOUTET, M.; MARTIN, M.; GURBUXANI, S.; SOLARY, E.; CHAUFFERT, B.; MARTIN, F. Identification of tumorinfiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system. **J. Immunol.**, v. 167, p. 5077–5083, 2001.

BOON, T.; CEROTTINI, J.C.; VAN DEN EYNDE, B.; VAN DER BRUGGEN, P.; VAN PEL, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. **Annu Rev Immunol**, v.12, p. 337–366, 1994.

BROMBACHER, F.; KASTELEIN, R. A.; ALBER, G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses **Trends Immunol**, v. 24, n.4, p. 207-212, 2003.

BURDON, R. H. Control of cell proliferation by reactive oxygen species. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 24, p. 1028 – 1032, 1996.

CARLOS, I. Z.; MONNAZZI, L. G. S.; FALCÃO, D. P.; DE MEDEIROS, B. M. M. TNF- α , H₂O₂ and NO response of peritoneal macrophages to *Yersinia enterocolitica* O:3 derivatives. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 207–212, 2004.

CASTILHO, P.V.; GOTO, L.S.; ROBERTS, L. M.; ARAÚJO A.P.U. Isolation and characterization of four type 2 ribosome inactivating pulchellin isoforms from *Abrus pulchellus* seeds. **FEBS J**, v. 275, p. 948–959, 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.

CICERAN, M. Ricinus Communis L. Disponível em: <http://www.istrianet.org/istria/flora/herbs-roots-vegies/ricinus-communis.htm>. Acessado em 02 de fevereiro de 2008.

City of Coral Springs. Disponível em:
<http://www.coralsprings.org/environment/sandyridge/Vegetation%20Survey/RosaryP>
 ea.cfm. Acessado em 02 de fevereiro de 2008.

CORADINI, D.; BIFFI, A.; COSTA, A.; PELLIZZARO, C.; PIRRONELLO, E.; DI FRONZO, G. Effect of sodium butyrate on human breast cancer cell lines. **Cell Prolif.**, v. 30, p. 149, 1997.

CRAIG, H.L.; ALDERKS, O.H.; CORWIN, A.H.; DIEKE, S.H.; KAREL, C.L. Preparation of toxic ricin. **US Patent Office**, v. 3, n. 60, p. 165, 1952.

D'ANDREA, A.; RENGARAJU, M.; VALIANTE, N.M.; CHEHIMI, J.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHAN, S.H.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; NICKBARG, E.; CHIZZONITE, R.; WOLF, S.F.; TRINCHIERI, G. Production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1387–1398, 1992.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Human Lymphocyte Interferon γ -Production by Suppressing Natural Killer Cell Stimulatory Factor/IL-12 Synthesis in Accessory Cells. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 1041-1048, 1993.

DAVIES, A. M.; LARA JR, P. N.; MACK, P. C.; GANDARA D. R. Docetaxel in non-small cell lung cancer: a review. **Expert Opin Pharmacother**, v. 4, n. 4, p. 553-565, 2003.

DELONG, W.G.; BORN, C.T. Cytokines in patients with polytrauma. **Clin. Orthop.**, v. 422, p. 57–65, 2004.

DEMPSEY, P.W.; DOYLE, S.E.; HE, J.Q.; CHENG, G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 14, p. 193-209, 2003.

DERENZINI, M.; BONETTI, E.; MARIONOZZI, V.; STIRPE, F. Toxic effects of ricin: studies on the pathogenesis of liver lesions. **Virchows Arch B Cell Pathol**, v. 20, p. 15-28, 1976.

DESCOTES, G.; ROMANO, M.; STIRPE, F.; SPREAFICO, F. The immunological activity of plant toxins used in the preparation of immunotoxins II. The immunodepressive activity of gelonin. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 455–463, 1985.

DE VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat. Rev. Câncer**, v. 6, p. 24–37, 2006.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 1209, 1991.

DINARELLO, C.A. Biology of interleukin 1. **Faseb J**, v. 2, p. 108-115, 1988.

DINARELLO, C.A. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. **Curr Opin Immunol**, v. 3, p. 941–948, 1991.

DREHER, D.; JUNOD, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur. J. Cancer**, v. 32, p. 30–38, 1996.

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.

ENDERS, S.; VAN DER MEER, J.W.M.; DINARELLO, C.A. Interleukin 1 and the pathogenesis of fever. **Eur J Clin Invest.**, v. 17, p. 469-474, 1987.

ENDO, Y., MITSUI, K. MOTIZUKI, M., TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal caused by the toxins. **J. Biol. Chem.**, v. 262, 5908-5912, 1987.

ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 8128-8130, 1987.

ENDO, Y.; GLUCK, A.; WOOL, I. G. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. **J. Mol. Biol.**, v. 254, p. 848–855, 1991.

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;

FALKOFF, R.J.M.; MURAGUCHI, A.; HONG, J-X.; BUTLER, J.L.; DINARELLO, C.A.; FAUCI, A.S. The effects of interleukin 1 in human B cell activation and proliferation. **J Immunol.**, v. 131, p. 801-805, 1983.

FARIVAR, A. S.; MERRY, H. E.; FICA-DELGADO, M. J.; MCCOURTIE, A. S.; MACKINNON-PATTERSON, B. C.; MULLIGAN, M. S. Interleukin-6 regulation of direct lung ischemia reperfusion injury. **Ann Thorac Surg.**, v. 82, n. 2, p. 472-478, 2006.

FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 571, 1993.

FERNANDEZ MADRID, F.; KARVONEN, R.L.; ENSLEY, J.; KRAUT, M.; GRANDA, J.L.; ALANSARI, H.; TANG, N.; TOMKIEL, J.E. Spectra of antinuclear antibodies in patients with squamous cell carcinoma of the lung and of the head and neck. **Cancer Detect Prev**, v. 29, p. 59-65, 2005.

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

FILDER, I.J.; SCHROIT, A.J. Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: discrimination of altered self. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 948, p. 151-173, 1998.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2081, 1989.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.H.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 147, p. 3815, 1991.

FISZMAN, G.; CATTANEO, V.; DE LA TORRE, E.; COLOMBO, L.; MIDDONNO, C.; SACERDOTE DE LUSTIG, E.; SALES, M. E. Autoanticuerpos contra receptores muscarínicos en cáncer de mama. **Rev Quim Viva**, v. 3, n. 4, 2005.

FODSTAD, O.; KVALHEIM, G.; GODAL, A.; LOTSBERG, J.; AAMDAL, S.; HOST, H.; PIHL, A. Phase I study of the plant protein ricin. **Cancer Res.**, v. 44, p. 862-865, 1984.

FODSTAD, O.; OLSNES, S.; PIHL, A. inhibitory effect of abrin and ricin on the growth of transplantable murine tumors and of abrin on human cancers in nude mice. **Cancer Res**, v. 37, p. 4559-4567, 1977.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Mol. Aspects Med.**, v. 22, p.189-216, 2001.

FRACASSO, G.; BELLISOLA, G.; CASTELLETTI, D.; TRIDENTE, G.; COLOMBATTI, M. Immunotoxins and other conjugates: preparation and general characteristics. **Mini Rev Med Chem.**, v. 4, p. 545-562, 2004.

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.

FRANZ, H. The ricin story. In: Franz, H. (Ed) **Advances in Lectin Res**, v. 1, **Verlag Volk und Gesundheit**, Berlin, p. 10–25, 1988.

FUCHS, D. A.; JOHNSON, R. K. Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent from *Taxus brevifolia*, acts as a mitotic spindle poison. **Cancer Treat. Rep.**, v. 62, p. 1219-1222, 1978.

GATTI, G.; SIMSEK, S.; ZURRIDA, S.; KURNE, A.; GIANNETTI, I.; DEMIRER, S.; SMEETS, A.; CALDARELLA, P.; VENTO, A.R.; GIRALDO, A.; LUINI, A. Possible role of nitric oxide in the biology of breast carcinoma: review of the available literature. **The Breast**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2004.

GATTONI, A.; PARLATO, A.; VANGIERI, B.; BRESCIANI, M.; DERNA, R. Interferongamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts). **Clin. Ter.**, v. 157, n. 4, p. 377–386, 2006.

GAZZINELLI, K.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 148, p. 1792, 1992.

GINSBERG, R.J.; VOKES, E.E.; RABEN, A. Cancer of the lung. In: DEVITA JUNIOR. Cancer: principles and practices of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 658-677, 1997.

GONZALEZ, T. V.; FARRANT, S. A.; MANTIS, N. J. Ricin induces IL-8 secretion from human monocyte/macrophages by activating the p38 MAP kinase pathway. **Molecular Immunology.**, v. 43, p. 1920–1923, 2006.

GOTO, L.S.; BELTRAMINI, L.M.; DE MORAES, D.I.; MOREIRA, R.A.; ARAÚJO, A.P.U. Abrus pulchellus type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar binding B chain. **Protein Expr Purif.**, v. 31, n. 1, p. 12-18, 2003.

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.

GROSSBARD, M.; LAMBERT, J.; GOLDMACHER, V.; SPECTOR, N.; KINSELLA, J.; ELISEO, L.; CORAL, F.; TAYLOR, J.; BATTLER, W.; EPSTEIN, C.; NADLER, L. Anti-134-blocked ricin: a phase 1 trial of 7-day continuous infusion in patients with B-cell neoplasm. **J. Clin. Oncol.**, v. 11, p. 726-737, 1993.

GUBLER, U.; CHUA, A.O.; SCHOENHAUT, D.S.; DWYER, C.M.; MCCOMAS, W.; MOTYKA, K.; NABAVI, N.; WOLITZKY, A.G.; QUINN, P.M.; FAMILLETTI, P.C.; GATELY, M.K. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 88, p. 4143, 1991.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett.**, v. 281, p. 9–19, 1991.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

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.

HASSOUN, E.; WANG, X. Ricin-induced toxicity in the macrophage J744A.1 cells: the role of TNF-alpha and the modulation effects of TNF-alpha polyclonal antibody. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v.14, p. 95–101, 2000.

HAYES, M. P.; FREEMAN, S. L.; DONNELLY, R. P. Interferon- γ priming of monocytes enhances LPS-induced TNF- α production by increasing both transcription and mRNA stability. **Cytokine**, v. 7, p. 427, 1995.

HENDRZAK, J.A.; BRUNDA, M.J. Interleukin-12: biologic activity, therapeutic utility, and role in disease. **Lab. Invest.**, v. 72, p. 619–637, 1995.

HERMANN, M.S.; BEHNKE, W.D. A characterization of abrin A from the seeds of the *Abrus precatorius* plant. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 667, p. 370–410, 1981.

HIBBS, J. B. JR.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and amino nitrogen to nitrate. **Science.**, v. 235, p. 473–476, 1987.

HIGUCHI, S., TAMURA, T., ODA, T. Cross-talk between the pathways leading to the induction of apoptosis and the secretion of tumor necrosis factor- α in ricin-treated RAW 264.7 cells. **J. Biochem.**, v. 134, p. 927–933, 2003.

HIRANO, T.; YASUKAWA, K.; HARADA, H.; WATANABE, T.T.Y.; MATSUDA, T.; KASHIWAMURA, S.-I.; NAKAJIMA, K.; KAYAMA, K.; IWAMATSU, A.; TSUNASAWA, S.; SAKIYAMA, F.; MARSUI, H.; TAKAHARA, Y.; TANIGUCHI, T.; KISHIMOTO, T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. **Nature**, v. 324, p. 73–76, 1986.

HOFSETH, L. J.; HUSSAIN, S.P.; WOGAN, G.N.; HARRIS, C.C. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. **Free Radic Biol Med.**, v. 34, n. 8, p. 955–968, 2003.

HSU, D.H.; MOORE, K.W.; SPITS, H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN- γ synthesis and lymphokine-activated killer activity. **Int. Immunol.**, v. 4, p. 563, 1992.

HUANG, F. P.; NIEBALA, W.; WEI, X. Q.; XU, D.; FENG, G. J.; ROBINSON, J. H.; LAM, C.; LIEW, F. Y. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the

inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 4062–4070, 1998.

INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL.
Disponível em:
http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Ricinus_communis.htm. Acesso em:
25 fev 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 12 nov 2008.

ISHIGURO, M.; TAKAHASHI, T.; FUNATSU, G.; HAYASHI, K.; FUNATSU, M.
Biochemical studies on ricin. i. purification of ricin. **J. Biochem. Tokyo**, v. 55, p. 587-592, 1964.

JAKÓBISIAK, M.; LASEK, W.; GOLAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunol Lett**, v. 90, p. 103–122, 2003.

JOHNSON, D.H.; GRECO, F.A. Small cell carcinoma of the lung. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 4, p. 303-336, 1986.

JUAN, T.G. Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) y sus aplicaciones en la construcción de inmunotoxinas para la terapia experimental del cáncer. **Anal. Real. Acad. Farm.**, v. 66, n. 3, p. 1-21, 2000.

KATZUNG, B.G. Quimioterapia do câncer. In: Farmacologia básica & clínica. Tradução por Patricia Lydie Voeux. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 55, p. 803-832.

KELLY, J. Cytokines of the lung. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 141, p. 765-788, 1990.

KHAN, T.; WARING, P. Macrophage adherence prevents apoptosis induced by ricin. **Eur J Cell Biol.**, v. 62, n. 2, p. 406-414, 1993.

KINGSTON, D. G. I. Taxol, a molecule for all seasons (Review). **Chem. Commun.**, 867-880, 2001.

KINGSTON, D. G. I. The shape of things to come: structural and synthetic studies of taxol and related compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1844–1854, 2007.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 239–267, 2004.

KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R.M.; CLARK, S.C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 827, 1989.

KORCHEVA, V.; WONG, J.; CORLESS, C.; IORDANOV, M.; MAGUN, B. Administration of ricin induces a severe inflammatory response via nonredundant stimulation of ERK, JNK, and P38 MAPK and provides a mouse model of hemolytic uremic syndrome. **Am J Pathol.**, v. 166, n. 1, p. 323–339, 2005.

KORCHEVA, V.; WONG, J.; LINDAUER, M.; JACOBY, D. B.; IORDANOV, M. S.; MAGUN, B. Role of apoptotic signaling pathways in regulation of inflammatory responses to ricin in primary murine macrophages. **Mol Immunol.**, v. 44, p. 2761–2771, 2007.

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.

LAURIE, S.M.; ROBBINS, A.R.J. A toxin-resistant mouse L-cell mutant defective in protein transport along the secretory pathway. **Cell Physiol.**, v. 147, p. 215-223, 1991.

LICASTRO, F., MORINI, M.C, BOLOGNESI, A., STIRPE, F. Ricin induces the production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human peripheral-blood mononuclear cells. **Biochem. J.**, v. 294, p. 517–520, 1993.

LIN, J.Y.; LEE, T.C.; HU, S.; TUNG, T.C. Isolation of four isotoxic proteins and one agglutinin from jequiriti bean (*Abrus precatorius*). **Toxicon**, v. 19, p. 41-51, 1981.

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

LINDNER, D.J.; BORDEN, E.C. Synergistic antitumor effects of a combination of interferon and tamoxifen on estrogen receptor-positive and –negative human tumor cell lines *in vivo* and *in vitro*, 1997.

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.

LING, J.; LI, X. D.; WU, X.; LIU, W. Y. Topological requirements for recognition and cleavage of DNA by ribosome-inactivating proteins. **Biol. Chem. Hoppe Seyler.**, v. 376, p. 637–641, 1995.

LIU, Z.G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. **Cell Res.**, v. 15, p. 24-27, 2005.

LOPES, F.C.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I.Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biol Pharm Bull.**, v. 28, n. 9, p. 1726-1730, 2005.

LÓPEZ-FARRÉ, A.; RODRÍGUEZ-FEO, J. A.; SÁNCHEZ DE MIGUEL, L.; RICO, L.; CASADO, S. Role of nitric oxide in the control of apoptosis in the microvasculature. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 30, n. 10, p. 1095-1106, 1998.

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

LUKACS, N. W.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Cytokines in acute inflammation. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 1993, p. 26, 1993.

LUM, H.K.; BUTT, Y.KC.; LO, S.C.L. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*phaseolus aureus*). **Nitric Oxide**, v.6, p.205-213, 2002.

LUSTER, M.I.; GERMOLÉC, D.R.; YOSHIDA, T.; KAYAMA, F.; THOMPSON, M. Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. **Hepatology**, v. 19, p. 480-488, 1994.

MANUAL MERCK DE INFORMAÇÃO MÉDICA – SAÚDE PARA A FAMÍLIA. Seção 15, Capítulo 166. Disponível em: <http://www.msd-brazil.com/msdbrazil/patients/manual_Merck/sumario.html>. Acessado em: 09 abril 2008.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12231–12234, 1993.

MARTIN, S. The proteins of the seeds of *Abrus precatorius*. **Proc. R. Soc.**, v. 42, p. 3331–3333, 1887.

MASUHO, Y.; KISHIDA, K.; SAITO, M.; UMEMOTO, N.; HARA, T. Importance of the antigen-binding valency and the nature of the cross-linking bond in ricin A-chain conjugates with antibody. **J. Biochem.**, v. 91, p. 1583-1591, 1982.

MATZARAKI, V.; ALEXANDRAKI, K. I.; VENETSANO, K.; PIPERI, C.; MYRIANTHEFS, P.; MALAMOS, N.; GIANNAKAKIS, T.; KARATZAS, S.; DIAMANTIKANDARAKIS, E.; BALTOPOULOS, G. Evaluation of serum procalcitonin and interleukin-6 levels as markers of liver metastasis. **Clin Biochem**, v. 40, p. 336–342, 2007.

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.

MELBY, E. L.; JACOBSEN, J.; OLSNES, S.; SANDVIG, K. Entry of Protein Toxins in Polarized Epithelial Cells. **Cancer Res.**, v. 5, p. 1755-1760, 1993.

MIZEL, S.B. Interleukin 1 and T cell activation. **Immunol Rev.**, v. 63, p. 51-72, 1982.

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.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.K. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, v. 248, p. 1230, 1988.

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

MORIWAKI, S.; OHBA, H.; NAKAMURA, O.; SALLAY, I.; SUZUKI, M.; TSUBOUCHI, H.; YAMASAKI, N.; ITOH, K. Biological Activities of the Lectin, Abrin-a, Against Human Lymphocytes and Cultured Leukemic Cell Lines. **J Hematother Stem Cell Res.**, v. 9, n. 1, p. 47-53, 2000.

MORLON-GUYOT, J.; HELMY, M.; LOMBARD-FRASCA, S.; PIGNOL, D.; PIÉRONI, G.; BEAUMELLE, B. Identification of the Ricin Lipase Site and Implication in Cytotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 19, p. 17006–17011, 2003.

MOSINGER, M. Sur les reactions neuroendocriniennes et genitales dans l'intoxication par ricine. **Cont. Rend. Soc. Biol.**, vol 145, p. 412-415, 1951.

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.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Adv. Immunol.**, v. 46, p. 111–147, 1989.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol**, v. 73, p. 209-212, 2003.

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.

MUKHOPADHYAY, S.; GEORGE, A.; BAL, V.; RAVINDRAN, B.; RATH, S. Bruton's tyrosine kinase deficiency in macrophages inhibits nitric oxide generation leading to enhancement of IL-12 induction. **J. Immunol.**, v. 163, p. 1786–1792, 1999.

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.

MYTAR, B.; SIEDLAR, M.; WOLOSZYN, M.; RUGGIERO, I.; PRYJMA, J.; ZEMBALA, M. Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. **Br. J. Cancer**, v. 79, p. 737–743, 1999.

NAKAE, S.; ASANO, M.; HORAI, R.; IWAKURA, Y. Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. **Immunology**, v. 104, p. 402-409, 2001.

NAKAMOTO, T.; INAGAWA, H.; TAKAGI, K.; SOMA, G. A new method of antitumor therapy with a high dose of TNF perfusion for unresectable liver tumors. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 4087–4096, 2000.

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.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v. 6, p. 3051–3064, 1992.

NG, T.B.; CHAN, W.Y.; YEUNG, H.W. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitaceae plants. **Gen. Pharmac.**, v. 23, p. 575, 1992.

NG, T. B.; WANG, H. X. Flammin and velin: new ribosome inactivating polypeptides from the mushroom *Flammulina velutipes*. **Peptides**, v. 25, n. 6, p. 929-933, 2004.

NICOLAS, E., BEGGS, J. M., HALTIWANGER, B. M., AND TARASCHI, T. F. A new class of DNA glycosylase/apurinic/aprimidinic lyases that act on specific adenines in single-stranded DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 17216–17220, 1998.

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

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.

OH, I.; OZAKI, K.; SATO, K.; MEGURO, A.; TATARA, R.; HATANAKA, K.; NAGAI, T.; MUROI, K.; OZAWA, K. Interferon- γ and NF- κ B mediate nitric oxide production by

mesenchymal stromal cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 355, p. 956–962, 2007.

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.

OLIVEIRA, R. B. **Plantas tóxicas.** Disponível em: <http://br.geocities.com/plantastoxicas/mamona.html>. Acessado em: 25 fevereiro 2007.

OLSNES, S.; PIHL, A. Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis: evidence for different biological functions of its constituents – peptide chains. **Eur. J. Biochem.**, v. 35, p. 179–185, 1973.

OLSNES, S.; PIHL, A., Abrin, ricin and their associated agglutinins. In: CUATRECASAS, P. (Ed) The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins receptors and recognition. London: Chapman and Hall, 1976. P. 131-173. (Series B).

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.; SANDVIG, K.; PETERSEN, O.W.; VAN DEURS, B. Immunotoxins-entry into cells and mechanisms of action. **Immunol. Today**, vol 10, p. 291-295, 1989.

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

OPPENHEIM, J. J.; ZACHARIAE, C. O. C.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Properties of the novel proinflammatory “intercrine” cytokine family. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 617, 1991.

OPPENHEIM, J. J.; RUSCETTI, F. W.; FALTYNEK, C. R. Cytokines. In: STITES, D. P.; STOBO, J. D.; WELLS, J. V. **Basic Clin immunol.** 8. ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1994. cap. 9, p. 105-123.

OSWALD, I.P.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A.; JAMES, S.L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. **J. Immunol.**, v. 148, p. 3578, 1992.

OZOLS, R. F.; BUNDY, B. N.; GREER, B. E.; FOWLER, J. M.; CLARKE-PEARSON, D.; BURGER, R. A.; MANNEL, R. S.; DEGEEST, K.; HARTENBACH, E. M.; BAERGEN, R. Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel Compared With Cisplatin and Paclitaxel in Patients With Optimally Resected Stage III Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. **J Clin Oncol.**, v. 21, n. 17, p. 3194-3200, 2003.

PANANI, A.D.; ROUSSOS, C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. **Cancer Lett.**, v. 239, p. 1-9, 2006.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **Int J Cancer.**, v. 94, n. 2, p. 153-156, 2001.

PARRY, S.L.; SEBBAG, M.; FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M. Contact with T Cells Modulates Monocyte IL-10 Production: Role of T Cell Membrane TNF- α . **J Immunol**, v. 158, p. 3673-3681, 1997.

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.

PICCART, M. J.; CARDOSO, F. Progress in systemic therapy for breast cancer: an overview and perspectives. **EJC Supplements**, v. 1, n. 2, p. 56-69, 2003.

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.

POLYAK, K. Pregnancy and breast cancer: the other side of the coin. **Cancer Cell.**, p. 151-152, 2006.

POZZI, L.A.; MACIASZEK, J.W.; ROCK, K.L. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. **J. Immunol.**, v. 175, p. 2071–2081, 2005.

PREYNAT-SEAUVE, O.; SCHULER, P.; CONTASSOT, E.; BEERMANN, F.; HUARD, B.; FRENCH, L.E. Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection. **J. Immunol.**, v. 176, p. 61–67, 2006.

QU, X.; QING, L. Abrin induces HeLa cell apoptosis by Cytochrome *c* release and caspase activation. **J. Bioch. Molec. Biol.**, v. 37, n. 4, p. 445-453, 2004.

RALPH, P.; NAKOINZ, I.; SAMPSON JOHANNES, A.; FONG, S.; LOWE, D.; MIN, H.Y.; LIN, L. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, v. 148, p. 808, 1992.

RAMOS, M.V.; MOTA, D.M.; TEIXEIRA, C.R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R.A. Isolation and parcial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 477-484, 1998.

RAPAK, A.; FALNES, P. O.; OLSNES, S. Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, p. 3783–3788, 1997.

REDDY, V.V.; SIRSI, M. Effect of *Abrus precatorius* L. on experimental tumors. **Cancer Res.**, v. 29, p. 1447-1451, 1969.

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

RHEE, S.G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Exp. Mol. Med.**, v. 31, p. 53–59, 1999.

ROBERTUS, J.D.; MONZINGO, A.F. The structure of ribosome inactivating proteins. **Medicine Chem.**, v.4, p. 477-486, 2004.

ROFF, C.F.; HALL, C.W.; ROBBINS, A.R. Recovery of Function in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants with Temperature-Sensitive Defects in Vacuolar Acidification. **J. Cell. Biol.**, v. 110, p. 1023-1032, 1990.

RONCAROLO, M.G.; LEVINGS, M.K. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 6, p. 676-683, 2000.

RONCUZZI, L.; GASPERI-CAMPANI, A. DNA-nuclease activity of the single-chain ribosome-inactivating proteins dianthin 30, saporin 6 and gelonin. **FEBS Lett.**, v. 392, p. 16–20, 1996.

ROWINSKY, E. K., DONEHOWER, R. C., JONES, R. J.; TUCKER, R. W. Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol. **Cancer Res.**, v. 48, p. 4093-4100, 1988.

RUBIN, P.; JOHNSTON, C.J.; WILLIAMS, J.P.; McDONALD, S.; FINKELSTEIN, J.N. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 33, p. 99-109, 1995.

RUTENBER, E.; READY, M.; ROBERTUS, J.D. Structure and evolution of ricin B chain. **Nature**, v. 326, p. 624-626, 1987.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late

phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, p. 829-838, 1996.

SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Toxin-induced cell lysis: protection by 3-methyladenine and cycloheximide. **Exp. Cell Res.**, v. 200, p. 253–262, 1992.

SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. **Physiol. Rev.**, v. 76, p. 949–966, 1996.

SANDVIG, K.; GRIMMER, S.; LAUVRAK, S.U.; TORGERSEN, M.L.; SKRETTING, G.; VAN DEURS, B.; IVERSEN, T.G. Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. **Histochem. Cell Biol.**, v. 117, p. 131-141, 2002.

SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V.; ADAM, A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 191, n. 2, p. 503-508, 1993.

SCHELLER, J.; OHNESORGE, N.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. **Scand J Immunol.**, v. 63, p. 321–329, 2006.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. **Nature**, v. 277, p. 665 – 667, 1979.

SCHIFF, P. B.; HORWITZ, S. B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 1561-1565, 1980.

SCHNITT, S.J.; SILEN, W.; SADOWSKY, N.L.; CONNOLLY, J.L.; HARRIS, J.R. Ductal carcinoma in situ (intraductal carcinoma) of the breast. **N Engl J Med**, v. 318, p. 898-903, 1988.

SCHREIBER, G.; TSYKIN, A.; ALDRED, A.R.; THOMAS, T.; FUNG, W.P.; DICKSON, P.W.; COLE, T.; BIRCH, H.; DE JONG F.A.; MILLAND, J. The acute phase response in the rodent. **Ann N Y Acad Sci**, v. 557, p. 61–85, 1989.

SCOTT, P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. **Science**, v. 260, p. 496–497, 1993.

SHANKARAN, V.; IKEDA, H.; BRUCE, A.T.; WHITE, J.M.; SWANSON, P.E.; OLD, L.J.; SCHREIBER, RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1107–1111, 2001.

SILVA, A.L.C.; GOTO, L.S.; DINARTE, A.R.; HANSEN, D.; MOREIRA, R.A.; BELTRAMINI, L.M.; ARAÚJO, A.P.U. Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus*: cloning, heterologous expression of A-chain and structural studies. **FEBS J.**, v. 272, p. 1201–1210, 2005.

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.

SPREAFICO, F.; MALFIORE, C.; MORAS, M.L.; MARMONTI, L.; FILIPPESCHI, S.; BARBIERI, L.; PEROCCO, P.; STIRPE, F. The immunomodulatory activity of the plant proteins *Momordica charantia* inhibitor and pokeweed antiviral protein. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 5, p. 335–344, 1983.

SPRINGER, T. A.; DUSTIN, M. L.; KISHIMOTO, T. K.; MARTIN, S. D. The lymphocyte function-associated LFA-I, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 223, 1987.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, p. 425, 1990.

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.; BARBIERI, L. Ribosome-inactivating proteins up do date. **FEBS Lett**, v. 195, n. 1-2, p. 1-8, 1986.

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

STUEHR, D.J.; NATHAN, C.F. Nitric oxide, a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 1543–1555, 1989.

TAGA, K.; TOSATO, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. **J. Immunol.**, v. 148, p. 1143, 1992.

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.

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H.-H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 901–944, 2005.

THORPE, S.C.; MURDOCH, R.D.; KEMENY, D.M. The effect of castor bean toxin, ricin, on rat IgE and IgG responses. **Immunology**, v. 68, p. 307–311, 1989.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. **Blood**, v. 84, p. 4008–4027, 1994.

TRIPATHI, S.; MAITI, T. K. Stimulation of murine macrophages by native and heat-denatured lectin from *Abrus precatorius*. **Int Immunopharmacol**, v. 3, n. 3, p. 375-381, 2003.

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.

URBAN, J.L.; SHEPARD, H.M.; ROTHSTEIN, J.L.; SUGARMAN, B.J.; SCHREIBER, H. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 5233–5237, 1986.

URTREGER, A.J.; LADEDA, V.E.; PURICELLI, L.; RIVELLI, A.; VIDAL, M.; DEL, C.; SACERDOTE DE LUSTIG, E.; BAL DE KIER JOFFÉ, E. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. **Int. J. Oncol.**, v.11, p. 489-496, 1997.

URTREGER, A.J.; DIAMENT, M.J.; RANUNCOLO, S.M.; DEL C VIDAL, M.; PURICELLI, L.I.; KLEIN, S.M.; DE KIER JOFFE, E.D. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. **Int. J. Oncol.**, v. 18, n. 3, p. 639-647, 2001.

VAN DEURS, B.; SANDVIG, K.; PETERSEN, O.W.; OLSNES, S.; SIMONS, K.; GRIFFITHS, G. Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. **J. Cell Biol.**, v. 106, p. 253–267, 1988.

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. **Immunobiol**, v. 211, p. 487-501, 2006.

WIKIPEDIA: The free encyclopedia. **Cancer**. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer>>. Acesso em: 09 abril 2008.

WOLF, S.F.; TEMPLE, P.A.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; DICIG, M.; LOWE, L.; DZIALO, K.; FITZ, L.; FERENZ, C.; HEWICK, K.M. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3074, 1991.

WORKMAN, P.; KAYE, S.B. Translating basic cancer research into new cancer therapeutics. **Trends Mol. Med.**, v. 8, S1–S9, 2002.

XU, S.; KOSKI, G.; FARIES, M.; BEDROSIAN, I.; MICK R.; MAEURER, M.; CHEEVER, M.A.; COHEN, P.A.; CZERNIECKI, B.J. Rapid high efficiency sensitization of CD8+ T cells to tumor antigens by dendritic cells leads to enhanced functional avidity and direct tumor recognition through an IL-12-dependent mechanism. **J Immunol.**, v. 171, n. 5, p. 2251-2261, 2003.

YOSHIKAWA, A.; SAITO, Y.; MARUYAMA, K. Lignan compounds and 4,4'-dihydroxybiphenyl protect C2C12 cells against damage from oxidative stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 344, p. 394–399, 2006.

YOUNG, H. A.; HARDY, K. J. Interferon- γ : producer cells, activation stimuli, and molecular regulation. **Pharmac. Ther.**, v. 45, p. 137, 1990.

Capítulo 2

----- Mensagem Original -----

Assunto: Submission Confirmation

De: "International Immunopharmacology" jtalmadg.ImmPharm@atlarge.net

Data: Sex, Junho 20, 2008 6:03 pm

Para: carlosiz@fcfar.unesp.br

Dear Dr Iracilda Zeppone Carlos,

Your submission entitled "A mixed Th1/Th2 response to abrin, ricin and pulchellin: correlation with anti-inflammatory and anti-tumoral activity" has been received by International Immunopharmacology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/intimp/>.

Your username is: carlosiz

Your password is: zepponecar8333

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System International Immunopharmacology

A mixed Th1/Th2 response to abrin, ricin and pulchellin: correlation with anti-inflammatory and anti-tumoral activity

Djamile C. de Matos^a, Priscila V. Castilho^b, Ana Cristina de O. M. Moreira^c, Ana Paula U. Araújo^b, André L. C. Silva^d, Lucas L. Colombo^e, Iracilda Z. Carlos^{a*}

^aDepartamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Universidade Estadual Paulista: Rua Expedicionários do Brasil, 1601, CEP 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brasil

^bInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil

^cUniversidade de Fortaleza, Centro de Ciências da Saúde, Fortaleza, Ceará, Brasil

^dDepartamento de Bioquímica e biologia molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

^eÁrea de pesquisa, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Oncologia “Angel H. Roffo”, Universidade de Buenos Aires, Argentina

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: carlosiz@fcfar.unesp.br

Abstract

Abrin, ricin and pulchellin are type-2-ribosome-inactivating proteins, obtained from seed of *Abrus precatorius*, *Ricinus communis* and *Abrus pulchellus tenuiflorus*. In this study, we determined the mixed Th1/Th2-immune response stimulated by them and their anti-tumoral activity against breast and lung tumoral lineage (LM3 and LP07, respectively). Abrin, ricin and pulchellin presented a high inhibition of H₂O₂ production in murine PEC, and stimulated the production of Th1 and Th2 cytokines, like IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-12 and IL-10. The proteins were more toxic to LM3 and LP07 cells than Taxol, an anti-neoplastic drug currently used in breast and lung cancer treatment.

Keywords: abrin, ricin, pulchellin, cytokines, hydrogen peroxide, tumoral cells

1. Introduction

In 2005, cancer was responsible for 13% of all the deaths in the world. The main cancer types with higher mortality rate were lung, stomach, liver, colon and breast. In Brazil, the estimative for 2008 indicates that, exceptionally for the no-melanoma skin cancer type, the most incident cases will be prostate and lung cancer in men and colon and uterus cancer in women, following the same profile of the magnitude seen in the world [1].

Abrin, ricin and pulchellin are proteins obtained from seeds of *Abrus precatorius*, *Ricinus communis* and *Abrus pulchellus tenuiflorus*, respectively. They are members of type-2-ribosome-inactivating proteins (RIPs), which are composed by two polypeptide chains, an enzymatic-A chain that has N-glycosidase activity, and a lectinic-B chain, specific galactose, capable of binding to cells [2,3,4]. Published data about pulchellin activity in immune system are inexistent. The ability of abrin and ricin

to kill several murine and human cell lines, like Sarcoma 180, Ehrlich ascites cells have been related [5,6].

Ricin is able to stimulate human peripheral-blood mononuclear cells to produce IL-1 β and TNF- α [7], cytokines responsible to mediate cellular immune response (Th1). All RIPs and ricin [8] are strongly immunogenic, and their administration to animals induces antibodies production, with cross-reaction only among RIPs from plants belonging to the same family [9]. RIPs are also very allergenic and ricin induces IgE response after its administration [10]. The production of immunoglobulin, including IgE, associated with antibody and allergic responses can occur by stimulating Th2 profile with IL4, IL-5, IL-6 and IL-10 production [11].

It is known that the RIPs' cytotoxic effect is not only due to their N-glycosidase activity, their stimulation of cytokine production is also important. In this work, we determined their stimulation of IL-1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ and IL-10 production and their cytotoxicity to murine breast and lung adenocarcinoma cells.

2. Material and methods

2.1. Isolation of the proteins

Pulchellin was isolated from the seeds of *Abrus pulchellus* as described [12]. Abrin and ricin were isolated from the seeds of *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*, respectively. Dehulled seeds of *A. precatorius* and *R. communis* were ground by a mixer and the fine flour obtained was suspended (1:10 w/v) in saline solution (0.9% NaCl) for 3 hours at 4°C and centrifuged at 12000 g for 20 minutes at 4°C. The supernatant was loaded onto an immobilized *Adenanthera pavonina* L. galactomannans column, previously equilibrated with the same solution. The

unbound material was eluted from the column with saline solution, whereas the absorbed proteins were obtained in a single peak elution with a solution 0.1M glycine. The fractions containing abrin or ricin were dialyzed with PBS solution pH 7.2. The samples were sterilized using 0.22µm-membrane and conditioned at -80°C to posterior utilization.

2.2. Animals

Six-week old male Swiss mice (6-8 weeks old, 18 to 25 g) were used. The animals were maintained in a polycarbonate box (at 23 ± 1 °C, $55 \pm 5\%$ humidity, 10-18 circulations/h and a 12-hour light/dark cycle), with water and food available *ad libitum*. The experiments were performed in accordance with the regulations of Research Ethics Committee (# 32/2006), Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, São Paulo, Brazil.

2.3. Peritoneal exsudate cells (PEC)

Thioglycollate-elicited peritoneal exsudate cells (PEC) were harvested from the Swiss mice by using 5.0 ml of sterile PBS, pH 7.4. The cells were washed twice by centrifugation at 200g for 5 minutes at 4°C and re-suspended in appropriate medium for each test.

2.4. PEC supernatant

The supernatants of PEC-culture were used in the TNF- α , IL-1 β e IL-12

determination. The cells were adjusted at 5×10^6 cells/mL in a RPMI-1640-C medium and 500 μ L were placed into each well of 48 microtitre plates (Corning, Inc., EUA). The plate was incubated for 1 hour at 37°C under 5% CO₂ (Forma Scientific). After that, the non-adherent cells were removed through washes with RPMI-1640-C medium. After that, 250 μ L of RPMI-1640-C medium and 250 μ L of abrin, ricin or pulchellin at 0.78 ng/mL were added to the adherent peritoneal cells. Cells incubated with lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma) at 10 μ g/mL or only with RPMI-1640-C medium were used as positive and negative controls, respectively. The plates were incubated for 24 hours at 37°C under 5% CO₂ (Forma Scientific). The supernatants were collected and centrifuged at a refrigerated centrifuge (Hettich, Germany) at 7800 xg for 10 minutes, aliquot and stored at -80°C until the moment of use.

2.5. Splenic cells

The spleens were aseptically collected and placed on a sterile Petri plate (Corning, Inc.) with 3.0 mL RPMI-1640 culture medium (Sigma). The cell suspension was obtained by tweezing the spleen and washing it three times with the RPMI-1640 described before. The cells were re-suspended in a concentration of 5×10^6 cells/mL of RPMI-1640 with 5% of fetal bovine serum, 100 U/mL of penicillin, 100 U/mL of streptomycin and 50mM of 1-mercaptoethanol.

2.6. Splenic cells supernatant

For the IFN- γ and IL-10 production, 500 μ L of the cellular suspension and 500 μ L of abrin, ricin or pulchellin at 0.78ng/mL were placed into each well of 48 microtitre plates (Corning, Inc., EUA). The present study used cells with Concanavalin A (ConA) at 0.5 μ g/mL or RPMI-1640-C medium as positive and negative controls, respectively. The plates were incubated for 24 hours at 37°C under 5% CO₂ (Forma Scientific). The supernatant was collected and centrifuged at a refrigerated centrifuge (Hettich, Germany) at 7800 xg for 10 minutes. The supernatants were aliquot and stored at -80°C for a later use.

2.7. Assessment of cellular viability

For the cellular viability assay, it was used the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test [13]. The cells were re-suspended in RPMI-1640 containing 5% of fetal bovine serum, 100 U/mL of penicillin, 100 U/mL of streptomycin and 50 mM of 1-mercaptoethanol in order to obtain an adjustment to the concentration of 5×10^6 cells/mL. It was added 100 μ L of the cellular suspension and 100 μ L of the abrin, ricin and pulchellin, in different concentrations in each well of the plate and incubated for 24 hours at 37°C under 5% of CO₂. The MTT was added (100 μ L) and the plate was incubated for 3 hours at 37°C under 5% of CO₂. The formazan formed was dissolved in acidic 2-propanol and the optical density was measured using a microplate reader (Multiskan, Labsystem) equipped with a 540nm filter and 620 nm reference filter. The optical density of dissolved formazan in the control (untreated cells) was taken as 100% of viability.

2.8. Hydrogen Peroxide (H₂O₂) inhibition

PEC cells were re-suspended at a concentration of 2×10^6 cells/ml in a solution of phenol red containing 140 mM NaCl, 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 5.5 mM dextrose, 0.56mM phenol red, and type II horseradish peroxidase, 0.01 mg/mL, (Sigma). Aliquots of 100 μ L were transferred to flat-bottomed 96-well culture plates (Corning). A 50 μ L volume of the abrin, ricin or pulchellin at 1.17 ng/ mL and 50 μ L of phorbol myristate acetate (PMA, Sigma) at 0.2 mM were added. PMA was used as positive control, and buffered phenol red, as negative control. The plates were incubated for one hour at 37 °C under 5% CO₂ and the reaction was stopped by the addition of 50 μ L of 4 N NaOH. Experiments were run in triplicate. Absorbance was determined with an automatic ELISA photometer using a 620 nm filter. The results were expressed as nanomols of H₂O₂ mL⁻¹ peritoneal cells, from a standard curve established in each test consisting of known molar concentrations of H₂O₂ in buffered phenol red [14, 15].

2.9. IL-1 β , IL-10, IL-12, TNF- α and IFN- γ measurement

The IL-1 β , IL-12, TNF- α cytokine released in the supernatant of PEC culture, IFN- and IL-10 in the supernatant of spleen cells were quantified by immunenzymatic assay (ELISA). The 96-well plates were coated overnight at 4°C with 100 μ L/well of a purified rat anti-mouse cytokine capture antibody (anti-IL-1 β , anti-IL-10, anti-IL-12, anti- TNF- α) (Kit BD OptEIA, San Diego, CA) in 0.1M sodium carbonate buffer, pH 9.5 (IL-1 β and IFN- γ) or 0.2M sodium phosphate buffer, pH 6.5 (IL-12, IL-10 and TNF- α). Plates were washed three times with 0.01M phosphate – buffered (pH 7.2) saline (PBS) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). Plates were blocked with 200

μL /well of 0.01M phosphate – buffered (pH 7.2) saline (PBS) containing 10% fetal bovine serum at room temperature for 60 minutes, and washed three times with PBS-T. 100 μL of standard murine cytokines (BD OptEIA) or samples (supernatant of PEC/lymphocytes culture) were added to appropriate wells. Plates were incubated at room temperature for 120 minutes, washed five times with PBS-T, and 100 μL of antibody biotinylated goat anti-mouse cytokine IL-1 β , IL-12, TNF- α , IFN- γ and IL-10 + Streptavidin-Horseradish peroxidase conjugate reagent (BD OptEIA) were added in each well. Plates were incubated at room temperature for 60 minutes, and washed seven times with PBS-T. Plates were then washed seven times with PBS-T and 100 μL of substrate tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent) were added to each well and the plates were incubated for 30 minutes in the dark. The reaction was stopped by adding 50 μL of 2 N H₂SO₄. Absorbance was read at 450nm by a microplate reader (Multiskan Ascent, Labsystems®), and cytokine concentrations were calculated by a curve of known concentrations of IL-1 β , IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-10 standards. Results were expressed in picograms/mL.

2.10. Anti-proliferative activity against LM3 and LP07

Cellular growth was quantified using MTT assay [13]. After trypsinization, the cells were washed and adjusted at a concentration of 5×10^4 cell/ml. 200 μL of the tumoral cell suspension were plated in each well of flat-bottomed 96-well culture plates (Corning), and incubated at 37°C under 5% CO₂. The microtiter plates containing cells were pre-incubated for 24 hours to allow stabilization prior to the addition of the samples. After this period, 200 μL of the abrin, ricin, pulchellin or Taxol (Sigma) in

different concentrations were added and incubated for 24 or 48 hours in the same conditions. After cultivation, the medium was replaced for fresh medium containing 1 mg/ml of MTT. After three hours, the medium was removed and 100 μ L of isopropilic alcohol (Mallinckrodt) was added to solubilize the formazan crystals formed. The absorbance was measured at 540nm with a reference filter of 620 nm on a spectrophotometer (Multiskan Ascent, Labsystems). The 50% inhibitory concentration for cell-growth (IC_{50}) values were expressed as the dose resulting in 50% reduction of tumoral cell growth and were calculated by linear regression using Microcal Origin 7.0.

2.11. Statistical Analysis

The results are expressed as means $\pm$ S.D. Each experiment was performed at least three times. One-way ANOVA with Tukey's post test was performed using GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, Graph-Pad Software, San Diego, California, U.S.A. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Assessment of cellular viability

In the cellular-viability test it was verified that abrin, ricin and pulchellin showed a high cytotoxicity to murine PEC after 24 hours of incubation. The 50% inhibitory concentration were 6.4 ± 1.53 ng/mL, 11.8 ± 1.66 ng/mL and 19.3 ± 4.0 ng/mL for abrin, ricin and pulchellin, respectively.

To perform the other tests the concentrations at 0.39 ng/mL (well concentration) were chosen, where it could be observed a good cellular viability >80% (data not presented), which made possible the occurrence of a satisfactory immune response.

3.2. H₂O₂ inhibition

Abrin, ricin and pulchellin incubated with PEC cells in the PMA's presence inhibited the hydrogen peroxide production after one hour of incubation, values varying from 71.09 ± 1.95 to 86.81 ± 2.80 (Table 1).

3.3. IL-1 β , IL-10, IL-12, TNF- α and IFN- γ measurement

The cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-12 (Figure 1), IFN- γ and IL-10 (Figure 2) were determined by ELISA. Abrin did not stimulate the TNF- α production, but it induced lightly IL-1 β and strongly IL-10, IL-12 and IFN- γ ($p < 0.001$); ricin showed ability to induce IL-1 β , IFN- γ , IL-12 ($p < 0.001$) and IL-10 ($p < 0.05$); and pulchellin was not able to induce the IL-1 β production and stimulated IFN- γ , TNF- α and IL-10 ($p < 0.001$).

3.4. Measurement of anti-proliferative activity against LM3 and LP07

It was observed that abrin, ricin and pulchellin, when incubated with LM3 and LP07 cells for 24 or 48 hours of incubation, were more cytotoxic than Taxol, a current anticancer drug obtained from *Taxus brevifolia* and utilized against breast and lung cancer. Abrin showed the highest toxicity followed by pulchellin and ricin. Their

citotoxicity was higher to LM3 than to LP07 with 24 hours of incubation, but it was similar to both cells lineage within 48 hours (Table 2 and 3).

4. Discussion

Macrophages have presented inflammatory functions within the innate response and they contribute to an adaptive response presenting the epitope-antigen to help T cells. The macrophages activities during cancer are predominantly unspecific and they induce citotoxicity to tumoral cells by suppressing T and NK cells response. These macrophages functions can be mediated, among other factors, by reactive nitrogen species, reactive oxygen species or TNF- α [16]. According to researchers, the PEC consists of 20-25% of macrophages, 1% of mast cells with the remainder being neutrophils [17]. Initially, it was determined the IC₅₀ by utilizing PEC at 24 hours of incubation. It was observed that PEC was sensible to the toxic potential of the proteins, abrin being the most toxic (IC₅₀ = 6.4 $\pm$ 1.53 ng/mL), followed by ricin (IC₅₀ = 11.8 $\pm$ 1.66 ng/mL), and by pulchellin (IC₅₀ = 19.3 $\pm$ 4.0 ng/mL). Due to their high citotoxicity, the concentration of 0.39 ng/mL (well concentration), which showed >80% viability, was chosen to perform the immunological tests.

Macrophages can be activated by LPS and IFN- γ stimulation. The major activated macrophage feature is enhancing its capacity of releasing pro-inflammatory and cytotoxic mediators like oxygen and nitrogen species, hydrolytic enzymes and cytokines, which can act at the antigens' destruction, although, their exceeded and uncontrolled production can destroy normal tissues [18]. In the present experiments, abrin, ricin and pulchellin were not able to induce H₂O₂ production, but they inhibit the H₂O₂ production stimulated by PMA, at a rate around 70% (Table 1). It is interesting

to note that a substance with H_2O_2 inhibitory capacity can show, among other things, a high anti-inflammatory potential, and consequently it contributes for the reduction of carcinogenesis sprouting. Similar results were observed in an earlier research in our laboratory using etil acetate fraction obtained from *Alchornea glandulosa* [19]. Different results observed in others studies showed that abrin induces apoptosis in JR4 Jurkat cells that can occur in the mitochondrial pathway. Moreover, they related that abrin induces ROS production, which is a mitochondrial membrane potential loss effect leading to apoptotic events [20].

Cytokines are endogenous peptide involved in immune response. The delicate equilibrium between cytokines and other inflammatory mediators seems to be the major factor that leads to a hyper-inflammation or hyper-immune-suppression, both being able to affect vital organs not involved in initial injury [21]. IL-1-release activates a pro-inflammatory cascade, including Th1 cells proliferation, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 and IL-12 production [22]. The $\text{TNF-}\alpha$ is responsible for several crucial events to initiate acute and chronic inflammatory events, like over-regulation of adhesion molecules expression [23, 24], induction of other cytokines of early response (IL-1 and IL-6) [25] and the activation of specific leucocytes chemiotatic cytokines [26].

It was showed that abrin and ricin induced significant IL-1 β production ($p < 0.001$), although pulchellin did not induce a significant production ($p > 0.05$). Considering $\text{TNF-}\alpha$ production, only pulchellin stimulated its production at 30.44pg/mL (Fig. 1). It was observed an induction of IL-1 β and $\text{TNF-}\alpha$ release by human mononuclear cells from peripheral blood when treated with abrin. The $\text{TNF-}\alpha$ release was dose-dependent. The maximum release of these cytokines occurred when cells were treated with abrin at 5.0pM. Besides, when used in higher concentrations, the release did not occur after 24 hours of incubation. The researchers suggested that these cytokines

released by macrophages stimulated and/or injured by abrin can contribute to the pathogenesis damage and other observed effects after abrin intoxication [7]. Ricin also stimulated TNF- α production in murine marrow bone macrophages (C57BL/6J) when these cells were treated with 10ng/mL of ricin, they released about 20 pg/mL of TNF- α [27].

The lymphocytes shared the activity of cytokine production with macrophages. T cells are frequently classified in 2 categories, type 1 (Th1) and type 2 (Th2). Th1 cells are the major producer of IFN- γ and IL-2; and Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10. The Th1 cells induce cellular immunity; and Th2 cytokines induce humoral immunity [28]. IFN- γ is a cytokine produced by T CD4⁺ (mainly Th1 subset), CD8⁺ cells and NK cells [29]. IFN- γ has several classical properties of macrophages activation [30]. It over-regulates the class II MHC antigen expression and enhances cytokine synthesis like TNF- α , IL-1 β and IL-6. The IFN- γ production seen in the present experiment was high, around 300pg/mL ($p < 0.001$), when cells were treated with the proteins (Fig. 1). The lymphocytes and IFN- γ contribute to host protection against sarcoma carcinogen-induced, spontaneous epithelial carcinoma development and tumoral cells selection with reduced immunogenicity [31].

IL-12 is an immune-regulatory cytokine that promotes cellular immunity. High levels of IL-12 produced by dendritic cells activate T CD4 cells to release Th1 cytokines [32]. In the present study, abrin and ricin stimulated a higher production of IL-12 by PEC than the one by LPS (Fig. 1), but pulchellin did not show a significant production ($p > 0.05$). IL-10, a Th2 cytokine, has powerful immunomodulatory activities, affecting several cellular types by different ways. In the present research, the proteins showed moderate to high level of stimulation of IL-10 (Fig. 2), which shows that the proteins can have anti-inflammatory activity. Researchers have demonstrated that IL-10

promotes the development of Th2 cytokines, and inhibits the development of Th1 cytokines in response to antigen [33]. Pulchellin 3 was related with the induction of significant neutrophil exudation to peritoneal cavity in a Swiss mouse after 6 hours of intra-peritoneal injection. Moreover, pulchellin was chemiotactic *in vitro* to human neutrophils [34]. The IL-10 is related as a powerful signal of leucocytes migration recruitment *in vivo* [35] and it is suggested that the stimulation of PEC migration caused by pulchellin 3 can be due to the stimulation of IL-10 production observed in the present experiments. Other fact that corroborates with IL-10 production is that ricin administration induces IgE response enhancing the response against other antigens concomitantly administered [10].

Abrin, ricin and pulchellin are very immunogenic so it is believed that they can be used like co-adjuvant contributing to enhance immune response against several antigens concomitantly administered. This reflects directly in current observations that efficient immunization englobates both Th1 and Th2 response [36, 37]. A mixed Th1 and Th2 response was observed in some researches with animals immunized with vaccines containing proteins obtained from bacteria like CRM197, a mutant diphtheria toxin [38], or from parasite like the protein obtained from *Leishmania donovani* [39]. The same pattern of immune response was observed here using abrin, ricin and pulchellin.

It is known that interactions between tumoral cell and its micro-environment can affect the tumoral growth and the metastasis development. The tumoral micro-environment can vary among tumoral types and the illness phase. Among the tumoral micro-environment components, the inflammatory cells and the cytokines play a key-role in breast cancer [40].

It must be taken in account that the over-expression proteins in tumoral cells could be acting as antigens leading to a humoral immune response in the tumor host [41]. Based on this discovery, researchers are developing a new treatment against cancer, called immunotoxins, which toxic molecules are linked to antibodies against specific tumoral antigens. The antibodies act directing the toxins to tumoral cells, excluding health cells of their toxic effects. Some immunotoxins have been produced with type 1 and 2 RIPs [42]. However, the type 2 RIPs cannot be used without treatment, blocking their sites of lectin linking, to force the immunotoxins not to attack health cells possessing carbohydrates at their surfaces. Other option was to use only enzymatic chain of type 2 RIPs, which shows more promissory results [42].

By MTT assay, it is determined the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of the abrin, ricin and pulchellin in murine breast adenocarcinoma cells (LM3) and lung adenocarcinoma cells (LP07) after 24 or 48 hours of incubation (Table 2 and 3). Its results were compared with the obtained Taxol results, which is a currently anti-neoplastic drug against breast and lung cancer [43, 44]. It was observed that the RIPs showed higher cytotoxicity than Taxol in 24 and 48 hours of incubation to both cell-lines. Abrin and ricin were more toxic with the enhancement of time of incubation for LM3 cells. The RIPs were more toxic to LM3 cells than LP07 cells after 24 hours of incubation; however the toxicity to LP07 cells and LM3 cells were similar after 48 hours of incubation.

With these results it can be concluded that abrin, ricin and pulchellin can present anti-tumoral activity against murine breast and lung cancer, with a more powerful response than Taxol's. Although they produce different cytokines, a mixed Th1/Th2 immune response is activated, which may contribute to their antitumoral and anti-inflammatory activity.

Acknowledgements

The authors are grateful to Marisa Campos Polesi Placeres, the technician of the Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas of UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil and to CAPES by the financial support.

References

- [1] Instituto Nacional de câncer. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Access in November 12th 2008.
- [2] Olsnes S, Pihl A. Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis: evidence for different biological functions of its constituents – peptide chains. *Eur. J. Biochem.* 1973; 35: 179–185.
- [3] Olsnes S, Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry* 1973; 12: 3121–3126.
- [4] Silva ALC, Horta ACG, Moreira RA, Beltramini LM, Araújo APU. Production of *Abrus pulchellus* ribosome-inactivating protein from seeds callus culture. *Toxicon* 2003; 41: 841–849.
- [5] Fodstad O, Olsnes S, Pihl A. Inhibitory Effect of Abrin and Ricin on the Growth of Transplantable Murine Tumors and of Abrin on Human Cancers in Nude Mice. *Cancer Res* 1977; 37: 4559-4567.
- [6] Lin JY, Lee TC, Hu S, Tung TC. Inhibitory effects of four isoabrin on the growth of Sarcoma 180 cells. *Cancer Res.* 1982; 42: 276-279.

- [7]Licastro F, Morini MC, Bolognesi A, Stirpe F. Ricin induces the production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human peripheral-blood mononuclear cells. *Biochem. J.* 1993; 294: 517–520.
- [8]Thorpe SC, Kemeny DM, Panzani R, Lessof MH. Allergy to castor bean. I. Its relationship to sensitization to common inhalant allergens (atopy). *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 82: 62–66.
- [9]Strocchi P, Barbieri L, Stirpe F. Immunological properties of ribosome-inactivating proteins and of a saporin-IgG conjugate. *J. Immunol. Methods* 1992; 155: 57–63.
- [10]Thorpe SC, Murdoch RD, Kemeny DM. The effect of castor bean toxin, ricin, on rat IgE and IgG responses. *Immunology* 1989; 68: 307–311.
- [11]Coffman RL, Mocci S, Garra AO. The stability and reversibility of Th1 and Th2 populations. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999; 238: 1–12.
- [12]Castilho PV, Goto LS, Roberts LM, Araújo APU. Isolation and characterization of four type 2 ribosome inactivating pulchellin isoforms from *Abrus pulchellus* seeds. *FEBS Journal* 2008; 275: 948–959.
- [13]Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65: 55-63.
- [14]Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods.* 1980; 38: 161-170.
- [15]Pick E, Mizel DJ. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods.* 1981; 46: 211-226.
- [16]Alleva DC, Burger CJ, Elger KD. Tumor-Induced Regulation of Suppressor Macrophage Nitric Oxide and TNF- α Production: Role of Tumor-Derived IL-10, TGF- β , and Prostaglandin E₂. *J Immunol* 1994; 153: 1674-86.

- [17]Remer KA, Brcic M, Jungi TW. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunology Letters* 2003; 85(1): 75-80.
- [18]Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43(2): 109-142.
- [19]Lopes FC, Calvo TR, Vilegas W, Carlos IZ. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28, n. 9: 1726-30.
- [20]Narayanan S, Surolia A, Karande AA. Ribosome-inactivating protein and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells. *Biochem. J.* 2004; 377: 233–240.
- [21]Delong WG, Born CT. Cytokines in patients with polytrauma. *Clin. Orthop.* 2004; 422: 57–65.
- [22]Dinarello CA. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 941–8.
- [23]Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Martin SD. The lymphocyte function-associated LFA-I, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 1987; 5: 223.
- [24]Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425.
- [25]Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines in acute inflammation. *Curr. Opin. Hematol.* 1993; 1993: 26.
- [26]Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory “intercrine” cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* 1991; 9: 617.

- [27]Korcheva V, Wong J, Lindauer M, Jacoby DB, Iordanov MS, Magun B. Role of apoptotic signaling pathways in regulation of inflammatory responses to ricin in primary murine macrophages. *Mol Immunol* 2007; 44: 2761–2771.
- [28]Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136 (7): 2348-2357.
- [29]Young HA, Hardy KJ. Interferon- γ : producer cells, activation stimuli, and molecular regulation. *Pharmac. Ther.* 1990; 45: 137.
- [30]Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11: 571.
- [31]Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410(6832): 1107-11.
- [32]Xu S, Koski G, Faries M, Bedrosian I, Mick R, Maeurer M, et al. Rapid high efficiency sensitization of CD8⁺ T cells to tumor antigens by dendritic cells leads to enhanced functional avidity and direct tumor recognition through an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003; 171(5): 2251-61.
- [33]Laouini D, Alenius H, Bryce P, Oettgen H, Tsitsikov E, Geha RS. IL-10 is critical for Th2 responses in a murine model of allergic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 2003; 112:1058–1066.
- [34]Mota DM. **Pulchelinas, lectinas galactose-específicas, de sementes de *Abrus pulchellus*:** purificação e estudos de propriedades químicas e biológicas. 1997. 120f. Thesis (Master in Biochemistry) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.

- [35]Parry SL, Sebbag M, Feldmann M, Brennan FM. Contact with T Cells Modulates Monocyte IL-10 Production: Role of T Cell Membrane TNF- α . J Immunol 1997; 158: 3673-3681.
- [36]Evans TG, Fitzgerald T, Gibbons DC, Keefer MC. Th1/Th2 cytokine responses following HIV-1 immunization in seronegative volunteers. Clin Exp Immunol 1998; 111: 243-250.
- [37]Basu R, Bhaumik S, Basu JM, Naskar K, De T, Roy S. Kinetoplastid Membrane Protein-11 DNA Vaccination Induces Complete Protection against Both Pentavalent Antimonial-Sensitive and -Resistant Strains of *Leishmania donovani* That Correlates with Inducible Nitric Oxide Synthase Activity and IL-4 Generation: Evidence for Mixed Th1- and Th2-Like Responses in Visceral Leishmaniasis. J Immunol 2005; 174: 7160-7171.
- [38]Kamboj KK, King CL, Greenspan NS, Kirchner HL, Schreiber JR. Immunization with *Haemophilus influenzae* Type b–CRM197 Conjugate Vaccine Elicits a Mixed Th1 and Th2 CD4⁺ T Cell Cytokine Response That Correlates with the Isotype of Antipolysaccharide Antibody. J Infect Dis 2001; 184: 931–5.
- [39]Mazumdar T, Anam K, Ali N. A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of *Leishmania* vaccine instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. Vaccine 2004; 22: 1162–1171.
- [40]Ben-Baruch A. Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions. Breast Cancer Res. 2003; 5 (1): 31–36.

- [41]Fiszman G, Cattaneo V, De La Torre E, Colombo L, Middonno C, Sacerdote de Lustig E, et al. Autoanticuerpos contra receptores muscarínicos en cáncer de mama. *Revista Química Viva* 2005; 3(4): 101-117.
- [42]Fracasso G, Bellisola G, Castelletti D, Tridente G, Colombatti M. Immunotoxins and Other Conjugates: Preparation and General Characteristics. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4: 545-562.
- [43]Davies AM, Lara Jr PN, Mack PC, Gandara DR. Docetaxel in non-small cell lung cancer: a review. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4(4): 553-565.
- [44]Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, Mannel RS, Degeest K, Hartenbach EM, Baergen R. Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel Compared With Cisplatin and Paclitaxel in Patients With Optimally Resected Stage III Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21(17): 3194-3200.

Table 1 – H₂O₂ production inhibition of proteins in peritoneal cells percentage

<i>Inibition (%)</i>			
	Abrina (ng/mL)	Ricina (ng/mL)	Pulchelina (ng/mL)
	0.39	0.39	0.39
H ₂ O ₂	76.04 ± 1.09	71.09 ± 1.95	86.81 ± 2.80

Table 2 – IC₅₀ values of substances of LM3 and LP07 cells after 24 hours of incubation

IC ₅₀ (ng/mL)	LM3	LP07
Abrina	81.54 ± 2.56	175.2 ± 2.60
Ricina	822 ± 1.45	1084.9 ± 2.75
Pulchelina	74.98 ± 2.69	1127.0 ± 2.41
Taxol [®]	193.89x10 ³ ± 1.36	134.0x10 ³ ± 1.15

Table 3 – IC₅₀ values of substances of LM3 and LP07 cells after 48 hours of incubation

IC ₅₀ (ng/mL)	LM3	LP07
Abrin	42.8 ± 6.36	37.44 ± 5.52
Ricin	590.3 ± 2.26	609.2 ± 4.0
Pulchellin	91.94 ± 4.58	80.11 ± 5.76
Taxol [®]	12.65x10 ³ ± 2.7	85.84x10 ³ ± 1.99

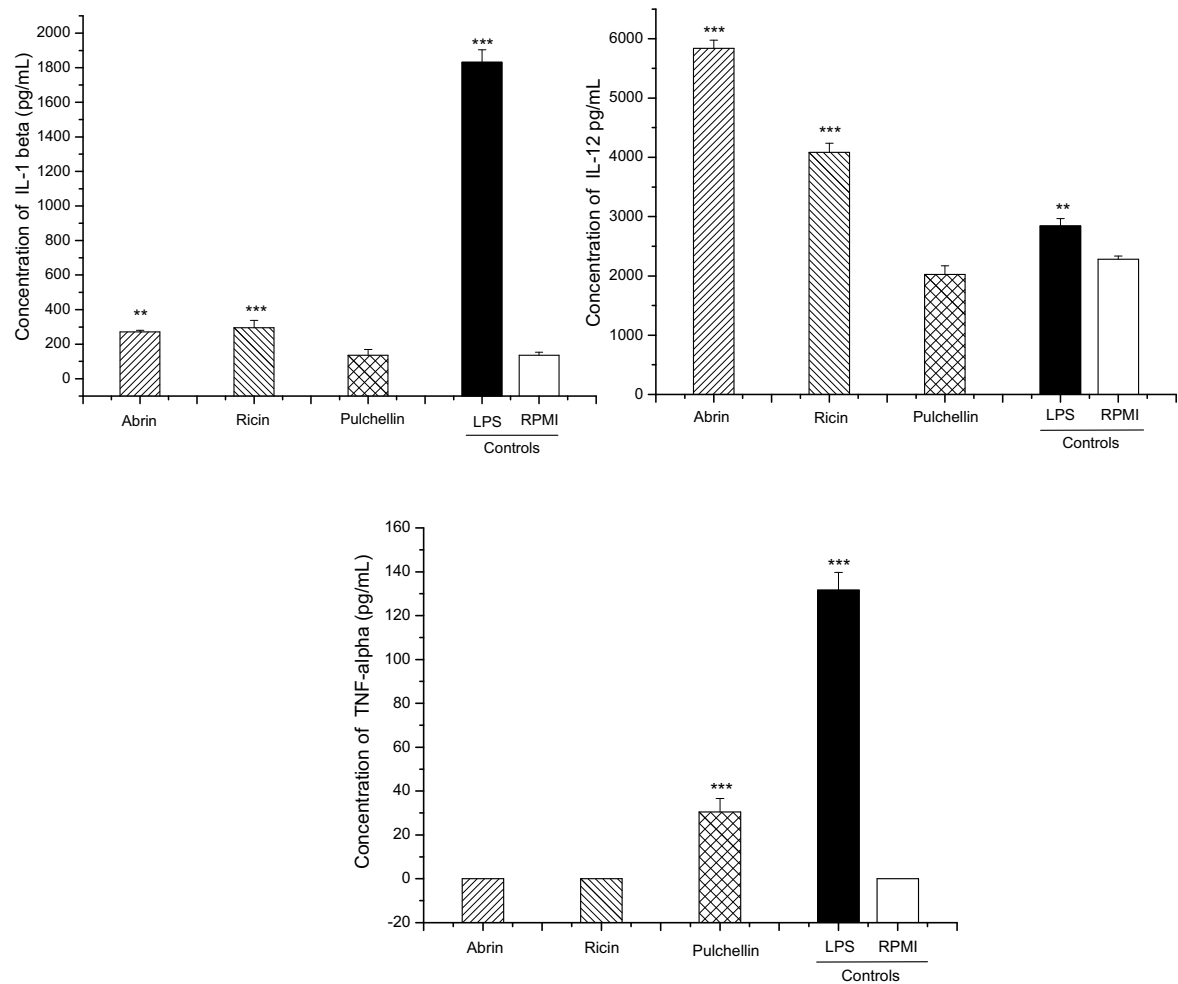


Figure 1 Proteins effects on TNF- α , IL-12 and IL-1 β synthesis in peritoneal cells. For the cytokine immunoassay, adherent cells ($5 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated for 24 hours with abrin, ricin or pulchellin at 0.39 ng/mL (well concentration). Cells incubated just with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were used as a positive control and cell in culture medium (RPMI-1640) as a negative control. One-way ANOVA with Turkey test was performed. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs. negative control.

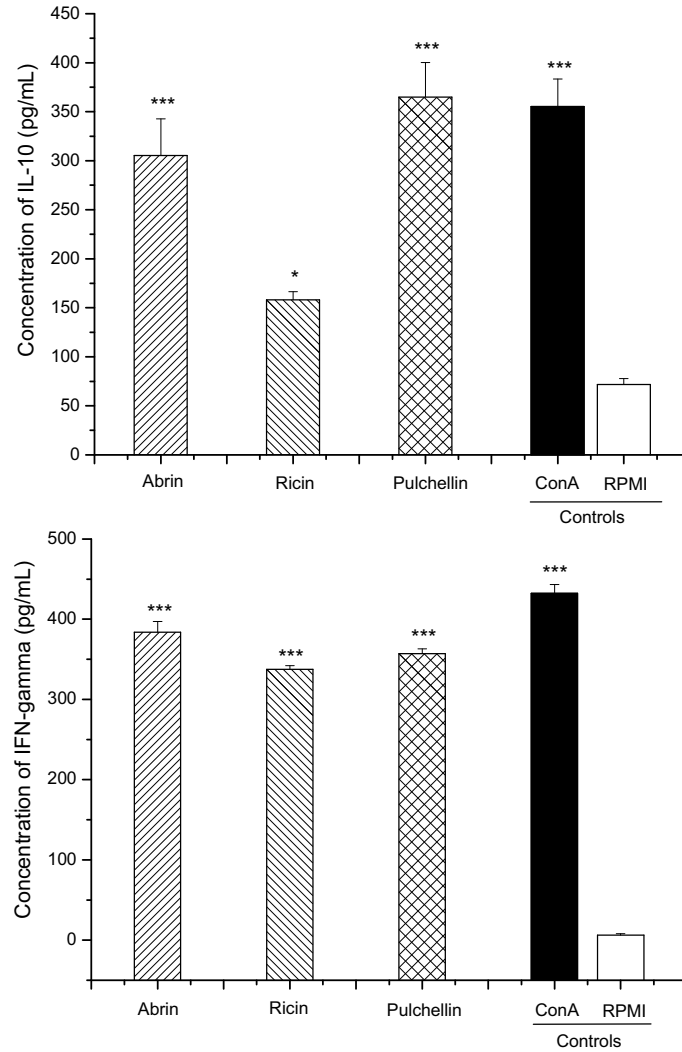


Figure 2 Proteins effects on IFN- γ and IL-10 synthesis in lymphocytes. For the cytokine immunoassay, splenic cells (5×10^6 cells/ml) were incubated for 24 hours with abrin, ricin or pulchellin at 0.39 ng/mL (well concentration). Cells incubated just with Concanavalin A (0.5 μ g/ml) were used as a positive control and cell in culture medium (RPMI-1640) as a negative control. One-way ANOVA with Turkey test was performed. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ vs. negative control.

APÊNDICE

PREPARO DE SOLUÇÕES, REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

- **Líquido de Lázarus**

Violeta de genciana 1% - 2mL

Ácido acético glacial – 3mL

Água destilada q.s.p 100mL

- **Meio MEM**

Minimum Essential Médium (GIBCO) – 9,6g

NaHCO₃ – 2,2g

Água mili-Q q.s.p 1L

Solubilizar os pós em 80% da água mili-Q utilizando um Becker de 1L. Ajustar o pH da solução para 7,0-7,2. Em um balão volumétrico de 1L, ajustar o volume da solução. Esterilizar o meio através de filtração com membrena de 0,22µm. Após esterilização, aliquotar o meio em frascos de 200mL. Estocar sob refrigeração a 4°C.

No momento do uso, adicionar ao meio:

Soro fetal bovino - 10%

Garamicina (80mg/mL) - 50µL

Meio MEM - 100mL

- **Meio RPMI-1640**

Dissolver o conteúdo de um frasco em 100mL de água mili-Q.

Acrescentar:

HEPES – 2,38g

Bicarbonato de sódio – 2g

Ajustar o pH em 7,0 – 7,2. Em seguida, completar o volume para 1L e esterilizar utilizando membrana 0,22µm. Após esterilização, aliquotar o meio em frascos de 1L. Estocar sob refrigeração a 4°C.

No momento do uso, adicionar ao meio

Penicilina – 100U/mL

Estreptomicina – 100 U/mL

Glutamina – 2mM

Mercaptoetanol – 50mM

Soro fetal bovino – 5%.

- **Peroxidase**

Pesar 1mg de peroxidase e adicionar 1mL de tampão fosfato. Aliquotar e armazenar a -20°C.

- **Reagente de Griess**

Sulfanilamida – 1,0g

Naftietilenodiamina – 0,1g

Ácido orto-fosfórico – 2,5mL

Água mili-Q q.s.p 100mL

Dissolver a sulfanilamida e naftietilenodiamina. Acrescentar, aos poucos, o ácido orto-fosfórico. Completar o volume para 100mL. Manter o reagente sob refrigeração a 4°C. Proteger da luz.

- **Solução Azul de Trypan**

Solução concentrada

Azul de Trypan – 0,4g

PBS* q.s.p 100mL

Solução para uso

Solução concentrada – 1mL

PBS* q.s.p 10mL

- **Solução de cloreto de amônio (NH_4Cl)**

NH_4Cl – 4,55g

Água mili-Q q.s.p. 500mL

Dissolver o pó e autoclavar.

- **Solução de LPS**

Dissolver 1mg de LPS em 1mL de meio RPMI, esterilizar por filtração utilizando membrana de 0,22 μm e armazenar a -20°C . Posteriormente diluir para a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, utilizando RPMI-1640.

- **Solução de MTT - tetrazólio**

Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) – 10mg

PBS* - 2mL

Meio RPMI sem soro fetal bovino – 8mL

Solubilizar o sal de MTT em PBS* estéril, em seguida deixando no banho de ultra-som por aproximadamente 10 minutos. Por fim, adicionar o meio RPMI sem soro fetal bovino.

- **Solução salina tamponada com fosfato (PBS)**

Solução 1:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 27,4g

Água mili-Q q.s.p 386mL

Solução 2:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 7,88g

Água mili-Q q.s.p. 114mL

Solução estoque: preparar, inicialmente, as soluções 1 e 2. Em seguida, misturar as duas soluções e completar o volume para 1L com água mili-Q e autoclavar. O pH deve ser de 7,2. Armazenar sob refrigeração a 4°C .

Solução de uso:

Solução estoque – 40mL

NaCl – 8,5g

Água mili-Q q.s.p 1L

Ajustar o pH, se necessário, e autoclavar. Armazenar sob refrigeração a 4°C.

- **Solução de vermelho de fenol completa para H₂O₂**

Solução de vermelho de fenol

Vermelho de fenol – 0,5g

Água mili-Q q.s.p 50mL

Dissolver no ultra-som.

Solução de peroxidase

Peroxidase – 1mg

Tampão fosfato – 1mL

Tampão fosfato para H₂O₂

KH₂PO₄ – 1,36g

K₂HPO₄ – 2,282g

NaCl – 8,18g

Dextrose – 0,99g

Água mili-Q q.s.p 1L

Dissolver os pós e acertar pH 7,0.

Para preparar 10mL de solução de vermelho de fenol completa para H₂O₂:

Tampão fosfato para H₂O₂ – 9,7mL

Solução de vermelho de fenol - 200µL

Peroxidase - 100µL

- **Tampão fosfato de potássio**

Fosfato dissódico anidro – 11,46g

Na₂HPO₄.7H₂O – 21,57g

Fosfato monopotássio – 2,65g

Água destilada q.s.p 1L

Acertar pH 7,2

- **Teste imunoenzimático ELISA de captura**

As soluções preparadas para a realização do ELISA estão descritas a seguir:

Carbonato de sódio 0,1M

NaHCO_3 – 8,4g

Na_2CO_3 – 3,56

Água mili-Q q.s.p 1L

pH 9,5

Fosfato de sódio 0,2M

Na_2HPO_4 – 11,8g

NaH_2PO_4 – 16,1g

Água mili-Q q.s.p 1L

pH 6,5

Diluyente de ensaio

PBS* com 10% de soro fetal bovino

Tampão de lavagem

PBS* com 0,05% de Tween 20

Solução de parada

H_2PO_4 – 11,22 mL

Água mili-Q q.s.p 100mL

- **Tioglicolato 3%**

Colocar 3g do meio em 100mL de água destilada. Distribuir em tubos e autoclavar.