

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

EFEITO DA *Aloe vera* (L.) NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA *IN VITRO*
JUNTO À PROTEÍNA H-RAS

Wylly Araújo de Oliveira

João Pessoa-PB

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Wylly Araújo de Oliveira

**EFEITO DA *Aloe vera* (L.) NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA *IN VITRO* JUNTO
À PROTEÍNA H-RAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Creusioni Figueredo dos Santos

João Pessoa-PB

2008

O48e Oliveira, Wylly Araújo de.
Efeito da *Aloe vera* (L.) na resposta
imunológica in vitro junto à proteína H-ras/
Wylly Araújo de Oliveira.- João Pessoa,
2008.
82p.
Orientadora: Creusioni Figueredo dos
Santos
Dissertação (mestrado). UFPB/CCS
1-Produtos naturais. 2.Aloe vera. 3.
Farmacologia. 4. Imunoterapia

UFPB/BC

CDU 547.9 (043)

Wylly Araújo de Oliveira

**EFEITO DA *Aloe vera* (L.) NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA *IN VITRO* JUNTO
À PROTEÍNA H-RAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia.

Aprovado em 29 de fevereiro de 2008

Banca examinadora:

Profa. Dra. Creusioni Figueredo dos Santos (orientadora)

DBM/CCEN/UFPB

Prof. Dr. Arnaldo Correia de Medeiros (examinador externo)

DBM/CCEN/UFPB

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira (examinador interno)

DCF/LTF/UFPB

João Pessoa-PB

2008

Dedicatória

Com amor, dedico o presente trabalho a minha família: a meu pai Francisco Claro de Oliveira, a minha mãe Maria Araújo Filha e a meus irmãos Killy Araújo de Oliveira e Welly Araújo de Oliveira.

Agradecimentos

A minha família pela confiança, pelo apoio e por ter sempre acreditado em mim.

A professora Creusoni pela orientação desde a iniciação científica.

Ao Dr. Jean-Jacques Fournié.

Aos amigos e parceiros de laboratório cuja ajuda foi imprescindível na realização do trabalho: Sócrates Golzio, Ricley Falcão, Márcio Marinho, Alba Fabíola, Edma Daianna, Joás Pinheiro, Max Caldas, Antônio Cláudio e Herman Costa.

A Igara, bem mais que minha amiga, por ter me apoiado nos momentos difíceis.

Aos professores que sempre mantiveram suas portas abertas nos momentos em que mais necessitamos: Márcia Regina Piuvezam e Rita Baltazar de Lima.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Molecular e do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba.

A todos que de alguma forma contribuíram com o trabalho, o meu profundo agradecimento.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

A proteína Ras alterna entre um estado ativo ligado ao GTP, que envia para o núcleo sinais que conduzem a célula para proliferação e diferenciação, e um estado inativo ligado ao GDP. Quando mutada, a Ras pode induzir a proliferação exacerbada da célula e originar tumores. A proteína Ras mutada representa um antígeno tumoral específico e é imunogênica em indivíduos saudáveis e em pacientes com câncer. Substâncias oriundas de plantas, entre elas polissacarídeos, são capazes de estimular o sistema imune a combater vírus, bactérias e células tumorais. Foi investigada a resposta de células mononucleares de sangue periférico quando estimuladas pela proteína H-ras normal ou mutada, pelo extrato etanólico ou pelas frações de *Aloe vera* (L.), ou pelo dois juntos. As proteínas H-ras mutada e normal recombinantes foram expressas em *Escherichia coli*, purificadas e dosadas. Foi preparado extrato etanólico de *A. vera* e suas frações hexânica, clorofórmica, acetato etílico, n-butanólica e aquosa. A proliferação celular foi analisada quando as células foram expostas a diversas concentrações das proteínas e dos extratos separadamente. Foi também avaliado o aumento da proliferação celular quando colocadas na mesma cultura uma das proteínas e o extrato ou uma de suas frações. A proliferação celular foi avaliada pelo método do MTT. Culturas de células em presença da proteína selvagem ou mutada, nas concentrações 5, 10, 50, 100 e 300µg/mL, não mostram proliferação quando em uma única exposição. As fases n-butanólica nas concentrações 100 e 500µg/mL e aquosa nas concentrações 20, 50, 100 e 500µg/mL foram capazes de promover o processo proliferativo sobre a cultura celular, sozinhas e tanto com a proteína normal quanto com a mutada. Quando a cultura foi realizada com estas fases nestas concentrações juntamente com a proteína mutada foi observado aumento na proliferação celular, o que não aconteceu nas mesmas condições, quando à cultura foi adicionada a proteína H-ras selvagem.

Palavras-chave: Produtos naturais. *Aloe vera*. Resposta imunológica. Imunoterapia antitumoral. H-ras.

Abstract

The Ras protein alternates between an active GTP-bound state, which sends to nucleus orders that lead the cell to proliferation and differentiation, and an inactive state binding to GDP. When mutant, Ras can increase cell proliferation and origin tumors. Mutant Ras is a specific tumor antigen and immunogenic in healthy and cancer individuals. Substances of the plants, such as polysaccharide, are able stimulate immune system to fight against virus, bacteria, and tumor cells. Like this, the response of peripheral blood mononuclear cells was investigated when stimulated for wild or mutant H-ras protein, for ethanolic extract or phases of *Aloe vera* (L.), or both. The recombinant wild and mutant H-ras proteins were express in *Escherichia coli*, purified and determined protein concentration. It was prepared ethanolic extract of *A. vera* and its hexanic, chloroformic, ethyl acetate, n-butanolic and aqueous phases. The cells were cultured with several concentrations of the proteins or extracts and the cell proliferation was analyzed. It was considered the increase of cell proliferation in culture with one of the proteins (wild or mutant) and the extract or one of your phases. The proliferative response was measured by MTT assay. Culture with only one protein (5, 10, 50, 100 e 300µg/mL) were not to be able to increase proliferation in just one exposition. Only n-butanolic (100 e 500µg/mL) and aqueous (20, 50, 100 e 500µg/mL) phases promoted cell proliferation alone and with wild H-ras and with mutant H-ras. When the culture was done with this phases plus mutant H-ras, it has increased cellular proliferation, this not occurs when the protein in culture was the wild H-ras.

Key-Words: Natural products. *Aloe vera*. Immunological response. Antitumor immunotherapy. H-Ras

Lista de figuras

Figura 1: Cascata de sinalização da proteína Ras.....18

Figura 2: SDS-PAGE 12,5%, linhas 1 a 9, amostra de 100 μ L de cada uma das frações eluídas da coluna de troca iônica (Q Sepharose, Pharmacia Biotech) durante a identificação das frações com a H-ras. P, padrão de peso molecular..... 37

Figura 3: SDS-PAGE 12,5%, amostras de 100 μ L das frações 1 a 10 eluídas da coluna de troca iônica durante a purificação da H-ras mutada. P, padrão de peso molecular.....38

Figura 4: SDS-PAGE 12,5%, frações 11 a 19 (100 μ L) eluídas da coluna de troca iônica durante a purificação da H-ras mutada.....38

Figura 5: SDS-PAGE 12,5%, frações 16-23 (100 μ L) e western blot da H-ras mutada eluída da coluna de gel filtração durante o processo de purificação....40

Figura 6: SDS-PAGE 12,5%, amostras 1-9 (100 μ L) eluídas da coluna de troca iônica durante a purificação da H-ras selvagem. P, padrão de peso molecular..... 41

Figura 7: SDS-PAGE 12,5%, frações de 10-18 (100 µL) eluídas da coluna de troca iônica durante a purificação da H-ras normal. P, padrão de peso molecular... 41

Figura 8: SDS-PAGE 12,5%, frações 16-23 (100 µL) e western-blot da H-ras selvagem eluída da coluna de gel filtração..... 43

Lista de tabela

Tabela 1: Triagem fitoquímica do extrato etanólico de *A. vera* e de suas fases.

(+), presença e (-)ausência do composto em questão.....50

Lista de gráficos

Gráfico 1: Absorbância das 9 frações eluídas da coluna de troca iônica e concentrações de NaCl em que cada fração foi eluída, no processo de purificação das proteínas H-ras.....36

Gráfico 2: Absorbância de cada uma das 19 frações eluídas da coluna de troca iônica durante o processo de purificação da H-ras mutada e a correspondência do gradiente cor NaCl em que cada fração foi eluída..... 39

Gráfico 3: Absorbância de cada uma das 17 frações eluídas da coluna de troca iônica durante o processo de purificação da H-ras selvagem e o gradiente de NaCl correspondente.....42

Gráfico 4: Curva de calibração utilizada na dosagem das proteínas H-ras selvagem e mutada. R^2 , coeficiente de correlação; $y=0,0055x$, equação da reta..... 44

Gráfico 5: Proliferação da cultura de células mononucleares com diferentes concentrações da proteína H-ras mutada. * $p<0,05$, $n=3$ 45

Gráfico 6: Proliferação da cultura de células mononucleares com diferentes concentrações da proteína H-ras selvagem. * $p<0,05$, $n=3$45

Gráfico 7: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>A. vera</i> . * $p < 0,05$, $n = 3$	46
Gráfico 8: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase hexânica do extrato de <i>A. vera</i> . * $p < 0,05$, $n = 3$	47
Gráfico 9: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase clorofórmica do extrato de <i>A. vera</i> . * $p < 0,05$, $n = 3$	47
Gráfico 10: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase acetato etílico do extrato de <i>A. vera</i> . * $p < 0,05$, $n = 3$	48
Gráfico 11: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase n-butanólica do extrato de <i>A. vera</i> . * $p < 0,05$, $n = 3$	49
Gráfico 12: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase aquosa do extrato de <i>A. vera</i> . * $p < 0,05$, $n = 3$	49
Gráfico 13: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50 μ g/mL) e o extrato etanólico (50 μ g/mL). * $p < 0,05$, $n = 3$	51

Gráfico 14: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase hexânica do extrato de *A. vera* (50µg/mL). * p<0,05, n=3.....51

Gráfico 15: Proliferação da cultura de células em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase clorofórmica do extrato de *A. vera* (50µg/mL). * p<0,05, n=3..... 52

Gráfico 16: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase acetato de etila do extrato de *A. vera* (50µg/mL). * p<0,05, n=3.....52

Gráfico 17: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase n-butanólica do extrato de *A. vera*(100 e 500µg/mL). * p<0,05, n=3. A comparação estatística é entre as barras com a mesma cor..... 54

Gráfico 18: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase aquosa do extrato de *A. vera* (20, 50 e 100µg/mL). * p<0,05, n=3. A comparação estatística é entre as barras com a mesma cor.....55

Lista de abreviaturas

Ac - anticorpo

APC - célula apresentadora antígeno profissional

CO₂- dióxido de carbono

DAB - diaminobenzidina

DTT-ditiotreitol (Trans-4,5-dihidroxi-1,2-dithiano)

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EEt.- extrato etanólico

FAc- fase acetato de etila

FAq- fase aquosa

FcγR- receptores de anticorpos

FBu- fase n-butanólica

FClor.- fração clorofórmica

FHex.- fração hexânica

GAP-proteína ativadora de GTPase

GDP- guanosina difosfato

GEF- fator de troca de nucleotídeos

GTP- guanosina trifosfato

HCl - ácido clorídrico

H₂SO₄- ácido sulfúrico

Ig- imunoglobulina

IL- interleucina

KDa- kilodáton

LB- Luria Bertani

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

MgCl₂ - cloreto de magnésio

mM-milimolar

MRB - modificadoras da resposta biológica

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NaCl - cloreto de sódio

nm-nanômetro

PBS - solução de fosfato tamponado

PMSF - fluoreto de fenil-metil-sulfonil

R²- coeficiente de correlação

RM - receptor de manose

RTLs - receptores toll-like

SDS - dodecil-sulfato de sódio

SDS -PAGE- gel de eletroforese em poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SER - elemento de resposta ao soro

SRF - fator de resposta ao soro

TCF - fator do complexo ternário

TCR - receptor de linfócito T

Sumário

1- Introdução.....	17
1.1-A proteína Ras e suas moléculas efetoras.....	17
1.2-A proteína Ras e sua relação com o câncer.....	19
1.3-resposta imune frente ao câncer.....	20
1.4-A Ras como alvo da imunoterapia.....	22
1.5-Plantas como fonte de fármacos.....	23
1.6-Substâncias modificadoras da resposta biológica.....	25
1.7- <i>Aloe vera</i> (L.).....	27
2-Objetivos.....	29
2.1-Gerais.....	29
2.2-Específicos.....	29
3-Metodologia.....	30
3.1-Purificação das proteínas H-ras selvagem e mutada.....	30
3.1.1-Cultura de <i>Escherichia coli</i> W110	30
3.1.2-Extração da proteína.....	31
3.1.3-Identificação das frações representativas na purificação das proteínas H-ras selvagem e mutada.....	31
3.1.4-Análise quantitativa das proteínas.....	32
3.1.5-Western-blot.....	32
3.2-Obtenção dos extratos da planta.....	33

3.3-Triagem fitoquímica.....	34
3.4-Cultura de células mononucleares.....	34
3.5-Ensaio de proliferação celular.....	35
3.6-Análise estatística.....	35
4- Resultados.....	36
4.1-Purificação da H-ras e identificação das frações contendo as proteínas....	36
4.1.1-Purificação da H-ras mutada.....	37
4.1.2-Purificação da H-ras selvagem.....	40
4.2-Dosagem das proteínas.....	43
4.3-Resposta de células mononucleares de sangue periférico à proteína H-ras selvagem e mutada.....	44
4.4-Resposta de células mononucleares de sangue periférico ao extrato de <i>Aloe vera</i> e suas frações e triagem fitoquímica.....	46
4.5-Resposta de células mononucleares de sangue periférico frente a proteína H-ras selvagem ou mutada e ao extrato de <i>Aloe vera</i> e suas frações.....	50
5-Discussão.....	56
6-Conclusões.....	66
7-Referências.....	67
Anexo.....	81

1- Introdução

1.1-A proteína Ras e suas moléculas efetoras

A Ras é uma proteína monomérica que alterna entre um estado ativo ligado ao GTP e um estado inativo ligado ao GDP. A Ras não está ligada diretamente aos receptores de superfície celular. As proteínas, GRB2 e Sos (membro da família das proteínas permutadoras de nucleotídeos, GEF) são responsáveis pela transdução de sinal entre o receptor tirosino-cinase ativado por ligante e a Ras (SCHEFFZEK et al., 1997). Estímulos extracelulares apropriados como fator de crescimento derivado de plaquetas, epidérmico, dos fibroblastos e neural causam alteração conformacional e ativação dos receptores tirosino-cinases na superfície da membrana citoplasmática. Essas transformações são realizadas através da formação de dímeros de receptores e ativação da atividade enzimática tirosino-cinase. Um dos receptores fosforila resíduos tirosina da cauda citoplasmática do outro receptor, isto permite que o domínio SH2 da proteína adaptadora GRB2 acople ao receptor ativado e o domínio SH3 desta proteína liga-se a proteína Sos que por sua vez causa uma mudança conformacional na Ras que permite a dissociação do GDP; como a concentração de GTP no citosol é maior que a de GDP, a ligação daquele nucleotídeo a Ras torna-a ativada (GARBY et al., 2000; LODISH et al., 2003; HERRMANN, 2003), (Figura 1).

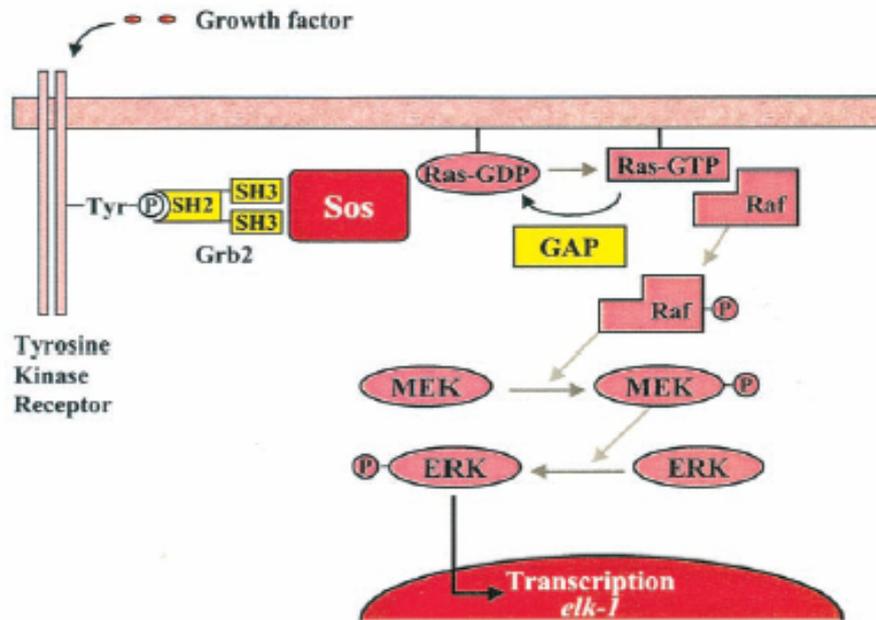


Figura 1: Cascata de sinalização da proteína Ras (GARBAY et al., 2000).

A Ras-GTP ativa a proteína Raf, uma serino/treonino cinase, que fosforila e ativa a proteína MEK a qual fosforila suas proteínas alvo tanto em resíduo tirosina quanto em resíduos serina ou treonina. A MEK por sua vez fosforila e ativa uma outra serino/treonino-cinase. A MAP cinase forma dímero que então fosforila e ativa outra cinase, a $p90^{\text{RSK}}$. O dímero da MAP cinase e a $p90^{\text{RSK}}$ ativado sofrem translocação para o núcleo, onde regulam a atividades de vários fatores de transcrição (GARBAY et al., 2000; CHANG; KARIN, 2001, LODISH et al., 2003).

No núcleo, a $p90^{\text{RSK}}$ fosforila o fator de resposta ao soro (SRF) enquanto a MAP cinase fosforila o fator do complexo ternário (TCF). Dois SRFs e um TCF formam um complexo e ligam-se a uma seqüência no DNA chamada de elemento de resposta ao soro (SER, serum response element), que regula alguns genes, como o gene *c-fos*. O gene *c-fos* codifica o fator de transcrição *c-fos*, que induz a expressão de muitos genes que codificam proteínas necessárias para que as células avancem no ciclo celular, impulsionando a célula ao longo das fases do ciclo celular (LODISH et al., 2003).

A cascata de ativação dos receptores tirosino-cinases pode assim ser resumida: fator de crescimento \rightarrow receptor tirosino-cinase \rightarrow GRB2 \rightarrow Sos

→ Ras → Raf → MEK → MAPK → fatores de transcrição → proliferação e diferenciação celular (LODISH et al., 2003; RAJALINGAM et al., 2007) (Figura 1).

O complexo Ras-GTP é desligado quando ele é hidrolisado a Ras-GDP. Esta hidrólise é extremamente lenta, sendo acelerada por uma proteína ativadora de GTPase (GAP) (SCHEFFZEK et al., 1997; VETTER; WITTINGHOFER, 2001; SCHUBBERT et al., 2007).

1.2-A proteína Ras e sua relação com o câncer

Genes *ras* foram identificados em muitas espécies. A homologia funcional entre genes *ras* de diferentes espécies foi demonstrada em alguns casos e os mais notáveis são entre leveduras e humanos. Genes *ras* humanos podem resgatar células de leveduras deficientes na proteína Ras. Humanos e roedores codificam três genes *ras* funcionais, H-ras, K-ras (subtipos A e B) e N-ras, os quais estão distribuídos em diferentes cromossomos e codificam proteínas com 21 KDa (LOWY; WILLUMSEN, 1993; SCHUBBERT et al., 2007).

As proteínas H-ras, N-ras e K-ras A possuem 188 aminoácidos, e proteína K-ras B possui 189 aminoácidos (MIDLEY; KERR, 2002; FRIDAY; ADJEI, 2005). Nas três proteínas os primeiros 164 aminoácidos são homólogos. São idênticas nos primeiros 86 aminoácidos N-terminais, com 79% de homologia nos 78 resíduos seguintes e divergentes nos últimos resíduos, exceto a cisteína C-terminal no resíduo 186 (LOWY; WILLUMSEN, 1993).

A proteína Ras pode ser encontrada em todos os tecidos, sejam eles adultos ou fetais, sendo estimado que haja aproximadamente 3×10^5 moléculas por célula, e que células tumorais podem expressar até 6 vezes mais a proteína H-ras. Cada uma das três proteínas Ras são expressas em quantidades diferentes nos diversos tecidos do corpo (LOWY; WILLUMSEN, 1993).

O proto-oncogene *ras* está envolvido na proliferação e diferenciação, podendo adquirir seu potencial oncogênico como resultado de mutações

pontuais pela substituição de um único aminoácido nas posições 12, 13 ou 61 (BOS, 1989; GAUDERNACK, 1996). A presença de mutações nestas posições resulta em proteínas que são ativas em um estado ligado ao GTP, diminuindo assim a atividade da GAP e contribuindo para o processo de transformação através da transdução constitutiva de sinais que promovem a proliferação celular (SEEBURG et al., 1984; HERRMANN, 2003). Mutações no gene *ras* foram descritas em uma grande variedade de tumores malignos humanos, como em 80% dos adenocarcinomas pancreáticos, 35% dos adenocarcinomas coloretais, 20% dos cânceres de pulmão, 50% dos cânceres de tireóide (MIDLEY; KERR, 2002). De maneira geral, a proteína Ras está mutada em aproximadamente 30% de todos os cânceres. A mutação faz com que a Ras se torne insensível à GAP (proteína ativadora de GTPase) que é a responsável pela transformação da Ras-GTP (ativa) a Ras-GDP (inativa) (SCHEFFZEK et al., 1997).

1.3-Resposta imune frente ao câncer

Para que as células do sistema imunológico, como os linfócitos, possam reconhecer antígenos protéicos, estes precisam ser degradados em peptídeos menores e expressos na superfície das células ligados a moléculas MHC (GUERMONPREZ et al., 2002; TROMBETTA; MELLMAN, 2005).

Os linfócitos T CD4⁺ reconhecem peptídeos ligados a moléculas MHC classe II que geralmente são captados pelas células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs) do meio extracelular, enquanto linfócitos T CD8⁺ citotóxicos reconhecem peptídeos ligados a moléculas MHC classe I oriundos de microrganismos que infectam a célula sendo, portanto, antígenos intracelulares; tal reconhecimento ocorre através dos receptores de linfócitos T (TCRs)(WATTS, 1997; RUDOLPH et al., 2006).

As células que expressam moléculas MHC classe II têm grande capacidade de endocitar antígenos extracelulares e são ditas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), são elas macrófagos, linfócitos B e células dendríticas. Porém recentemente foi mostrado que outros

tipos de células expressam MHC classe II, como eosinófilos (TROMBETTA; MELLMAN, 2005; ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Todas as células do organismo que possuem núcleo são capazes de expressar peptídeos ligados a moléculas MHC classe I (YORK; ROCK, 1996). A função dos linfócitos CD4⁺ é ativar outras células como macrófagos e linfócitos B, através de mensageiros químicos (citocinas). A eliminação do antígeno pode ocorrer, ou pelo aumento da sua fagocitose ou pela produção de anticorpos específicos induzidas pelos linfócitos T CD4⁺ ou ainda ocorrer pelos linfócitos CD8⁺ citotóxicos que são capazes de matar as células infectadas (CONSTANT; BOTTOMLY, 1997).

Além do sinal emitido para o interior dos linfócitos quando seu receptor (TCR) reconhece um antígeno ligado a molécula MHC, é necessário um segundo sinal para que haja ativação dos linfócitos. Este segundo sinal é emitido quando moléculas coestimulatórias (B7-1 ou B7-2) da célula que apresenta o antígeno ligado à molécula MHC e interage com moléculas acessórias (CD28) na superfície do linfócito (VIOLA; LANZAVECCHIA, 1996; KORB et al., 1999; BROMLEY et al., 2001; SONPAVDE et al., 2007; MITTAL et al., 2008).

Células tumorais expressam antígenos específicos na superfície da célula ligados em moléculas MHC. Um dos problemas é que nem sempre as células tumorais, por não expressarem moléculas coestimulatórias, estimulam linfócitos T. Uma vez que os linfócitos T sejam ativados, eles são capazes de reconhecer e destruir células tumorais expressando o antígeno tumoral (ADAM et al., 2003).

Os tumores são imunogênicos e o câncer pode ser causado por uma variedade de defeitos genéticos que ocorrem em genes os quais codificam proteínas envolvidas no crescimento celular. Os componentes do sistema imune geralmente não reconhecem ou respondem aos genes defeituosos, mas reconhecem e respondem às proteínas anormais codificadas por estes genes. Quando as células tornam-se cancerosas, elas produzem antígenos novos e não familiares que podem ser reconhecidos e atacados pelas células do sistema imune (LEWIS; HOUGHTON, 1995; ADAM et al., 2003).

Foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que linfócitos citotóxicos CD8⁺ não são os únicos efetores funcionais requeridos para a imunidade antitumoral. O fato é que os linfócitos T CD4⁺ são muito importantes e exercem um papel crítico na

erradicação de tumores (GOEDEGEBUURE; EBERLEIN, 1995; SONPAVDE et al., 2007; BALLESTRERO et al., 2008).

1.4-A Ras como alvo da imunoterapia

Linfócitos T específicos para células tumorais foram identificados em pacientes com vários tipos de tumores. Um meio de aumentar a resposta destes linfócitos é a imunização com antígenos específicos do tumor (LEWIS; HOUGHTON, 1995). Mutações pontuais em genes de células normais podem gerar novos antígenos que podem ser reconhecidos pelos linfócitos T (DE PLAEN et al., 1988; SIBILLE et al., 1990). Os produtos de oncogenes mutados, como a proteína Ras, são alvos de intensos estudos de imunoterapias antitumorais (MIDLEY; KERR, 2002).

Quando mutada, a Ras está intimamente envolvida no fenótipo maligno da célula tumoral e é um antígeno tumoral. Assim, mutações em Ras podem representar um alvo atrativo para a resposta de linfócitos T anti-tumorais específicos. O sucesso no reconhecimento de células tumorais que possuem a Ras mutada, requer o processamento de epítomos antigênicos, com sua ligação a moléculas MHC apropriadas na superfície da célula em uma densidade suficiente para o reconhecimento dos receptores de células T (TCRs) (GJERTSEN et al., 1997).

A proteína Ras mutada não é expressa em células normais e assim representa uma proteína tumoral específica. A Ras mutada ou seqüências de peptídios correspondentes foram apresentadas por serem imunogênicos em indivíduos saudáveis (JUNG; SCHLUESENER, 1991) e em pacientes com câncer (GEDDE-DAHL III et al., 1992). A maioria dos linfócitos T humanos que respondem à Ras são CD4⁺ auxiliares, mas também células CD8⁺ citotóxicas isoladas de pacientes com adenocarcinoma de cólon, específica para uma mutação simples em Ras são capazes de matar células tumorais carregando a mesma mutação (FOSSUM et al., 1995). Dessa forma a proteína Ras pode trazer determinante antigênico específico para reconhecimento imune por células T, que exercem um importante papel na atividade antitumoral do hospedeiro (GREENBERG, 1991).

Através do estudo de respostas de células T CD4⁺ auxiliares contra peptídeos Ras é conhecido que nem todas as mutações tornam a proteína imunogênica (FOSSUM et al., 1993).

Foi demonstrado que clones de linfócitos T CD4⁺ auxiliares e CD8⁺ citotóxicos obtidos de pacientes vacinados com um peptídeo da proteína Ras mutada na posição 12 (com valina substituindo glicina) causam a lise *in vitro* de células tumorais com a mesma mutação. Os dados demonstraram que o peptídeo, quando usado no tratamento, foi capaz de ativar simultaneamente células T CD4⁺ e CD8⁺ *in vivo* (GJERTSEN et al., 1997). A ativação proliferativa de células CD4⁺ e CD8⁺ citotóxicas que respondem à Ras geram resposta imune (WALTER et al., 1995). Como observado, a resposta anti-Ras mutada demonstra a potencial importância da descoberta de vacinas peptídicas para o desenvolvimento da imunoterapia do câncer.

Estimulação com peptídeos Ras mutados pode ativar linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ *in vitro*. Estas células são capazes de reconhecer o peptídeo e inibir o crescimento de células humanas contendo as mesmas mutações em Ras (FRIDAY; ADJEI, 2005).

Em estudo pré-clínico de fase I, pacientes tratados com peptídeos que correspondem à proteína Ras mutada (com a valina substituindo a glicina na posição 12) geraram células CD4⁺ e CD8⁺ que responderam posteriormente aos peptídeos e às células tumorais com a mesma mutação (MIDLEY; KERR, 2002).

1.5-Plantas como fonte de fármacos

As plantas constituem a mais rica fonte natural de biomoléculas utilizadas pelo homem. O uso de plantas com propriedades curativas é evidenciado desde a pré-história, em que sociedades primitivas buscavam a cura terapêutica através de preparações botânicas. O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a própria civilização humana, e por um longo tempo, produtos minerais, animais e de plantas foram as principais fontes de drogas (HALBERSTEIN, 2005).

Com o passar do tempo e com o desenvolvimento industrial, o uso de plantas medicinais passou a ser uma forma de tratamento secundário, pois o desenvolvimento de compostos sintéticos assumiu a liderança dos tratamentos. A revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica resultaram na preferência de produtos sintéticos para o tratamento farmacológico (RATES, 2001).

Nos últimos anos têm-se aumentado os interesses em terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas. Apesar disso, o uso em potencial de plantas como fonte de novas drogas é ainda pobremente explorado. Das inúmeras espécies de plantas, apenas uma percentagem muito pequena tem sido investigada no âmbito de suas propriedades farmacológicas (RATES, 2001).

Assim, o uso de medicamentos fitoterápicos, ou seja, à base de plantas com propriedades medicinais ressurgiu na sociedade guiada por um forte apelo da busca pelo natural, associados aos baixos custos de tratamento (GLASER, 1999).

Foi estimado que cerca de 25% das drogas na medicina moderna são direta ou indiretamente derivados de plantas. Em alguns casos particulares, como com drogas antimicrobianas e anti-tumorais, cerca de 60% das drogas avaliadas no mercado e a maioria das drogas em estágio final de estudos clínicos são derivadas de produtos naturais, principalmente de plantas superiores (CALIXTO, 2000).

As pesquisas científicas em torno das plantas medicinais apresentam focos majoritários definidos nas áreas da fitoquímica e farmacognosia, o que torna possível a caracterização de possíveis compostos bioativos, contemplando ensaios de bioatividade, identificação do modo de ação e sítios ativos para ação de fitoquímicos (BRISKIN, 2000).

Várias drogas citotóxicas utilizadas na terapia antitumoral podem ser produtos naturais ou seus derivados. Convém citar como exemplos os alcalóides vimblastina e a vincristina derivados da *Vinca rosea*, a etoposida e a tnioposida que são derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, lignana extraída da *Podophyllum peltatum*, assim como o paclitaxel, um éster alcalóide derivado de *Taxus brevifolia* (NEWMAN et al., 2003).

1.6-Substâncias modificadoras da resposta biológica

Algumas substâncias modificam a resposta biológica por aumentar a resposta imunológica. Estas substâncias MRB podem ser citocinas produzidas pelo próprio organismo por células do sistema imunológico ou derivadas de bactérias, fungos, algas marrons e plantas. Tais derivados exógenos podem ser ácidos nucleicos, lipídios, proteínas ou polissacarídeos, e existem vários receptores para estas substâncias. A ligação das substâncias MRB a estes receptores dispara a resposta imunológica. As substâncias MRB são descritas por terem atividades anti-viral, anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-parasitária e anti-tumoral. Entre os diferentes tipos de substâncias MRB os polissacarídeos, têm uma ampla e diversificada ocorrência na natureza (LEUNG et al., 2006).

Com relação aos compostos químicos de origem vegetal, é importante abordar uma classe primária de biomoléculas que emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos: os carboidratos, especialmente os polissacarídeos. Durante muito tempo os carboidratos foram considerados importantes para o homem apenas no ponto de vista nutricional, no entanto, foram investigados sobre as diferentes estruturas destas moléculas e suas potenciais implicações biológicas (BOHN; BE MILLER, 1995). Polissacarídeos de diferentes fontes naturais apresentam diversas atividades biológicas, incluindo propriedades anti-viral (TALARICO et al., 2004), leishmanicida (NOLETO et al., 2002) e anti-tumoral (STUELP-CAMPELO et al., 2002; PENG et al., 2005).

Os polissacarídeos que podem modificar a resposta biológica estão presentes em plantas fotossintéticas e foram caracterizados por composição altamente heterogênea de carboidratos ramificados (YAMADA et al., 1990; SAIMA et al., 2000; CAPEK et al., 2004).

Muitos destes polissacarídeos derivados de plantas foram estudados por suas propriedades, dentre elas se destacam suas atividades imunoestimulatórias e anti-câncer. Polissacarídeos isolados de *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune*, *Angelica gigas*, *Phellinus linteus*, *Platycodon grandiflorum* possuem efeitos imunoestimulatórios (BORECHERS et al., 1999; OOI; LIU, 2000; JEON; KIM, 2001, HAN et al., 1999; HAN et al.,

2001). As frações polissacarídicas de *Acanthopanax senticosus* são capazes de aumentar a proliferação de linfócitos, aumentaram o processo de fagocitose por macrófagos e ainda a produção de anticorpos por linfócitos B; além de inibir o crescimento de sarcoma e prolongarem o tempo de vida de camundongos com câncer (SHEN et al., 1991).

As respostas celulares que os polissacarídeos desencadeiam são determinadas pelo padrão de expressão e de eventos celulares e moleculares que podem ser disparados pela ligação de proteínas a receptores. Existem receptores em células do sistema imunológico que reconhecem estruturas moleculares conservadas compartilhadas por uma grande quantidade de antígenos. Dentre os principais receptores para estas substâncias e que fazem parte das células da imunidade inata e incluem: os receptores toll-like (RTLs), o receptor dectina-1, receptor de manose (LEUNG et al., 2006).

Os receptores toll-like de mamíferos são homólogos à proteína Toll de *Drosophila* e da família de receptores humanos para interleucina 1 (MEDZHITOV et al., 1997; MEANS et al., 2000). Em mamíferos há pelo menos 10 membros de receptores Toll-like (RTL1 a RTL10) que reconhecem componentes específicos e conservados de vários antígenos. A ativação de TLRs leva ao desenvolvimento de uma resposta imune contra o antígeno (TAKEDA et al., 2003). A estimulação destes receptores pode levar à expressão de citocinas inflamatórias e de moléculas co-estimulatórias (MEDZHITOV et al., 1997). Portanto, os RTLs estão envolvidas na resposta imune, especialmente na ativação da imunidade inata. Os receptores Toll-like reconhecem vários tipos de antígenos como lipopolissacarídeos, polissacarídeos, oligossacarídeos, proteínas, peptidoglicanos (TAKEDA et al., 2003; WEST et al., 2006). Verificou-se também que os RTLs reconhecem e são ativados por compostos sintéticos (HEMMI et al., 2002). Eles estão distribuídos em vários tipos de células da imunidade inata. Monócitos e macrófagos possuem a maioria dos tipos destes receptores (MUZIO et al., 2000). As células dendríticas, linfócitos B, mastócitos também possuem RTLs. Os RTLs podem também ser expressos por vários tipos de células do organismo, como nas células epiteliais da superfície mucosa dos trato respiratório e intestinal, nos rins, sob estímulo de IFN- γ e TNF- α (TAKEDA et al., 2003).

O receptor Dectina-1 foi originalmente isolado como um receptor que reconhece um ligante de célula T não identificado. É um receptor expresso predominantemente em células mielóides, e podem ser regulados por citocinas e por estímulos antigênicos (HERRE et al., 2004a; WILLMENT et al., 2003). Dentre as células que expressam este receptor estão monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos B e T (WILLMENT et al., 2005). Este receptor reconhece uma grande variedade de carboidratos que promovem a produção de citocinas próinflamatórias além de estimular a fagocitose (HERRE et al., 2004b). Além de ligantes exógenos, o receptor Dectina-1 pode reconhecer e se ligar a células T (HERRE et al., 2004a), agindo como uma molécula coestimulatória induzindo a proliferação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (REID et al., 2004).

O receptor de manose (RM) pode reconhecer oligossacarídeos de manose, fucose ou N-acetilglicosamina na superfície de patógenos, causando a fagocitose destes. Adicionalmente a internalização de partículas, o RM promove a secreção de várias citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α) pelas células que o possui, o que ajuda a ativar outras células do sistema imune (ADEREM et al., 1999). O RM pode ser expresso em macrófagos, em células hepáticas, do endotélio linfático, em células de músculo liso de traquéia (TAYLOR et al., 2005).

1.7-Aloe vera (L.)

A *Aloe vera* (L.) é uma planta tropical que cresce facilmente em clima quente. Tradicionalmente ela é usada para cicatrização de ferimentos (MAENTHAISONG et al., 2007) por aumentar a proliferação de fibroblastos (CHOW et al., 2005), por sua atividade antifúngica (RODRIGUEZ et al., 2005; ROSCA-CASIAN et al., 2007), hipoglicêmica (CHOI; CHUNG, 2003), por sua atividade antioxidante (WU et al., 2006).

Muitas outras atividades biológicas incluindo anti-viral, anti-bacteriana, laxativa, protetora contra radiação e imunoestimulante são atribuídas a esta planta, particularmente aos seus polissacarídeos (NI et al., 2004). Os principais

compostos encontrados na planta são oligo- e polissacarídeos, taninos, esteróis e antraquinonas (CHOI; CHUNG, 2003).

Na composição de carboidratos, incluem-se vários polissacarídeos que foram detectados e isolados da polpa da folha de *Aloe vera*, incluindo mananos, pectina, polissacarídeos contendo ácido glicurônico (NI et al., 2004). Os mananos são os carboidratos mais estudados da planta, sendo compostos por polímeros de diversos comprimentos de manoses ligados por ligações β -(1,4) (MANNA; McANALLEY, 1993).

De todos os usos, a fração polissacarídica de *Aloe vera* chama a atenção por sua capacidade de ativar células do sistema imune, o que aumenta o potencial destas células em erradicarem tanto microrganismos bem como células tumorais, estas atividades resultam da ativação de macrófagos e linfócitos T (CHOW et al., 2005).

Os polissacarídeos modificadores da resposta biológica de *Aloe vera* são solúveis em água e estão localizados na polpa clara no interior do gel da folha de *A. vera* (NI et al., 2004).

Quando administrado intraperitonealmente em camundongos com tumores implantados, polissacarídeos dessa planta são capazes de curar completamente ou reduzir o tumor significativamente (PENG et al., 1991). São também efetivos no tratamento de fibrosarcomas caninos e felinos desenvolvidos espontaneamente (HARRIS et al., 1991; KING et al., 1995). A atividade anti-tumoral destes polissacarídeos é mediada pela ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, e não pela citotoxicidade contra as células tumorais. O aumento da atividade imunológica também está presente em vários outros sistemas, pois aumenta a resposta de linfócitos contra aloantígenos *in vitro* (WOMBLE; HELDERMAN, 1988; WOMBLE; HELDERMAN, 1992) e aumenta o tempo de vida de animais infectados por vírus (SHEETS et al., 1991; YATES et al., 1992).

2-Objetivos

2.1- Gerais

- Estudar o efeito proliferativo celular mediante as frações de extrato de *Aloe Vera* (L.) e/ou proteína H-Ras

2.2-Específicos

- Purificar e quantificar as proteínas H-ras selvagem e mutada (com valina substituindo glicina na posição 12);
- Verificar a proliferação de cultura de células mononucleares do sangue periférico com a proteína selvagem ou mutada em várias concentrações;
- Verificar a proliferação de células mononucleares de sangue periférico em cultura com o extrato etanólico de *Aloe vera* (L.) e de suas frações (hexânica clorofórmica, acetato etílico, n-butanólica e aquosa) em diversas concentrações;
- Analisar a resposta das células mononucleares do sistema imune, através da proliferação destas, quando expostas ao extrato da planta ou suas frações juntamente com a proteína selvagem ou mutada.

3- Metodologia

3.1- Purificação das proteínas H-ras selvagem e mutada

3.1.1- Cultura de *Escherichia coli* W110

Colônias de *Escherichia coli* W110 isoladas em meio Luria-Bertani (LB) sólido foram submetidos à pré-culturas em meio LB líquido. Foram realizadas duas culturas de *Escherichia coli* W110, em um volume de 250mL. Uma das culturas continha *E. coli* recombinante portadora do plasmídeo pTACRas (com 5262 pares de bases com gene que confere resistência a ampicilina e que codifica a proteína H-ras selvagem) e do plasmídeo pDMI.1 (com 3740 pares de bases com gene que confere resistência a canamicina), a outra cultura continha *E. coli* recombinante portadora do plasmídeo pTACRas codificante da proteína a H-ras mutada, com uma valina substituindo uma glicina na posição 12, mais gene que confere resistência a ampicilina, e o plasmídeo pDMI.1 com gene que confere resistência a canamicina.

O meio de cultura utilizado foi o Luria-Bertani (meio LB) adaptado com a seguinte composição: triptone 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%, pH 7,0 (BEZERRA, 2004). Ao meio foram adicionados ampicilina (40µg/mL) e canamicina (40µg/mL) para que houvesse seleção das colônias de bactérias resistentes a estes dois antibióticos. As culturas ficaram sob agitação (150rpm) por 8 horas a 37°C (ou até atingir densidade óptica igual a 2) segundo Campbell-Burk e Carpenter 1995, com modificações.

Para induzir a expressão das proteínas selvagem e mutada, foi adicionado às culturas, durante as três últimas horas de cultura, IPTG (isopropilbetatiogalactopiranosídeo) em uma concentração final de 0,04mM (BEZERRA, 2004).

3.1.2- Extração da proteína

As culturas foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Os sedimentos foram ressuspensos com 30 mL de PBS e centrifugados a 3000g por 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram novamente descartados. Este procedimento de lavagem foi repetido três vezes. O sedimento foi congelado à -70°C (FIGUEREDO DOS SANTOS, 1999)

Uma solução tampão de lise (Tris HCl 10mM, NaCl 10mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Lisozima 1mg/mL, PMSF 1mM, pH 7.0) foi adicionada ao sedimento na seguinte proporção: 4g de sedimento/mL de tampão de lise. O recipiente com esta mistura foi colocada em uma cuba com gelo e sonicada através de Vibra Cell™ (Sonics & Material inc) em 6 ciclos de 12 segundos com 40% da potência máxima. O extrato resultante foi centrifugado a 12000g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante aplicado em coluna de troca iônica (Q Sepharose, Pharmacia Biotech) (FIGUEREDO DOS SANTOS, 1999). Este procedimento foi realizado com a cultura de *E. coli* portadora da proteína H-ras selvagem assim como com a cultura com a H-ras mutada.

3.1.3- Identificação das frações representativas na purificação das proteínas H-ras selvagem e mutada

Foi passada solução tampão Tris-HCl (20mM, pH = 6,5) pela coluna de troca iônica (Q Sepharose, Pharmacia Biotech) para lavagem desta. O sobrenadante resultante do processo de extração da H-ras mutada foi aplicado na coluna em um fluxo 0,5mL/minuto. Em seguida lavada com 100 mL da mesma solução tampão de Tris-HCl anterior com um fluxo de 1,0 mL/minuto. A coluna foi submetida à solução tampão (Tris-HCl 20 mM, pH 7.0) com um gradiente de concentração crescente de cloreto de sódio (NaCl), com fluxo de 1mL/minuto. Frações de 4 mL foram eluídas e coletadas. Posteriormente amostras de 100µL de cada fração foram submetidas à SDS-PAGE 12,5% e determinada em 280nm a absorvância de cada fração coletada.

Após a análise do SDS-PAGE 12,5% foi determinada em que concentrações de NaCl a proteína H-ras (21 KDa) estava sendo eluída.

As frações que continham a H-ras foram concentradas em filtro CENTRICOM de 10KDa até ter seu volume final reduzido a 1 mL, e então submetidas a cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-200, Pharmacia Biotech).

Na cromatografia de gel filtração, as proteínas foram eluídas em solução tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM e fluxo de 0,3mL/minuto em frações de 2mL. Amostras de 100µL de cada fração foram analisadas em SDS-PAGE 12,5%.

As frações que mostraram a proteína H-ras pura foram concentradas em uma só fração e submetidas à identificação por western-blot através do anticorpo primário Y13-259.

3.1.4- Análise quantitativa das proteínas

Para dosagem da proteína, foi utilizado o método do biureto. Em tubos de ensaio, foram adicionados a 2,5mL do reagente de biureto (hidróxido de sódio 0,186mol/L, tartarato de sódio e potássio 32mmol/L, iodeto de potássio 30mmol/L e sulfato de cobre 12mmol/L) (LABTEST diagnóstica, MG-Brasil) 50µL de cada amostra ou 50 µL do padrão (2, 20, 40, 60, 80mg/mL). Para construir a curva de calibração foi utilizado padrão preparado no próprio laboratório com albumina bovina (Sigma, St Louis). As amostras foram misturadas com o reagente de biureto, homogeneizadas e deixadas em repouso por 15 minutos. Foram lidas as absorvâncias das amostras e do padrão em espectrofotômetro a 545nm.

3.1.5-Western-blot

A partir do gel SDS-PAGE 12,5% das amostras foi realizada a transferência através de aparelho imunoblot (Trans-Blot, Biorad), em tampão (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, pH 8,3), a 18V por 1 hora. As proteínas foram

transferidas para uma membrana de nitrocelulose a qual foi lavada rapidamente com PBS. Em seguida foi incubada em solução bloqueadora (PBS + Tween 20 0.1% + caseína 5%) por 1 hora, e novamente lavada. A marcagem foi feita com 242ng/ml de anticorpo primário monoclonal anti H-ras Y13-259 (PBS + Tween 20 a 0.1% + caseína 5% com 242ng/mL de Ac) e incubada por 2 horas à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com PBS e com PBS + Tween 20 (0,1%) alternadamente por aproximadamente 5 minutos, em seguida foi novamente incubada com solução do anticorpo secundário (anti-rat Ig, conjugada com peroxidase 1:2000) por uma noite a 4°C. Foi lavada com PBS e com PBS + Tween 20 (0,1%) alternadamente por 5 minutos. A proteína foi revelada em uma solução com PBS + DAB (diaminobenzidina, Sigma) e de água oxigenada 20 volumes líquida. A proteína apresenta-se como uma banda bem definida (como no SDS-PAGE) cor marrom.

3.2-Obtenção dos extratos da planta

A planta foi coletada e posteriormente identificada pela Dr^a. Rita Baltazar de Lima no Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba. As folhas da planta foram lavadas com água destilada, para retirada de resíduos, e depois foram submetidas à maceração com solução hidroalcoólica (80%) por 72 horas. O extrato etanólico resultante foi seco em rotaevaporador a 45°C.

Com parte do extrato etanólico foram feitas partições com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol) sendo que depois da última partição resultou uma fração aquosa que não foi solúvel em n-butanol. As frações resultantes foram concentradas em rotaevaporador a 45°C.

O extrato etanólico e as frações dos extratos secos foram diluídos em PBS e esterilizadas em filtros Millipore 0,2µm.

3.3-Triagem fitoquímica

Para verificar a presença de algumas substâncias nos extratos e nas suas fases foi feita triagem fitoquímica. Os reagentes que foram utilizados são os seguintes: para flavonóides, o ácido difenilaminoborônico; para alcalóides, o reagente de Dragendorff; para terpenos e esteróides, o reagente de Liebermann-Burchard; para carboidratos, timol/H₂SO₄ e para aminoácidos, ninidrina a 1%.

3.4- Cultura de células mononucleares

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, e foi aprovado com o protocolo número 1103/07. O sangue periférico de doadores saudáveis foi coletado no Hemocentro do Estado da Paraíba e encaminhado imediatamente para o laboratório no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba.

O sangue foi misturado ao meio de cultura (RPMI 1640, soro bovino fetal 15%, 100 U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina). Esta mistura foi colocada cuidadosamente sobre ficoll (Sigma) em tubos Falcon. Os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente a 100g por 30 minutos. As células mononucleares de sangue periférico (linfócitos B e T, monócitos) foram transferidas para um outro tubo Falcon acrescido de 15 mL de meio e depois centrifugado à 100 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante desprezado; este procedimento foi repetido 2 vezes.

As células foram ressuspensas com meio de cultura (RPMI 1640, soro bovino fetal 15%, glutamina 4mM, 100 U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina) e o número de células viáveis foi contado em câmara de Neubauer com azul de Trypan. Foi feita microcultura com 5×10^5 células/cavidade, em microplacas com 96 cavidades. A cultura foi incubada por 3 e 5 dias em estufa com 5% de CO₂ a 37°C Todos os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos para confirmação.

3.5- Ensaio de proliferação celular

As culturas foram mantidas por 3 e 5 dias, sendo feito o ensaio logo depois deste período, na presença de 5 a 300µg de proteína p 21 H-Ras, 10 a 500 µg/ml das frações de *Aloe vera*. Foi descartado 100µL do meio de cultura de cada pocinho das placas de cultura celular e repostado com 10µL de uma solução a 5mg/mL de MTT (Amresco). As placas foram incubadas em estufas de CO₂ por 4 horas para incorporação do sal pelas células (MOSMANN, 1983). Para dissolução dos cristais foram adicionados 100µL de SDS a 10% (GIBCO) em HCl 0,01N e incubadas em estufa de CO₂ por 17 horas. Em seguida foi realizada leitura em espectrofotômetro do tipo leitor de microplacas, em comprimento de onda 570nm. Preparou-se controle negativo (célula + meio) e controle positivo (0.5µg/mL de micobactéria lisada).

3.6- Análise estatística

Os resultados foram comparados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA-Dunnett) e considerados como significativos os valores com $p < 0,05$.

4- Resultados

4.1- Purificação das H-ras e Identificação das frações contendo as proteínas

O gráfico 1 mostra a ascendência do gradiente de NaCl necessário para a eluição da proteínas H-ras mutada.

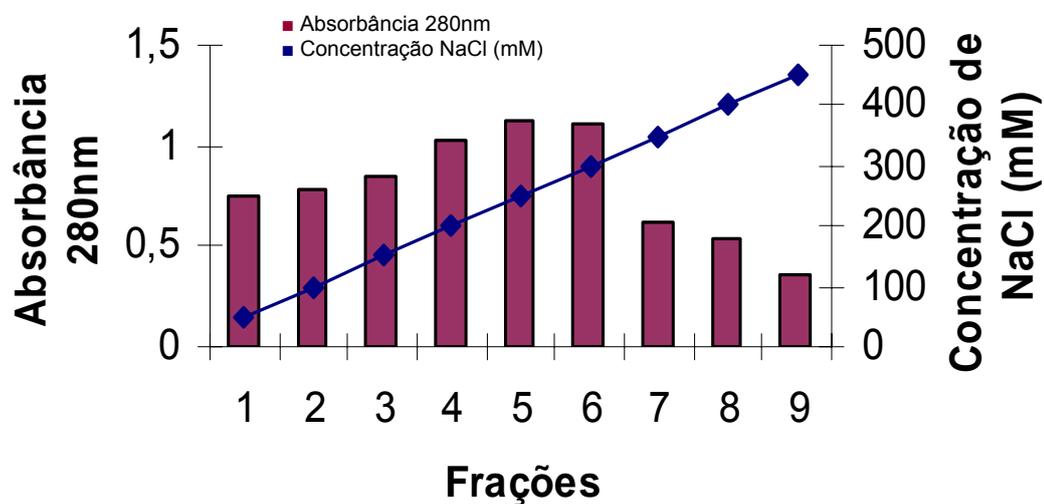


Gráfico 1: Absorbância de 9 frações eluídas da coluna de troca iônica e concentrações de NaCl em que cada fração foi eluída, no processo de purificação das proteínas H-ras.

No processo eletroforético para identificação das frações de interesse, a figura 2 mostra a presença da H-ras (21 KDa) entre as linhas 4-9 do gel, correspondentes às amostras das frações 4-9 eluídas da coluna de troca iônica.

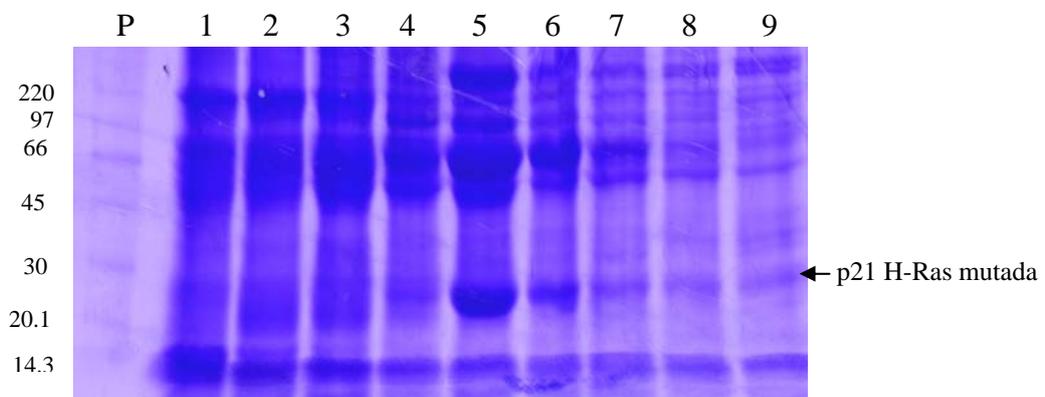


Figura 2: SDS-PAGE 12,5%, linhas 1 a 9, amostra de 100 μ L de cada uma das frações eluídas da coluna de troca iônica (Q Sepharose, Pharmacia Biotech) durante a identificação das frações com a H-ras. P, padrão de peso molecular.

Para melhorar a eficiência do processo de purificação, uma vez sabendo-se que a H-ras estava sendo eluída entre 200 e 450 mM de NaCl, foi realizada cromatografia de troca iônica (Q Sepharose, Pharmacia Biotech) aumentando o número de frações coletadas nesta faixa de concentração. Amostra de 100 μ L de cada fração foi submetida a SDS-PAGE.

4.1.1- Purificação da H-ras mutada

A figura 3 mostra a presença da H-ras mutada nas linhas 6-10 correspondendo às frações 6-10. Apesar das frações 11-14 (Figura 4, linhas 11-14) apresentarem a proteína de interesse, não foram aproveitadas por estar contida entre várias outras proteínas contaminantes, dificultando assim o processo de separação. Portanto, somente as frações 6-10 por apresentarem-se parcialmente puras, foram concentradas em filtro CENTRICON e depois submetidas a cromatografia de exclusão. Aqui, o gradiente de concentração de

NaCl na coluna de troca iônica necessária para eluição das frações 6-10 foi entre 250-300 mM (Gráfico 2).



Figura 3: SDS-PAGE 12,5%, amostras de 100 μ L das frações 1 a 10 eluídas da coluna de troca iônica durante a purificação da H-ras mutada. P, padrão de peso molecular.

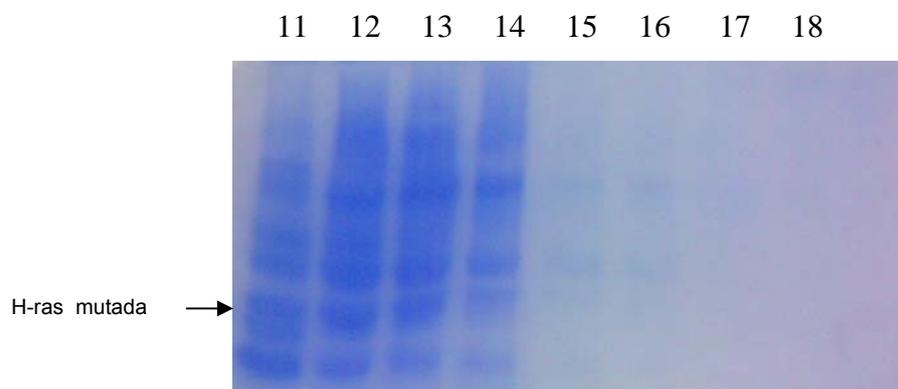


Figura 4: SDS-PAGE 12,5%, frações 11 a 18 (100 μ L) eluídas da coluna de troca iônica durante a purificação da H-ras mutada.

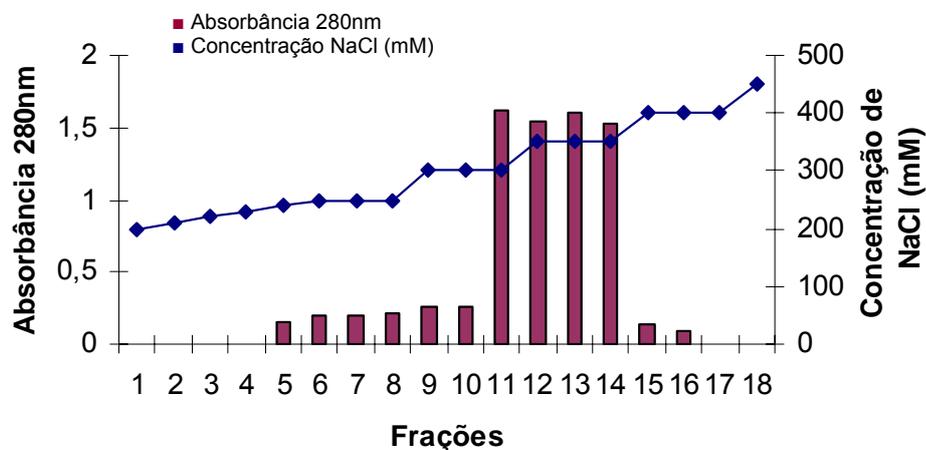


Gráfico 2: Absorbância de cada uma das 18 frações eluídas da coluna de troca iônica durante o processo de purificação da H-ras mutada e a correspondência do gradiente de NaCl em que cada fração foi eluída.

As frações selecionadas da coluna de troca iônica, após serem concentradas em uma só fração, quando submetidas à cromatografia de exclusão (Sephacryl S-200), 30 frações foram coletadas e amostras de 100 μ L de cada fração foram submetidas à gel de SDS-PAGE. A H-ras mutada encontra-se pura entre nas frações 20-22 (Figura 5, linha 5-7). As frações que mostraram a proteína H-ras mutada pura foram concentradas em uma só fração, e sua identificação foi confirmada por western-blot através do anticorpo primário Y13-259.

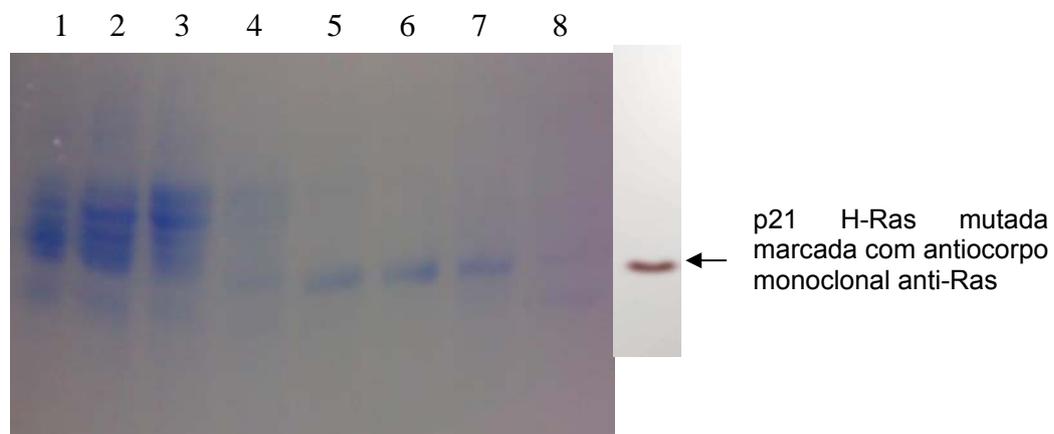


Figura 5: SDS-PAGE 12,5%, frações 16-23 (100 μ L) e western blot da H-ras mutada eluída da coluna de gel filtração durante o processo de purificação.

4.1.2- Purificação da H-ras selvagem

No processo de purificação, a H-ras selvagem foi eluída através da coluna de troca iônica (Q Sepharose, Pharmacia Biotech) nas frações 8-14 (Figuras 6 e 7, linhas 8-14). O gradiente de concentração de NaCl que eluiu a H-ras foi de 250-350 mM (Gráfico 3). Apenas as frações 8 e 9 (Figura 6, linhas 8 e 9) foram concentradas em filtro CENTRICOM e cromatografadas em coluna de exclusão. As frações de 10-14 (Figura 7, linhas 10-14) foram descartadas pela inconveniência das proteínas contaminantes. O gradiente de NaCl para eluição das frações 8 - 9 foi de 250 - 300 mM (Gráfico 3).

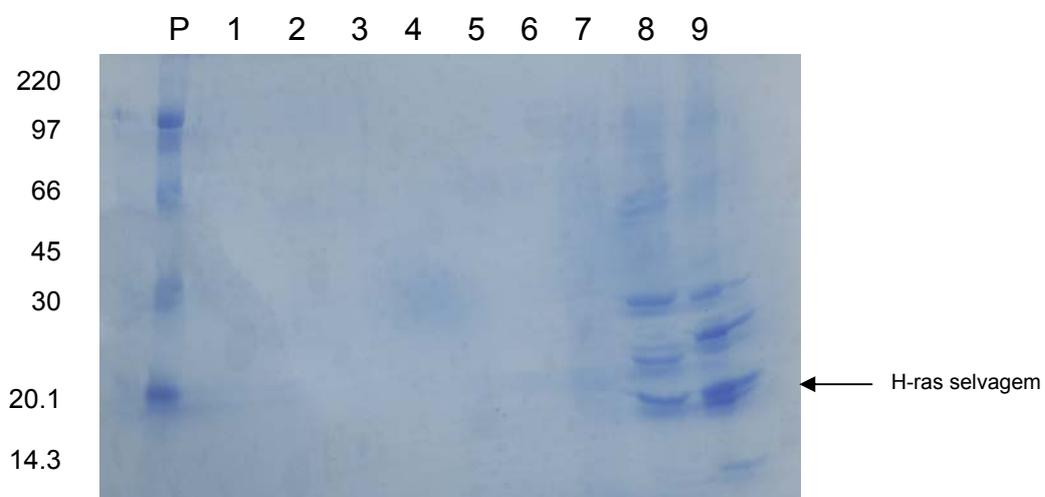


Figura 6: SDS-PAGE 12,5%, amostras 1-9 (100 μ L) eluídas da coluna de troca iônica durante a purificação da H-ras selvagem. P, padrão de peso molecular.

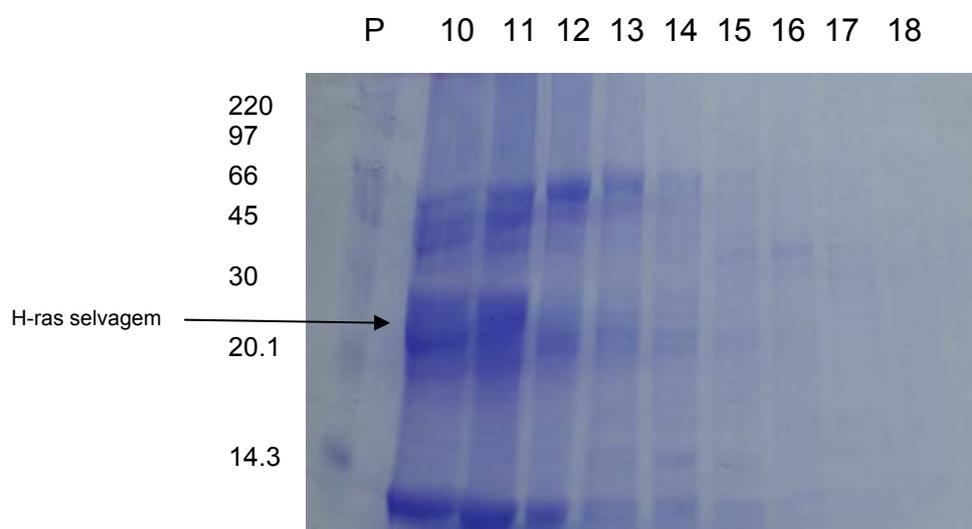


Figura 7: SDS-PAGE 12,5%, frações de 10-18 (100 μ L) eluídas da coluna de troca iônica durante a purificação da H-ras normal. P, padrão de peso molecular.

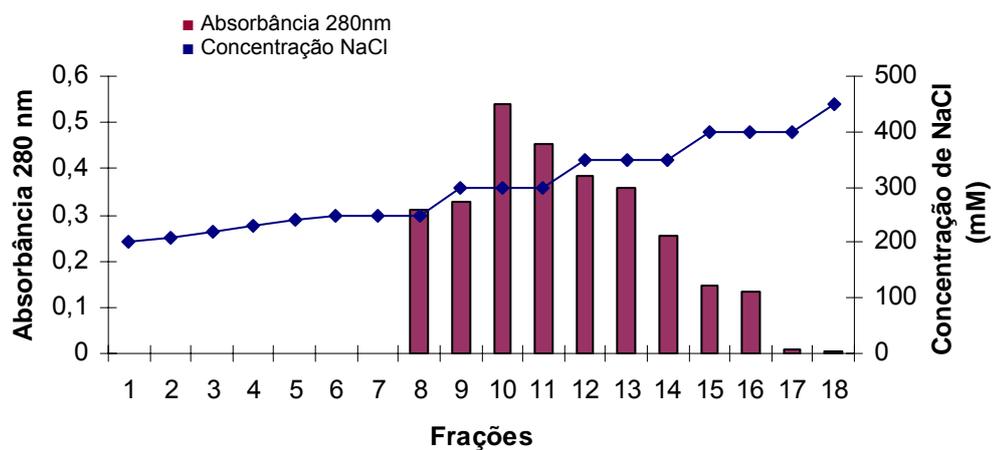


Gráfico 3: Absorbância de cada uma das 18 frações eluídas da coluna de troca iônica durante o processo de purificação da H-ras selvagem e o gradiente de NaCl correspondente.

Quando submetidas a cromatografia de exclusão (Sephacryl S-200), 30 frações foram coletadas e amostras de 100 μ L de cada fração foram submetidas à SDS-PAGE . Resultados mostram que a H-ras selvagem encontra-se pura entre nas frações 17 e 23 (Figura 8, linhas 2-8). As frações 17 a 23 foram unidas em uma só fração. Assim, a presença da H-ras selvagem foi confirmada por western-blot através do anticorpo primário Y13-259, da mesma forma que a mutada.

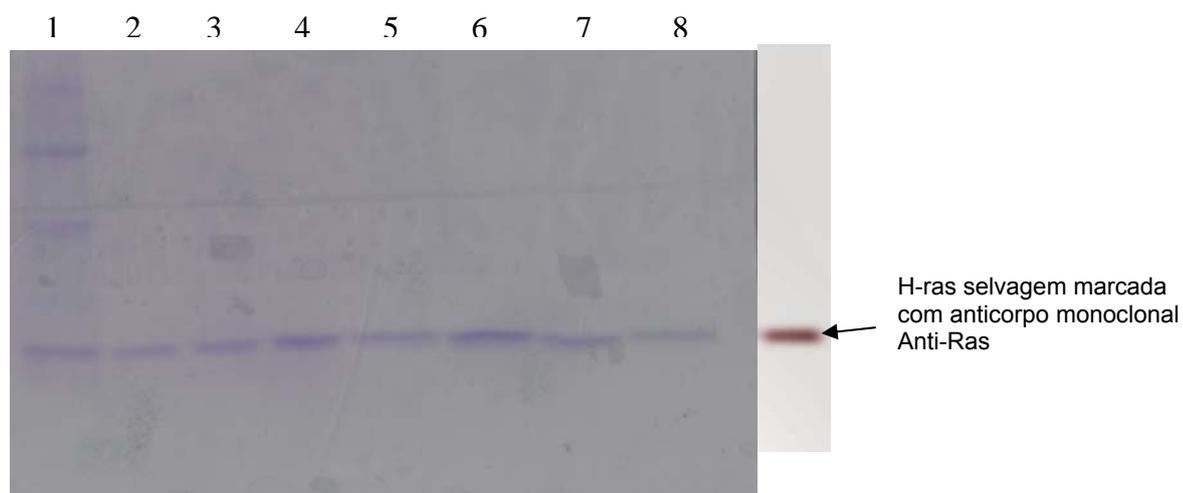


Figura 8: SDS-PAGE 12,5%, frações 16-23 (100 μ L) e western-blot da H-ras selvagem eluída da coluna de gel filtração.

4.2-Dosagem das proteínas

Na curva de calibração da dosagem das proteínas, foi encontrado coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9994 e a seguinte equação da reta: $y=0,0055x$ (Gráfico 4). A partir destes dados e das absorbâncias das amostras foram encontrados os valores das concentrações das proteínas H-ras mutada e selvagem, que foram respectivamente, 4,2 e 4,4 mg/mL.

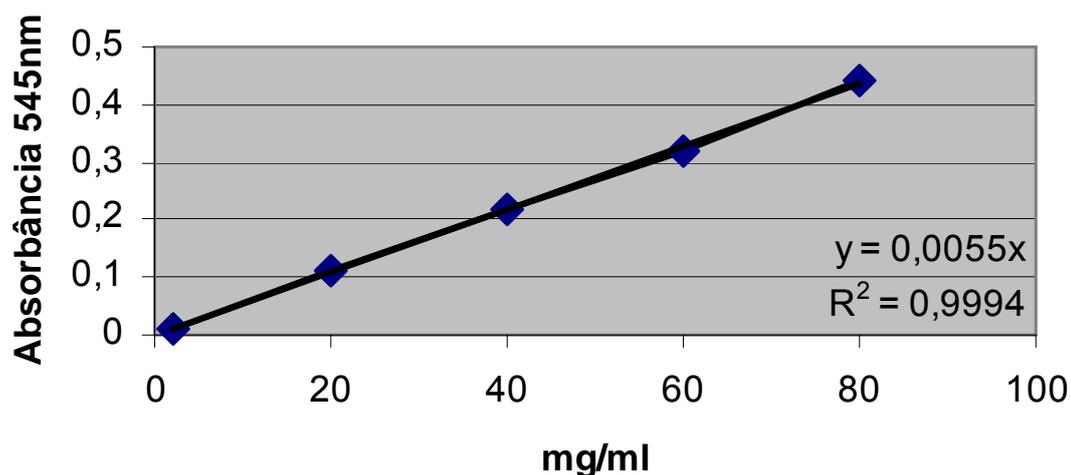


Gráfico 4: Curva de calibração utilizada na dosagem das proteínas H-ras selvagem e mutada. R^2 , coeficiente de correlação; $y=0,0055x$, equação da reta.

4.3-Resposta de células mononucleares de sangue periférico à proteína H-ras selvagem e mutada

Células mononucleares de sangue periférico (linfócitos T, linfócitos B e monócitos) foram cultivadas por 3 e 5 dias em diferentes concentrações das proteínas H-ras normal ou mutada. Não houve proliferação celular significativa entre as células cultivadas em presença da proteína normal ou mutada quando comparada com o controle negativo (células e meio de cultura) em nenhuma das concentrações estudadas (5, 10, 50, 100 e 300 μ g/mL). Os resultados de proliferação do cultivo em 3 e 5 dias foram semelhantes. O gráfico 5 mostra este resultado para a proteína mutada, e o gráfico 6 para proteína normal. As culturas foram feitas em triplicata, e o experimento foi repetido para confirmação.

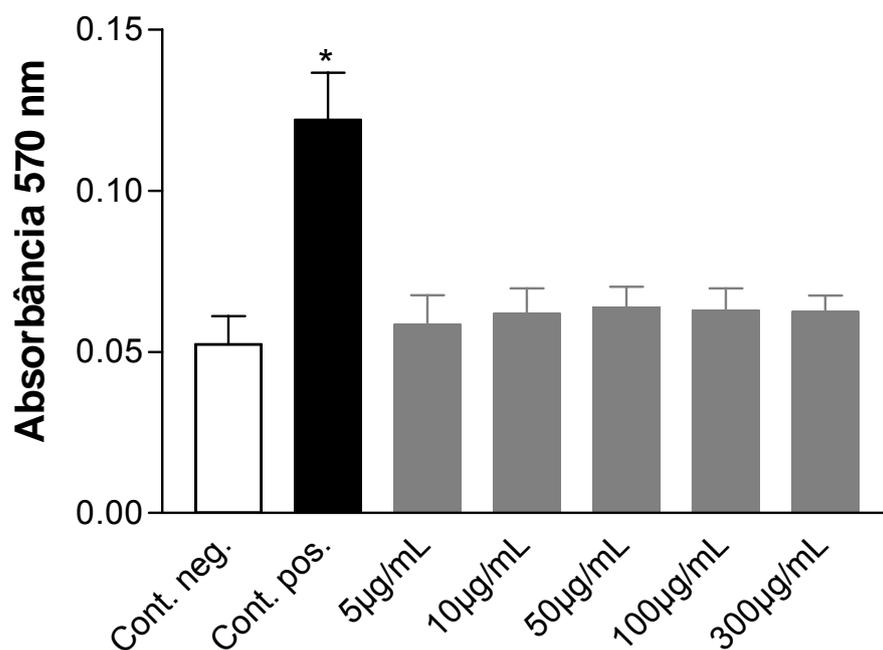


Gráfico 5: Proliferação da cultura de células mononucleares com diferentes concentrações da proteína H-ras mutada. * $p < 0,05$, $n = 3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

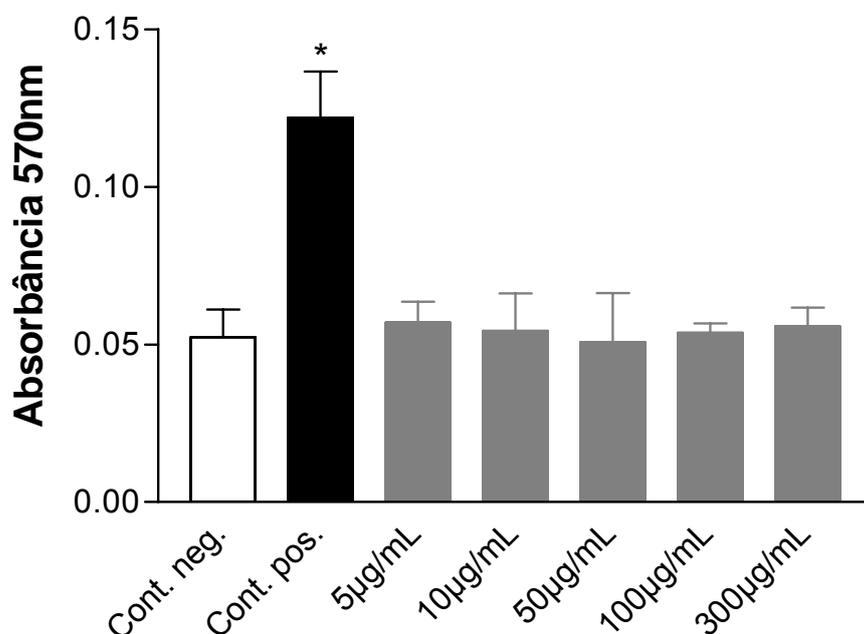


Gráfico 6: Proliferação da cultura de células mononucleares com diferentes concentrações da proteína H-ras selvagem. * $p < 0,05$, $n = 3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

4.4-Resposta de células mononucleares de sangue periférico ao extrato de *Aloe vera* e suas frações e triagem fitoquímica

As células foram cultivadas por 3 e 5 dias com o extrato etanólico de *Aloe vera* (L.) assim como com suas fases (hexânica, clorofórmica, acetato de etila, n-butanol e aquosa) em várias concentrações (10, 20,50, 100, 500 μ g/mL).

Não houve proliferação celular significativa da cultura em nenhuma das concentrações do extrato etanólico e das fases hexânica, clorofórmica e acetato etílica (Gráficos 7-10).

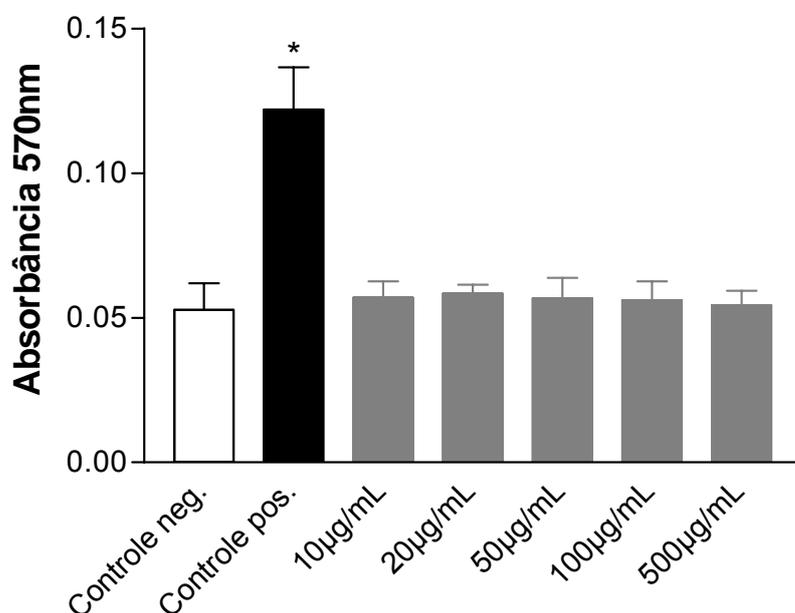


Gráfico 7: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações do extrato etanólico de *A. vera*. * $p < 0,05$, $n=3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5 μ g/ml de micobactéria lisada).

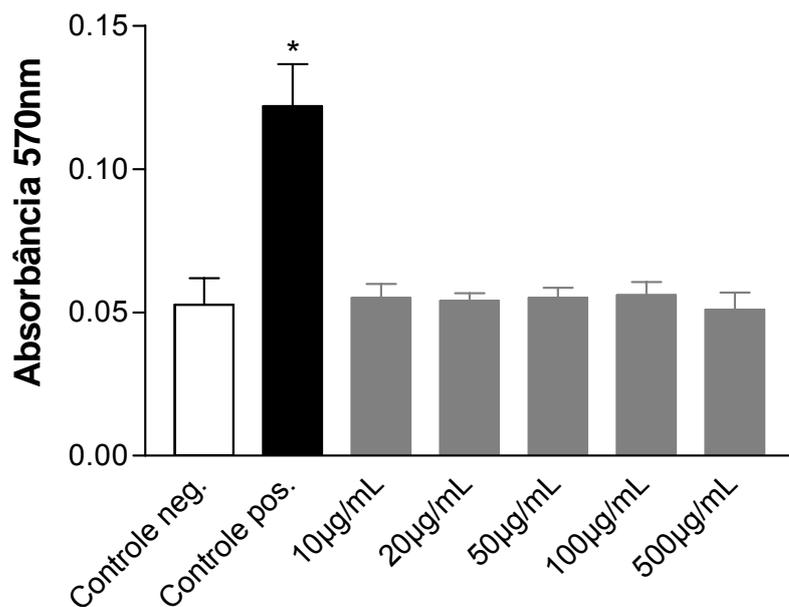


Gráfico 8: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase hexânica do extrato de *A. vera*. * $p < 0,05$, $n = 3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

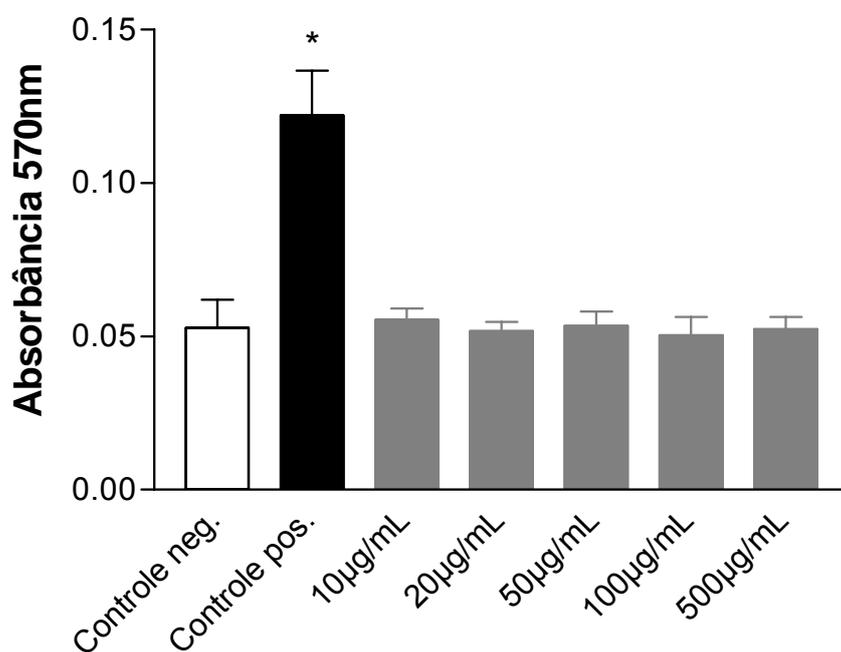


Gráfico 9: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase clorofórmica do extrato de *A. vera*. * $p < 0,05$, $n = 3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

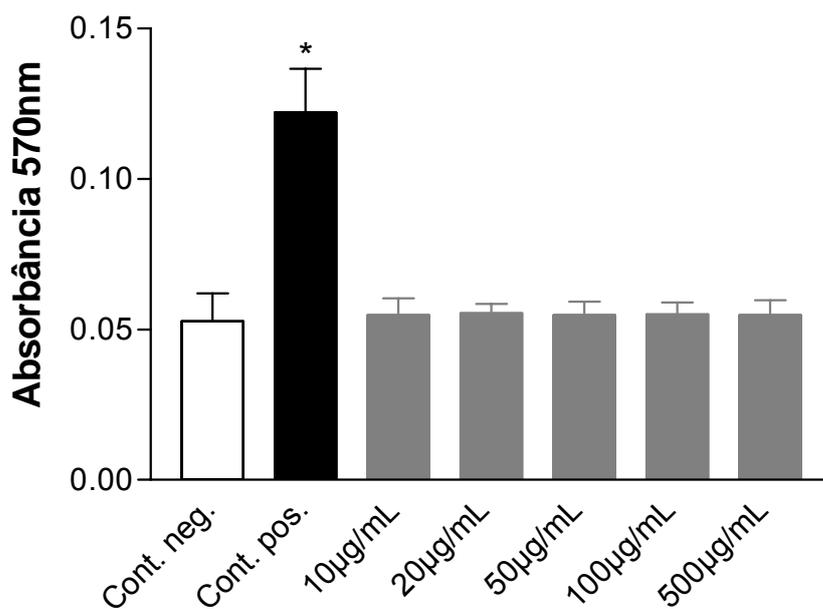


Gráfico 10: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase acetato etílica do extrato de *A. vera*. * $p < 0,05$, $n = 3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

Foi observada proliferação significativa em relação ao controle negativo (células e meio de cultura) apenas no cultivo com as fases n-butanólica nas concentrações 100 e 500µg/mL e aquosa nas concentrações 20, 50, 100 e 500µg/mL (Gráficos 11 e 12). Os resultados de proliferação das culturas celulares no 3^o e 5^o dias foram semelhantes.

No cultivo celular com a fase n-butanólica observou-se aumento da proliferação com o aumento da concentração do extrato, o mesmo aconteceu com a fase aquosa; embora não há incremento na resposta a partir da concentração 100µg/mL. Os resultados sugerem que quanto maior a solubilidade em água do extrato, maior é a sua potência em estimular a proliferação celular.

Os resultados dos testes realizados para indicar a presença de alguns compostos no extrato etanólico e em suas fases estão na tabela 1.

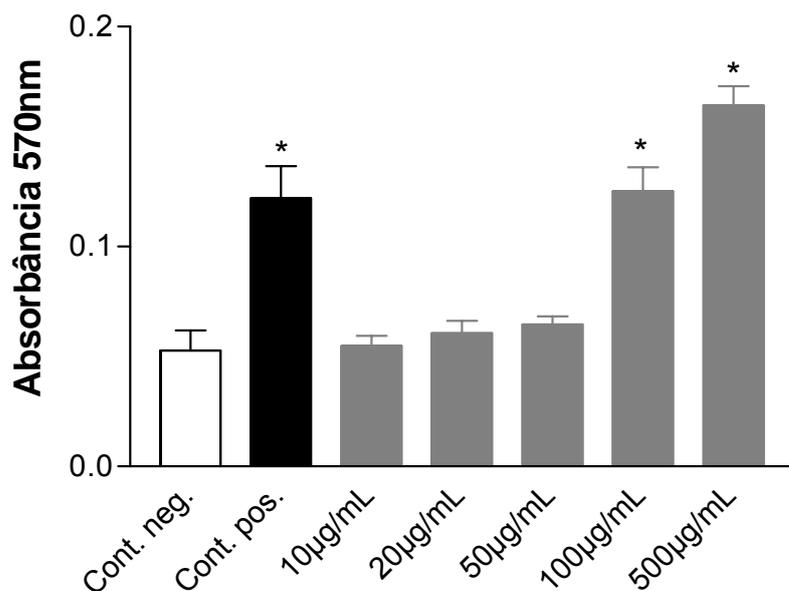


Gráfico 11: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase n-butanólica do extrato de *A. vera*. * $p < 0,05$, $n=3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

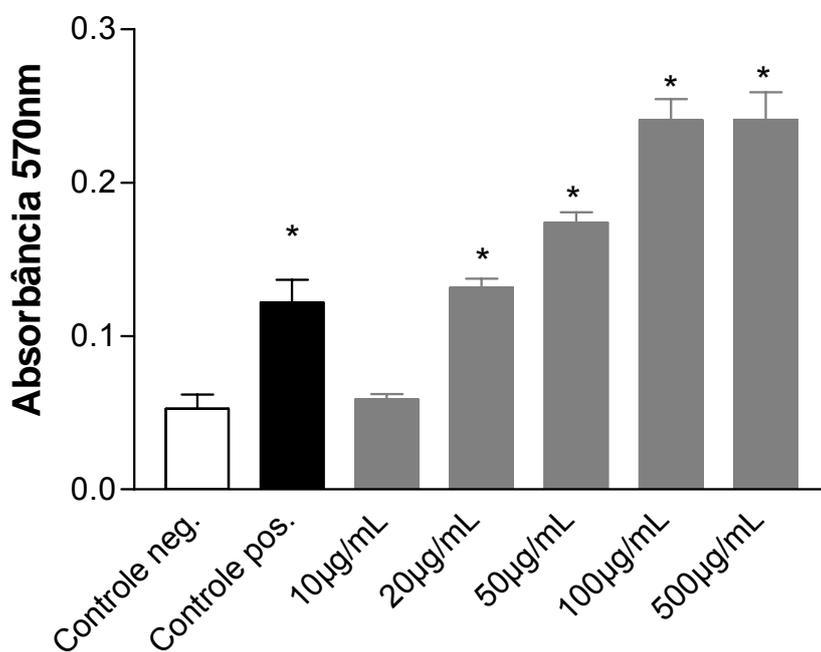


Gráfico 12: Proliferação da cultura de células mononucleares em diferentes concentrações da fase aquosa do extrato de *A. vera*. * $p < 0,05$, $n=3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

Tabela 1: Triagem fitoquímica do extrato etanólico de *A. vera* e de suas fases: +, presença; -, ausência do composto em questão

<i>Aloe vera</i> (L.)	Extrato etanólico	Fase hexânica	Fase clorofórmica	Fase Acetato etílica	Fase n- butanólica	Fase aquosa
Flavonóides	-	-	-	-	-	-
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Terpenos	+	+	+	-	-	-
Carboidratos	+	-	-	-	+	+
Aminoácidos	+	-	-	-	+	-

4.5-Resposta de células mononucleares de sangue periférico frente a proteína H-ras selvagem ou mutada e ao extrato de *Aloe vera* e suas frações

As figuras 13-16 mostram os resultados das culturas de células com o extrato e frações da planta em concentrações que não causaram proliferação significativa, juntamente com a proteína selvagem ou mutada. Como resultado, não houve proliferação celular significativa.

As células foram cultivadas por 3 e 5 dias, quando então foi testada a proliferação, e os resultados foram semelhantes.

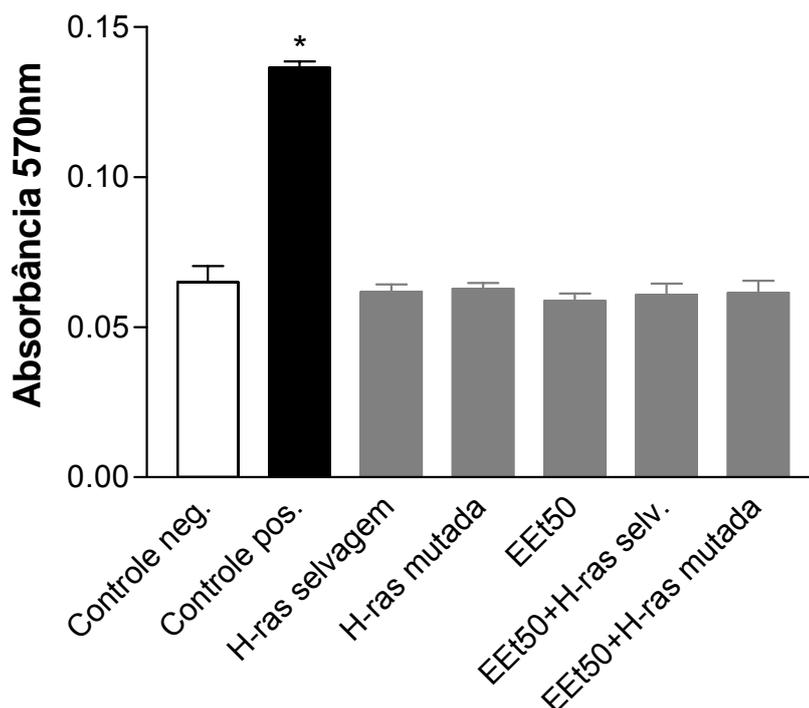


Gráfico 13: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e o extrato etanólico (EEt) (50µg/mL). * $p < 0,05$, $n = 3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

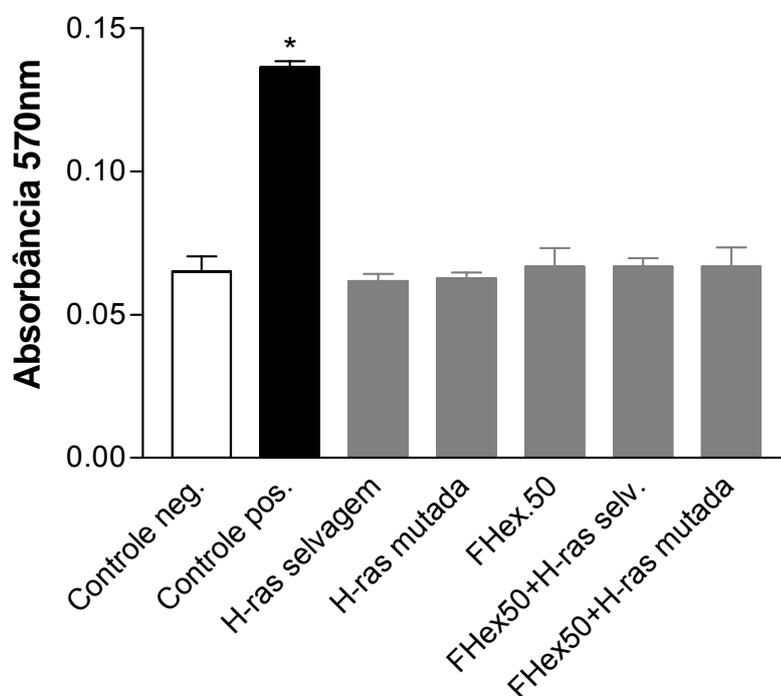


Gráfico 14: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase hexânica (FHex) do extrato de *A. vera* (50µg/mL). * $p < 0,05$, $n = 3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

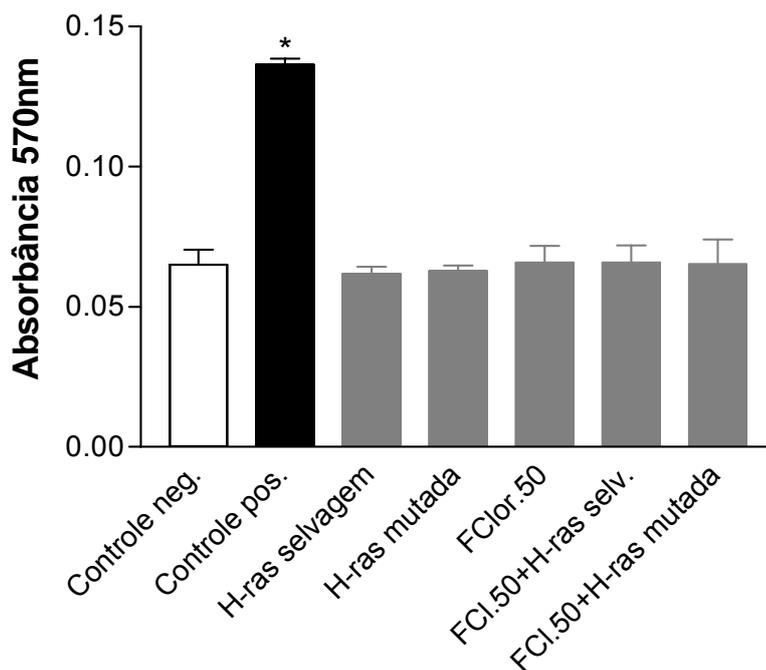


Gráfico 15: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase clorofórmica (FCl) do extrato de *A. vera* (50µg/mL). * $p < 0,05$, $n=3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

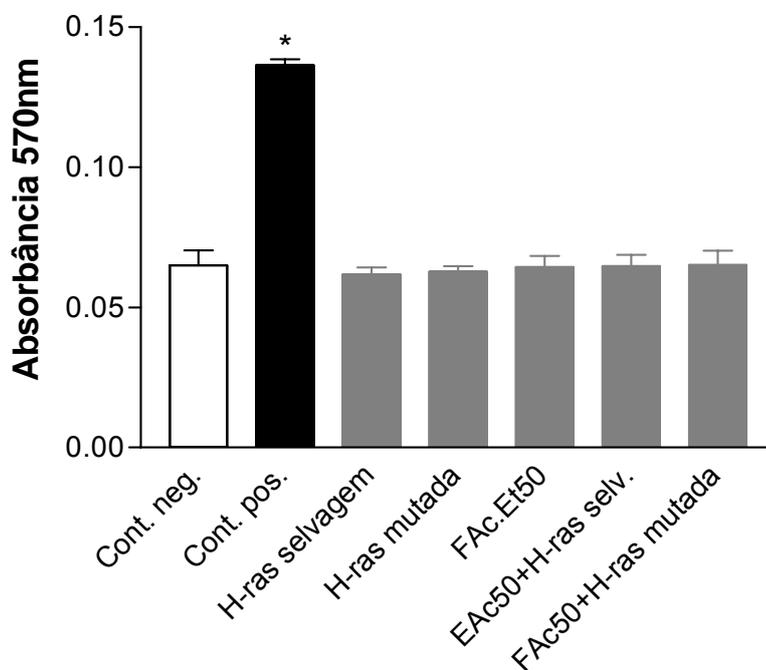


Gráfico 16: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase acetato de etila (FAc) do extrato de *A. vera* (50µg/mL). * $p < 0,05$, $n=3$. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

Por outro lado, os resultados mostram que quando as células foram cultivadas com as fases do extrato da planta em concentrações que por si só estimularam as células, quando cultivadas juntamente com a proteína mutada mostrou um incremento estatisticamente significativo na proliferação celular quando comparado com a cultura na presença apenas do respectivo extrato, o que não aconteceu em culturas nas mesmas condições em presença da proteína selvagem (Gráficos 17 e 18).

A cultura celular com a fase n-butanólica na concentração 100µg/mL foi capaz de induzir proliferação celular quando comparada com o controle negativo. A cultura celular com fase n-butanólica na concentração 100µg/mL mais a proteína H-ras selvagem não aumentou a proliferação significativamente quando comparada apenas com a cultura com 100µg/mL da fase n-butanólica do extrato. Porém, na cultura com a fase n-butanólica do extrato da planta na concentração anteriormente citada e com a proteína H-ras mutada (com valina substituindo glicina na posição 12) houve um aumento significativo da proliferação quando comparado com a cultura apenas com a referida fase do extrato. O mesmo aconteceu com a fase n-butanólica na concentração 500µg/mL (Gráfico 17). A comparação estatística é entre as barras com a mesma cor no gráfico.

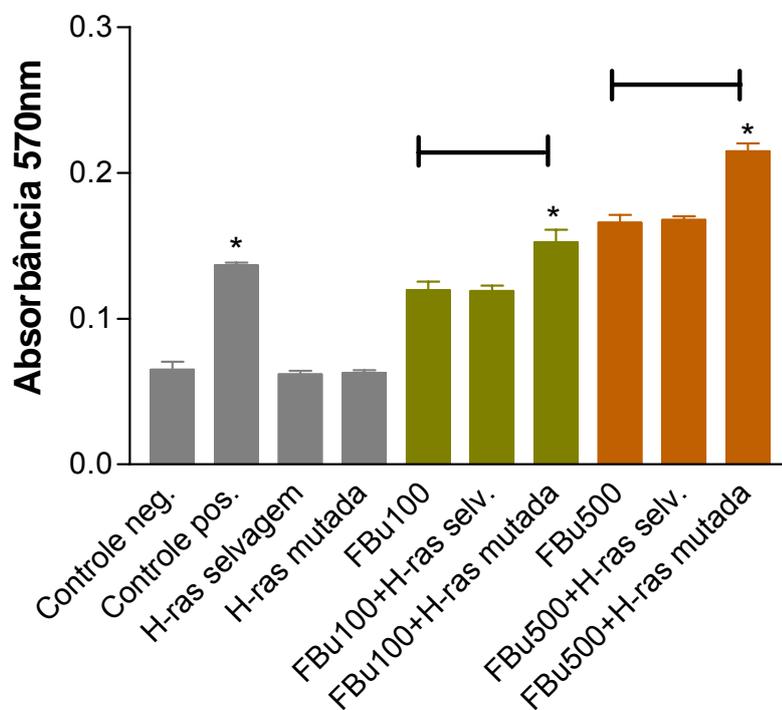


Gráfico 17: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase n-butanólica (FBU) do extrato de *A. vera* (100 e 500µg/mL). * $p < 0,05$, $n = 3$. A comparação estatística é entre as barras com a mesma cor. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

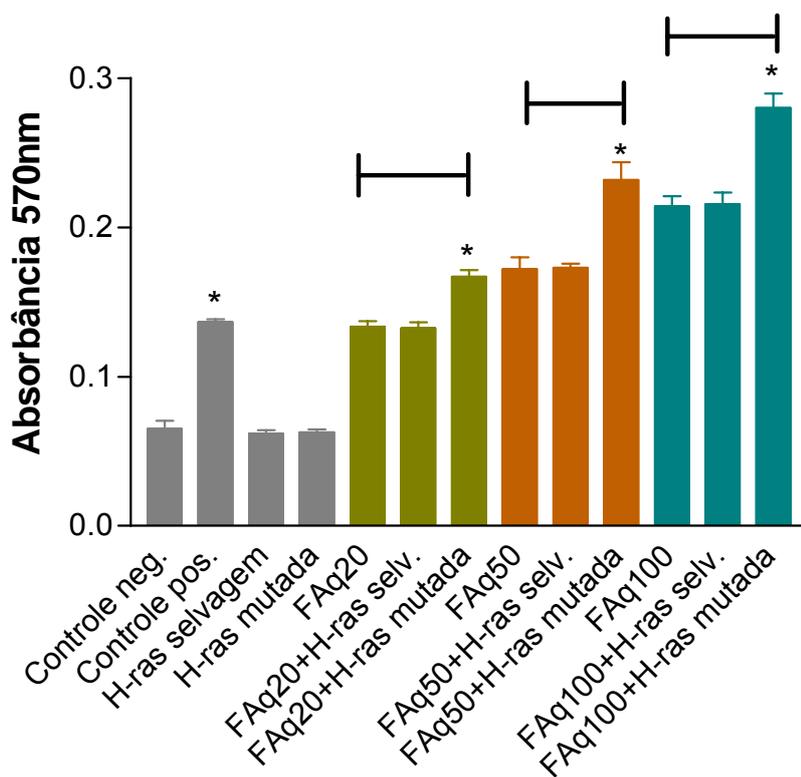


Gráfico 18: Proliferação da cultura de células mononucleares em presença da proteína H-ras selvagem ou mutada (50µg/mL) e a fase aquosa (FAq) do extrato de *A. vera* (20, 50 e 100µg/mL). * $p < 0,05$, $n=3$. A comparação estatística é entre as barras com a mesma cor. Controle negativo (célula + meio). Controle positivo (0.5µg/ml de micobactéria lisada).

5- Discussão

Dentre as doenças que mais matam no mundo certamente está o câncer. No ano 2000, ocorreram cerca de 10 milhões de novos casos de câncer e seis milhões de mortes por câncer em todo mundo (PARKIN, 2001; PISANI et al., 2002). Grandes esforços têm sido feitos para encontrar tratamentos adequados, que de preferência eliminem as células tumorais sem agredir as células saudáveis. A toxicidade das drogas quimioterápicas convencionais despertou o interesse para o direcionamento da resposta imunológica contra células tumorais.

Como o sistema imune humano é capaz de distinguir o que é próprio do organismo do que não é próprio, e como células tumorais podem dar origem a novos antígenos, estes aspectos têm sido bastante explorados em pesquisas que envolvem a erradicação de tumores por células do sistema imune (LEWIS; HOUGHTON, 1995). Também tem sido alvo de intensas investigações a capacidade que certos produtos naturais têm em melhorar esta resposta imune frente aos tumores (LEUNG et al., 2006).

Portanto, no presente trabalho foi estudado a resposta de células mononucleares (linfócitos B e T e monócitos), de sangue periférico humano quando estimulados com uma das proteínas H-ras selvagem e mutada. Estudou-se também a proliferação destas células quando expostas a diferentes concentrações do extrato etanólico de *Aloe vera* e de suas frações. Por fim, foi verificada a ativação das células quando estimuladas simultaneamente tanto com as proteínas supracitadas, quanto pelos extratos.

A expressão da proteína H-ras mutada desencadeia uma cascata de sinalização contínua que culmina com a proliferação celular exacerbada (SCHUBBERT et al., 2007). Em diversos tipos de tumores a H-ras encontra-se na forma mutada. Como a proteína H-ras mutada passa a ser estranha ao organismo, ela pode ser reconhecida como antígeno pelas células do sistema imunológico e desencadear a resposta imune (GAUDERNACK, 1996).

Para que a H-ras possa ser estudada neste aspecto, inicialmente teve-se que purificá-la em quantidade suficiente para a realização do estudo. Para

atingir tal meta foi necessário haver um sistema no qual ela pudesse ser expressa, extraída, purificada e identificada, além de ser preciso ser obtida com rendimento adequado.

A bactéria *Escherichia coli* têm sido bastante empregada em sistemas nos quais ela pode carregar plasmídeos portadores de genes que codificam proteínas de outras espécies. O gene *H-ras* tem sido expresso em *E. coli* com sucesso (FIGUEREDO DOS SANTOS, 1999; BEZERRA, 2004; CAMPBELL-BURK; CARPENTER, 1995; LACAL et al., 1984; DELOSKEY et al., 1994; TURKER et al., 1986). A proteína H-ras recombinante pode ser extraída e purificada a partir de cultura de *E. coli* utilizando-se cromatografia de troca iônica e cromatografia de gel filtração (FIGUEREDO DOS SANTOS, 1999; CAMPBELL-BURK; CARPENTER, 1995; DELOSKEY et al., 1994). Na primeira, a proteína liga-se a coluna cromatográfica através de sua carga, sendo eluída pela competição de íons na solução tampão que atravessam a coluna com gradiente crescente de concentração. Aqui várias proteínas que não se ligam à coluna saem sem serem coletadas, e proteínas que se ligam podem ser eluídas em frações distintas, de acordo com sua afinidade pela coluna. Na segunda, a proteína é separada das demais em função de seu peso molecular, pois quanto maior o peso, mais rápida a proteína é eluída da coluna (COLLINS et al., 1995).

Baseado nas confirmações acima se sugere que o adiantamento na eluição da proteína mutada em relação à selvagem se deva a presença do aminoácido valina em lugar de glicina. A valina tem radical que confere maior caráter de hidrofobia que a glicina promovendo assim, menor interação com o sistema de cromatografia utilizado.

Através da combinação destas técnicas pode-se chegar obtenção da proteína H-ras pura, cuja presença é confirmada por western-blot com anticorpo monoclonal específico (Y13-259) que reconhece os aminoácidos 63 a 73 (FIGUEREDO DOS SANTOS, 1999; CAMPBELL-BURK; CARPENTER, 1995).

No presente trabalho, tanto para a proteína selvagem quanto para a mutada, as frações na qual a proteína H-ras foi eluída da coluna de troca iônica parcialmente pura, sendo, portanto, necessária submeter essas frações a cromatografia de gel filtração para obtenção da proteína pura. A identificação

da proteína pura foi realizada com sucesso por método imunoblot através do anticorpo monoclonal Y13-259.

Numerosos métodos para determinar a quantidade de proteína presente na amostra têm sido desenvolvidos ao longo dos anos. Métodos colorimétricos para quantificação de proteínas são baseados no fato de certos íons metálicos e corantes ligam-se a proteínas em uma razão específica e estas ligações tornam-se intensamente coloridas. Dentro de uma faixa específica de concentração de proteína, estes reagentes desenvolvem uma coloração cuja intensidade é proporcional a concentração de proteína na amostra (PEREIRA, 1998).

Os principais métodos para dosagem de proteínas são: método do biureto, de Lowry e Bradford.

No método do biureto, as ligações peptídicas das proteínas (-CONH-) reagem com íons cúpricos, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta que é proporcional ao teor das proteínas no meio. A intensidade de absorção resultante do complexo proteína-cobre é diretamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra, obedecendo assim a lei de Lambert – Beer. O tartarato de potássio estabiliza o reagente e o iodeto de potássio previne sua auto-redução (COPELAND, 1994).

A faixa de detecção do método do biureto é eficiente entre 0,5 e 80mg de proteína/mL(COPELAND, 1994). Como os resultados com amostras sem diluição obtidos foram, 4,4 e 4,2 mg/mL para as proteínas selvagem e mutada, respectivamente, enquadrando na faixa confiável de detecção do método.

Atualmente, um dos grandes desafios da ciência é encontrar um tratamento para o câncer que não agrida as células normais ou o faça minimamente. Por isso, grandes esforços têm sido realizados e a manipulação do sistema imunológico neste sentido tem se mostrado promissor. Duas formas que serão abordadas aqui é a estimulação do sistema com antígenos tumorais, assim como a estimulação com substâncias oriundas de plantas.

Foi observado que o soro de pacientes com câncer contém anticorpos que reconhecem proteínas intracelulares codificadas por vários genes com expressão tumoral (BOON et al., 1997). Peptídeos da Ras que carregam mutações nas posições 12, 13 ou 61 são imunogênicos em humanos e foi extensamente demonstrado que linfócitos T são estimulados e respondem a

estes peptídeos mutados ou pela proteína mutada (PEACE et al., 1991; PEACE et al., 1993; FOSSUM et al., 1993; ABRAMS et al., 1995).

A proteína Ras tem sido alvo intenso de estudos na tentativa de usá-la como antígeno em tratamentos imunoterápicos, e resultados bastante promissores têm sido alcançados. Células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas contra peptídeos da proteína Ras mutada (com valina na posição 12) de pacientes saudáveis e/ou com câncer têm sido geradas depois de várias exposições a proteína. Estes linfócitos possuem a capacidade de gerar resposta imunológica, levando à morte as células tumorais. No caso dos pacientes, a resposta imune após introdução de células apresentadoras de antígeno cultivadas com o antígeno foi associada com o prolongamento da vida dos pacientes e uma grande infiltração de células T dentro do tumor (GJERTSEN et al., 1995; 1996 a; 1996b; 1996c; 1997).

Classicamente, antígenos endógenos são processados e apresentados na superfície da célula ligada a molécula MHC classe I para apresentação a linfócitos CD8⁺, enquanto antígenos exógenos são apresentados em moléculas MHC de classe II aos linfócitos CD4⁺. Os linfócitos só são capazes de reconhecer antígenos se estes estiverem ligados à moléculas MHC (GUERMONPREZ et al., 2002; TROMBETTA; MELLMAN, 2005). Quando a proteína H-ras é colocada na cultura de células mononucleares, ela precisa ser endocitada, degradada em peptídeos menores, a partir daí então ser expressa na superfície da célula ligada a moléculas MHC de células apresentadoras de antígenos. Desta forma ela pode ser reconhecida pelos linfócitos através de seus TCRs (receptores de linfócitos T) (FIGUEREDO DOS SANTOS, 1999).

Em nenhuma das concentrações estudadas (5, 10, 50, 100 e 300µg/mL), a proteína H-ras selvagem ou mutada ativou as células mononucleares de sangue periférico com uma única exposição em 3 ou 5 dias de cultivo celular, verificados através da proliferação celular.

Jung & Schluesener (1991) verificaram resposta imune frente a Ras através de ensaios de proliferação celular. Demonstraram que linfócitos de indivíduos saudáveis não proliferam em cultura quando estimulados uma única vez pelo peptídeo da ras mutado (12 glicina → valina). Porém, depois de sucessivos estímulos com a proteína mutada, os linfócitos são capazes de proliferarem. Eles verificaram ainda que não há proliferação das células

específicas anti-Ras mutada quando estimuladas pela proteína normal, indicando que não há reação cruzada entre as duas proteínas.

Com repetidas estimulações de células mononucleares de sangue periférico *in vitro*, clones de células T que reconhecem a Ras carregando mutações nas posições 12, 13 ou 61 podem ser gerados. A Ras pode ser apresentada aos linfócitos T por diversos tipos de moléculas MHC II (HLA-DR, -DP, -DQ). Estes linfócitos são capazes de responder posteriormente contra a proteína Ras ou células tumorais que carregam estas mutações (GEDDE-DAHL III et al 1992; FOSSUM et al 1993; GEDDE-DAHL III et al 1994; NGO-GIANG-HUONG et al., 1995).

Diante do exposto, verifica-se que as células normalmente não proliferam quando foram expostas a proteína H-ras normal. A não proliferação das células quando expostas à proteína H-ras mutada, provavelmente deve-se ao fato de ter sido a primeira e única vez de terem encontrado a proteína, e devido ao tempo de cultura.

Outra maneira de estimular o sistema imune é através de substâncias oriundas de plantas. Estas substâncias podem se ligar a receptores na superfície das células e desencadear uma resposta efetiva, podendo ativar o sistema imune para a destruição de patógenos (vírus, bactérias, fungos, parasitas) e de células tumorais. Nas plantas a principal classe de substância com esse efeito são os polissacarídeos (LEUNG et al., 2006).

Polissacarídeos de *Acanthopanax senticosus* são capazes de ativar linfócitos B, aumentando a proliferação e diferenciação, e macrófagos aumentando a produção de citocinas de maneira dose-dependente por ligarem-se e ativarem receptores toll-like dos tipos 2 e 4 na superfície destas células. Os polissacarídeos desta planta aumentam a produção de anticorpos IgM policlonais por linfócitos B, aumentam ainda a expressão e secreção de IL-1, IL-6, e TNF- α e da óxido nítrico sintase por macrófagos, mostrando que estes polissacarídeos são potentes estimuladores de linfócitos B e macrófagos (HAN et al., 2003).

Diversos parâmetros correlacionados são utilizados como padrão para avaliar a ativação das células e a resposta imune, sendo a proliferação celular uma das principais. Substâncias de plantas que induzem proliferação celular em cultura podem ser capazes de produzir diversos efeitos como aumento da

endocitose, da secreção de citocinas, da expressão de moléculas coestimulatórias, de moléculas MHC e na maturação de células, que culminam na modulação da resposta imunológica (LEE et al., 2001; HAN et al., 2003).

Para avaliar a ativação das células mononucleares quando expostas a diferentes concentrações do extrato de *Aloe vera* (L.) foi medida a proliferação celular pelo método do MTT. Este ensaio de proliferação baseia-se na redução metabólica do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) realizada pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase em um composto colorido, o formazan. A quantidade de células vivas é proporcional a quantidade de formazan produzido. Assim, quanto maior a absorbância em 570nm maior o número de células viáveis e, portanto, maior a proliferação celular (MOSMANN, 1983; LIU et al., 1997).

O extrato etanólico e as fases, hexânica, clorofórmica e acetato etílico não causaram proliferação significativa das células em nenhuma das concentrações estudadas (10, 20, 50, 100 e 500µg/mL). A fase n-butanólica causou proliferação celular significativa apenas nas concentrações 100 e 500µg/mL. Já a fase aquosa causou proliferação celular significativa nas concentrações 20, 50, 100 e 500µg/mL. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que quanto mais polar é a fração mais potente é a proliferação induzida.

Polissacarídeos de *A. vera* (L.) foram extensamente estudados por seus efeitos estimulantes no sistema imune contra tumores. Dentre estes efeitos está a capacidade de aumentar a proliferação de células do sistema imune (LEE et al., 2001). Estes polissacarídeos, principalmente β -mananos, são solúveis em água e estão presentes na fase aquosa do extrato da planta (NI et al., 2004; LEUNG et al., 2006).

A triagem fitoquímica realizada mostrou a presença de carboidratos no extrato etanólico e nas fases n-butanólica e aquosa. Observou-se também que quanto mais polar, menor a concentração da fase em que a resposta foi efetiva. Baseado em dados da literatura e o fato dos carboidratos estarem presentes nestas fases, eles podem ser os responsáveis pela resposta.

Polissacarídeos derivados de *Aloe vera* (L.) demonstraram ser potentes estimuladores de linfócitos B e T de murinos. Estes polissacarídeos têm atividade estimulatória em macrófagos de peritônio, pois quando injetados em

camundongos aumentam a migração de macrófagos para a cavidade peritoneal. Macrófagos quando tratados tem aumentada a expressão de MHC-II e FcγR (receptor de anticorpos), aumentada também a endocitose, a produção de óxido nítrico, a secreção de TNF-α e a citotoxicidade contra células tumorais (ZHANG; TIZARD, 1996; LIU et al., 2006). A ativação destas células por polissacarídeos pode aumentar o reconhecimento e a apresentação de antígenos tumorais (LIU et al., 2006).

Carboidratos de *Aloe vera* (L.) são conhecidos por suas atividades antiviral e anti-tumoral (in vivo) por ativar a resposta imune. Estes polissacarídeos induzem a maturação fenotípica e funcional de células dendríticas imaturas, assim como a proliferação de células esplênicas totais de camundongos. A maturação fenotípica foi demonstrada pelo aumento da expressão de moléculas MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias como B7-1, B7-2, CD40 e CD54; e a maturação funcional pela indução do aumento da proliferação de linfócitos T pelas células dendríticas, assim como aumento da produção de IL-12 por estas células (LEE et al., 2001).

Polissacarídeos pécticos de *Bupleurum falcatum* (L.) induzem o aumento da secreção de IL-6 por linfócitos B normais de murinos; o que por sua vez, de forma autócrina e parácrina, leva ao aumento da secreção de IgM (GUO et al., 2000). Estes polissacarídeos induziram a proliferação, sendo um potente mitógeno, e a maturação de linfócitos B de murinos in vitro e in vivo (SAKURAI et al., 1999).

A ativação de receptores toll-like por polissacarídeos estimula a resposta imune inata, que envolve a produção direta de moléculas efetoras antimicrobianas e aumenta a resposta imune adaptativa por induzir a produção de IL-1, IL-6, IL-12 e TNF-α que aumentam a imunidade mediada por célula e a resposta imune humoral (MODLIN, 2002). Baseado neste ponto de vista seria possível explorar a via de ativação dos receptores toll-like como um meio de induzir respostas imunes para o tratamento de doenças infecciosas e o câncer (HAN et al., 2003).

Nesse trabalho foi ainda observado que quando a cultura de células foi estimulada com a proteína H-ras mutada e com o extrato de *Aloe vera* (L.) ou suas frações (em certas concentrações) que sozinhos não estimularam as células, não houve proliferação adicional. Porém, quando as células foram

cultivadas com a proteína H-ras mutada junto com as frações de *Aloe vera* (L.) em concentrações que sozinhas estimularam as células, interessante, houve um aumento significativo na proliferação. É importante ressaltar que este efeito não foi observado com a proteína normal.

Sabe-se que quando endocitada, a H-ras pode ser degradada e seus peptídeos apresentados na superfície de células apresentadoras de antígenos em moléculas MHC a linfócitos (FIGUEREDO DOS SANTOS, 1999; ELSAS et al., 1995).

A habilidade que uma célula apresentadora de antígeno tem em ativar linfócitos T em uma resposta primária, depende da expressão de altos níveis de MHC II e de moléculas co-estimulatórias e da secreção de citocinas (AZUMA et al, 1993).

Para a adequada ativação de células T, são necessários tanto sinais originados da apresentação antigênica pelos receptores de células T quanto os sinais de moléculas coestimulatórias (SCHWARTZ, 1990).

Para que os linfócitos T possam tornar-se completamente ativados, eles requerem 2 sinais. O engajamento de receptores de linfócitos T (TCRs) com o peptídeo ligado a moléculas MHC fornece o primeiro sinal e a interação de moléculas CD28 em linfócitos com moléculas coestimulatórias B7 de células apresentadoras de antígenos (macrófagos, linfócitos B, células dendríticas) fornecem o segundo sinal (SCHWARTZ, 1996). Quanto maior a quantidade de moléculas coestimulatórias existentes na superfície da célula apresentadora de antígenos interagindo com o linfócito, menor será a quantidade de TCRs que terão que ser ativados pelo complexo MHC-peptídeo para ativar o linfócito T (VIOLA; LANZAVECCHIA, 1996).

Ao observar a diferença de comportamento das células do sistema imune quando expostas ao extrato da planta juntamente com a proteína selvagem ou mutada. Sugere-se que possa ter ocorrido aumento da endocitose e degradação da proteína H-ras com a exposição de peptídeos aumentada na superfície da célula ligada à molécula MHC classe II, estes eventos induzidos pelos extratos da planta. Dessa forma, apenas a proteína H-ras mutada pode apresentar resposta imunogênica ao sistema imune.

Como descrito anteriormente, o extrato de planta também pode aumentar a expressão de moléculas coestimulatórias na superfície da célula

apresentadora de antígeno, contribuindo ainda mais na ativação de linfócitos T (LEE et al, 2001; LIU et al, 2006).

Desta maneira, os dois sinais (MHC-peptídeo e moléculas coestimulatórias) das células apresentadoras de antígenos que são necessários para estimular os linfócitos T estão aumentados, o que pode ter aumentado ainda mais a proliferação das células. É importante lembrar que a proteína normal não constitui um estímulo a linfócitos por não ativar seus TCRs. Estes eventos podem, pelo menos em parte, ter contribuído para o aumento da proliferação.

Uma estratégia de vacina explora estes dois sinais dependentes que ativam diretamente as células T CD4⁺, através de uma construção que expressa as moléculas co-estimulatórias e os peptídeos antigênicos relevantes. Para o câncer de próstata, uma vacina que incorpora moléculas coestimulatórias (como B7-1) e antígenos que estimulam os receptores de células T foram desenvolvidos. Neste sentido vêm se desenvolvendo estudos pré-clínicos e clínicos de fase I e II (DRAKE, 2006).

A ativação completa de linfócitos T requer múltiplos sinais. A proteína K-ras mutada não é muito imunogênica quando nativa do próprio tumor, sendo baixa a frequência de reações imunes à K-ras mutada. Por isso para obtenção resposta satisfatória, os peptídeos são misturados com agentes imunoestimulantes (GJERTSEN et al., 2001). A mistura de peptídeos de tumores com agonistas de receptores toll-like são potentes indutores de resposta imunológica (RESCIGNO et al., 2007).

O reconhecimento de peptídeos da proteína mutada associada a MHC II pelos linfócitos T, somado ao aumento de moléculas coestimulatórias e da secreção de citocinas pelas APCs, e da estimulação direta dos próprios linfócitos pelo extrato, provavelmente devem ter sido fatores decisivos na resposta observada.

O incremento da resposta imune, medida através da proliferação celular, causada pelo extrato de *A. vera* frente à proteína H-ras mutada e não frente à proteína normal é interessante quando se pensa em imunoterapia, apesar dos resultados serem oriundos de estudos *in vitro*, e estarem longe de toda a complexidade dos sistemas *in vivo*. Porém, resultados sugerem perspectivas no que refere à abertura de novas possibilidades para o estudo e para o uso de

plantas medicinais ou de constituintes derivados destas. Assim, novas abordagens podem se abrir a partir de estudos sobre o desenvolvimento, assim como os mecanismos do tipo de resposta aqui obtido.

6-Conclusões

- As proteínas H-ras selvagem e mutada podem ser expressas em culturas de *Escherichia coli* e purificadas, utilizando-se colunas de troca iônica e de gel filtração;
- Células do sistema imune de sangue periférico humano são estimuladas a proliferarem significativamente com as fases n-butanol (100 e 500µg/mL) e aquosa (20, 50, 100 e 500 µg/mL) do extrato de *Aloe vera* (L.);
- Há uma ação de modulação positiva indicada pelo aumento significativo da proliferação das células do sistema imune quando foram cultivadas em presença das fases n-butanólica ou aquosa do extrato de *Aloe vera* (L.), em concentrações que sozinhas estimularam a proliferação, quando cultivadas juntamente com a proteína H-ras mutada,
- Resultado similar não foi observado nas culturas em presença dessas frações, com a proteína H-ras normal.

7-Referências

ABRAMS, S.I.; DOBRZANSKI, M.J.; WELLS, D.T.; STANZIALE, S.F.; ZAREMBA, S.; MASUELLE, L.; KANTOR, J.A.; SCHOLM, J. Peptide-specific activation of cytolytic CD4⁺ T lymphocytes against tumor cells bearing mutated epitopes of K-ras p21. **Europe Journal Immunology**. v. 25, p. 2588-2597, 1995.

ADAM, J.K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Immune responses in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 99, p. 113-132, 2003.

ADEREM, A., UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review in immunology**. v. 17, p. 593-623, 1999.

AZUMA, M.; ITO, D.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; PHILLIPS, J.H. B7 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. **Nature**. v. 366, p. 76-79, 1993.

BALLESTRERO, A.; BOY, D.; MORAN, E.; CIRMENA, G.; BROSSART, P.; NENCIONI, A. Immunotherapy with dendritic cells for cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, p. 173-183, 2008.

BEZERRA, V. S. **Expressões das proteínas p21 H-Ras humanas, recombinantes, normal (cH-Ras p21 G12G) e mutada (vH-Ras p21 G12C) a partir de *E. coli* W110 pelo método de indução com IPTG**. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal da Paraíba, 2004.

BOHN, J.A.; BE MILLER, J.N. 1→3 β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym.**, v. 28, p. 3-14, 1995.

BOON, T.; COULIE, P. G.; EYNDE, B.V. Tumor antigens recognized by T cells. **Immunology Today**. v. 18. n 6, p. 267-268, 1997.

BORCHERS, A.T.; STERN, J.S.; HACKMAN, R.M.; KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. Mushrooms, tumours and immunity. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 4, p. 281-293, 1999.

BOS, J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Research**, v. 49, p. 4682-4689, 1989.

BRISKIN, D.P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant. Physiol.**, v.124, p. 507-514, 2000.

BROMLEY, S.K.; BURACK, W. R.; JOHNSON, K.G.; SOMERSALO, K.; SIMS, T.N.; SUMEN, C.; DAVIS, M.M.; SHAW, A.S.; ALLEN, P.M.; DUSTIN, M.L. The immunological synapse. **Annual Review Immunology**. v. 19, p. 375-396, 2001.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPBELL-BURK, S.L; CARPENTER, W Refolding and purification of Ras protein. **Methods Enzymology**. v. 255, p. 1-13, 1995.

CAPEK, P.; HRIBALOVA, V. Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. **Phytochemistry**. v. 65, p. 1983-1992, 2004.

CHANG, L.; M. KARIN. Mammalian MAP kinase signaling cascades. **Nature**.v. 410, p. 37-40, 2001.

CHOI, S.; CHUNG, M. A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. **Seminars in Integrative Medicine**. v. 1, n.1, p. 52-63, 2003.

CHOW, J.T.; WILLIAMSON, D.A.; YATES, K.M.; GOUX, W.J. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. **Carbohydrate Research**. v. 340, p. 1131-1142, 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. **Editora Unicamp**. 6^a edição, São Paulo, 1995.

CONSTANT, S.L.; BOTTOMLY, K. Induction Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. **Annual Review Immunology**. v. 15, p. 297-322, 1997.

COPELAND, R.A. **Methods for protein analysis, a practical guide to laboratory protocols**. Chapman & Hall, New York, 1994.

DE PLAEN, E.; LURQUIN, C.; VAN PEL, A.; MARIAME, B.; SZIKORA, J.P.; WOLFEL, T.; SIBILLE, C.; CHOMEZ, P.; BOON, T. Immunogenic (tum⁻) variants of mouse tumor p815: cloning of the gene of tum⁻ antigen p91A and identification of the tum⁻ mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 85, p. 2274, 1988.

DELOSKEY, R.J.; DYK, D.E.V. AKEN, T.E.V.; CAMPBELL-BURK, S. Isolation and refolding of H-Ras from inclusion bodies of Escherichia coli: refold procedure and comparison of refolded and soluble H-Ras. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 311, n. 1, p. 72-78, 1994.

DRAKE, C.G. Basic overview of current immunotherapy approaches in urologic malignancy. **Urologic Oncology**. v. 24, p. 413-418, 2006.

ELSAS, A.V.; NIJMAN, H.W.; VAN DER MINNE, C.E.; MOURER, J.S.; KAST, W.M.; MELIEF, C.J.M.; ACHRIER. Induction and characterization of cytotoxic T-Lymphocytes recognizing a mutated p21Ras peptide presented by HLA-A*0201. **Int. J. Cancer**. v. 61, p. 389-396, 1995.

FIGUEREDO DOS SANTOS, C. **Indentification et caracterisation des epitopes naturels des proteines p21 Ras et etude des interactions peptides-molecules HLA-DR**. These de Doctorale, Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. l'Université Paul-Sabatier, Toulouse, 1999.

FOSSUM, B.; GEDDE-DAHL, T.; ERIKSEN, J.A.; THORSBY, E.; GAUDERNACK, G. Overlapping epitopes encompassing a point mutation (12Gly→Arg) in p21 ras can be recognized by HLA-DR, -DP and -DQ restricted T cells. **European Journal Immunology**. v. 23, p. 2687-2691, 1993.

FOSSUM, B.; OLSEN, A.C.; THORSBY, E.; GAUDERNACK, G. CD8⁺ T cells from patient with colon carcinoma, specific for a mutant-p21-ras-derived peptide (13Gly→Asp), are cytotoxic towards a carcinoma cell line harbouring the same mutation. **Cancer immunology Immunotherapy**, v. 40, p. 165-172, 1995.

FRIDAY, B.B.; ADJEI, A.A. K-ras as a target for cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1756, p. 127-144, 2005.

GARBAY, C.; LIU, W.; VIDAL, M.; ROQUES, B.P. Inhibitors of Ras signal transduction as antitumor agents. **Biochemical Pharmacology**. v. 60, p. 1165-1169, 2000.

GAUDERNACK, G. T cell responses against mutant ras: a basis for novel cancer vaccines. **Immunotechnology**, v. 2, p. 3-9, 1996.

GEDDE-DAHL III, T.; SPURKLAND, A.; ERIKSEN, J.A.; THORSBY, E.; GAUDERNACK, G. Memory T cells of a patient with follicular thyroid carcinoma recognize peptides derived from mutated p21 ras (Gln→Leu61). **Int. immunol.**, v. 4, p. 1331-1337, 1992.

GEDDE-DAHL III, T.; SPURKLAND, A.; FOSSUM, B.; WITTINGHOFER, A.; THORSBY, E.; GAUDERNACK, G. T cell epitopes encompassing the mutational hot spot position 61 of p21 ras. Promiscuity in ras peptide binding to HLA. **European Journal Immunology**. v. 24, p.410-414, 1994.

GJERTSEN, M.K., SAETERDAL, I., THORSBY, E., GAUDERNACK, G. Characterisation of immune responses in pancreatic-carcinoma patients after mutant-p21-ras peptide vaccination. **Brit. J. Cancer**, v. 74, p. 1828-1833, 1996c.

GJERTSEN, M.K.; BAKKA, A.; BREIVIK, J.; SAETERDAL, I.; GEDDE-DAHL III, T.; STOKKE, K.T.; SOLHEIM, B.G.; EGGE, T.S.; SOREIDE, O.; THORSBY, E.; GAUDERNACK, G. Ex vivo ras peptide vaccination in patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase-I/II study. **International Journal Cancer**, v. 65, p. 450-453, 1996a.

GJERTSEN, M.K.; BAKKA, A.; BREIVIK, J.; SAETERDAL, I.; SOLHEIM, B.G.; SAEREIDE, O.; THORSBY, E.; GAUDERNACK, G. Vaccination with mutant Ras peptides and induction of T-cell responsiveness in pancreatic-carcinoma patients carrying the corresponding *ras* mutation. **Lancet**, v. 346, p. 1399-1400, 1995.

GJERTSEN, M.K.; BJORHEIM, J.; SAERTEDAL, I.; MYKLEBUST, J.; GAUDERNACK, G. Cytotoxic CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, generated by mutant p21-Ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumor cells carrying this mutation. **International Journal Cancer**. v.72, p. 784-790, 1997.

GJERTSEN, M.K.; BUANES, T.; ROSSELAND, A.R.; BAKKA, A.; GLADHAUG, I.; SOREIDE, O.; ERIKSEN, J.A.; MOLLER, M.; BAKSAAS, I.; LOTHE, R.A.; SAETERDAL, I. GAUDERNACK, G. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. **Int. J. Cancer**. v. 92, p. 441-450, 2001.

GJERTSEN, M.K.; SAETERDAL, I.; BEISKE, K.; GAUDERNACK, G. Antigen-presenting function of human mesothelial cells isolated from a pancreatic-carcinoma patient after mutant-ras peptide vaccination. **Cancer immunology Immunotherapy**. v. 43, p. 262-268, 1996b.

GLASER, V. Billion-dollar market blossoms as botanicals take root. **Nat. Biotechnol.** v. 17 p. 17-18, 1999.

GOEDEGEBUURE, P.S.; EBERLEIN, T.J. The role of CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. **Immunology Research**. v.14, p.119-131, 1995.

GREENBERG, P.D. Adoptive T-cell therapy of tumours: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumour cells. **Advanced Immunology**, v. 49, p. 281-355, 1991.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGUEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review Immunology**. v. 20, p. 621-667, 2002.

GUO, Y.; MATSUMOTO, T.; KIKUSHI, Y.; IKEJIMA, T.; WANG, B.; YAMADA, H. Effects of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. on interleukin 6 production of murine B cells and B cell lines. **Immunopharmacology**. v. 49, p. 307-316, 2000.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annual Epidemiology**. v. 15, p. 686-699, 2005.

HAN, S.B.; LEE, C.W.; JEON, Y.J.; HONG, N.D.; YOO, I.D. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus lineus* on tumor growth and metastasis. **Immunopharmacology**. v. 41 (2), p. 157-164, 1999.

HAN, S.B.; PARK, S.H.; LEE, K.H.; LEE, C.W.; LEE, S.H. Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T-cells. **Int. Immunopharmacol.** v. 11, p. 1969-1978, 2001.

HAN, S.B.; YOON, Y.D.; AHN, H.J.; LEE, H.S.; LEE, C.W.; YOON, W.K.; PARK, S.K.; KIM, H.M. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. **International Immunopharmacology**. v. 3, p. 1301-1312, 2003.

HARRIS, C.; PIERCE, K.; KING, G.; YATES, K.M.; HALL, J.; TIZARD, I. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. **Molec. Biother.** v. 3, p. 207-213, 1991.

HEMMI, H.; KAISHO, T.; TAKEUSHI, O.; SATO, S.; SANJO, S. Small antiviral compounds activate immune cells via TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. **Nat. immunology**.v. 3, p.196-200, 2002.

HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G.D. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages.**Molecular immunology**. v. 40, p. 869-876, 2004a.

HERRE, J.; MARSHALL, A.S.; CARON, E.; EDWARDS, A.D.; WILLIAMS, D.L. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. **Blood**, v. 104, p. 4038-4045, 2004b.

HERRMANN, C. Ras-effector interactions: after one decade. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 13, p.122-129, 2003.

JEON, Y.J.; KIM, H.M. Experimental evidences and signal transduction pathways involved in the activation of NK-kappa B/Rel by angelan in murine macrophages. **Int. Immunopharmacol.** v. 1(7), p. 1331-1339, 2001.

JUNG, S.; SCHLUESENER, H.J. Human T lymphocytes recognize a peptide of single point-mutated, oncogenic ras proteins. **J. Exp. Med.** v. 173, p. 273-276, 1991.

KING, G.K.; YATES, K.M.; GREENLEE, P.G.; PIERCE, K.R.; FORD, C.R. The effects of acemannan immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** v. 331, p.439-447, 1995.

KORB, L.C.; MIRSHAHIDI, S.; RAYMAR, K.; AKHA, A. A. S.; SADEGH-NASSERI, S. Induction of T cell anergy by low numbers of agonist ligands. **Journal of Immunology.** v. 162, p. 6401-6409, 1999.

LACAL, J.C.; SANTOS, E.; NOTARIO, V.; BARBACID, M.; YAMAZAKI, S.; KUNG, H.; SEAMANS, C.; MCANDEW, S.; CROWL, R. Expression of normal and transforming H-Ras genes in *Escherichia coli* and purification of their encoded p21 proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 81, p 5305-5309, 1984.

LEE, J.K.; LEE, M.K.; YUN, Y.; KIM, Y.; KIM, J.S.; KIM, Y.S.; KIM, K.; HAN, S.S.; LEE, C. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **International Immunopharmacology.** v. 1, p. 1275-1284, 2001.

LEUNG, M.Y.K.; LIU,C.; KOON, J.C.M.; FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v.105, p. 101-114, 2006.

LEWIS, J.J.;HOUGHTON, A.N. Definitions of tumor antigens suitable for vaccine construction. **Seminars in Cancer Biology.** v. 6, p. 321-327, 1995.

LIU, C.; LEUNG, M.Y.K.; KOON, J.C.M.; ZHU, L.F.; HUI, Y.Z.; YU, B.; FUNG, K.P. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **International Immunopharmacology.** v. 6, p. 1634-1641, 2006.

LIU, Y; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry.** n.69, p. 581-593, 1997.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; ZIPURSKY, L.; DARNELL, J. Signaling pathways that control

gene activity: Receptor tyrosine kinases and activation of Ras. Em **Molecular cell biology**, Ed. W. H. Freeman, 5^a ed. p. 587-592, 2003.

LOWY, D.R.;WILLUMSEN, B.M. Function and regulation of Ras. **Annual Review Biochemical**. v. 62, p.851-891, 1993.

MAENTHAISONG, R.; CHAIYAKUNAPRUK, N.; NIRUNTRAPORN, S.; KONGKAEW, C. The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: a systematic review. **Burns**. v. 33, p. 713-718, 2007.

MANNA, S.;McANALLEY, B.H. Determination of the position of the O-acetyl group in a β -(1,4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**. v. 241, p.317-319, 1993.

MEANS, T.K.; GOLENBLOCK, D.T.; FENTON, M.J. Structure and function of Toll like receptors proteins. **Life Science**. v. 68, p. 241-58, 2000.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, Jr. C.A. A human homologue of the Drosophila Toll proteins signals activation of adaptive immunity. **Nature**. v. 388, p. 394-7, 1997.

MIDLEY, R.S.; KERR, D.J. Ras as a target in cancer therapy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 44, p. 109-120, 2002.

MITTAL, S.; MARSHALL, N.A.; BARKER, R.N.; VICKERS, M.A. Immunomodulation against leukemias and lymphomas: a realistic future treatment? **Criticals Reviews in Oncology/Hematology**. v. 65, p. 101-108, 2008.

MODLIN, R.L. Mammalian toll-like receptors. **Ann. Allergy, Asthma & Immun.** v. 88(6), p. 543-547, 2002.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **Journal Immunology Methods**. v. 65; 55-63; 1983.

MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; D'AMICO, G.; STOPPACCIARO, A. Differential expression and regulation of Toll-like

receptors (TLRs) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. **Journal immunology**. v. 164, p. 5998-6004, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal Natural Products**. v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NGO-GIANG-HUONG, N.; KAYIBANDA, M.; DEPREZ, B.; LEVY, J.; GUILLET, J.; TILKIN, A. Mutations in residue 61 of H-Ras p21 protein influence MHC class II presentation. **International Immunology**. v. 7; n. 2; p. 269-275, 1995.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K.M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**. v. 4, p. 1745-1755, 2004

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; THOMAZ-SCCOL, V.; OLIVEIRA, M.B.M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Mol. Cell. Biochem**. v. 233, p. 73-83, 2002.

OOI, V.E.; LIU, F. Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Curr. Med. Chem**. v. 7, p. 15-29, 2000.

PARKIN, D.M. Global cancer statistics in year 2000. **Lancet oncology**. v. 2, p. 533, 2001.

PEACE, D.J.; CHEN, W.; NELSON, H.; CHEEVER, M.A. T cell recognition of transforming proteins encoded by mutated ras proto-oncogenes. **The Journal of Immunology**. v. 146, n. 6, p. 2059-2065, 1991.

PEACE, D.J.; SMITH, J.W.; DISIS, M.L.; CHEN, W.; CHEEVER, M.A. Induction of T cells specific for the mutated segment of oncogenic p21ras protein by immunization in vivo with the oncogenic protein. **Journal Immunotherapy**. v. 14. p. 110-114, 1993.

PENG, S.Y.; NORMAN, J.; CURTIN, G.; CORRIER, D.; MCDANIEL, H.R.; BUSBEE, D. Decreased mortality of Normam Murine Sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. **Mol. Biother**. v. 3, p. 79-87, 1991.

PENG, Y.; ZHANG, L.; ZENG, F.;KENNEDY, J.F. Structure and antitumor activities of the water-soluble polissacharides from *Ganoderma tsuage* mycelium. **Carbohydr. Polym.** v. 59, p. 385-392, 2005.

PEREIRA, J.V. Bioquímica clínica. **Editora Universitária UFPB**. João Pessoa-PB. 1998.

PISANI, P.; BRAY, F.; PARKIN, D.M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **Int. J. Cancer.** v. 29, p. 72, 2002.

RAJALINGAM, K; SCHRECK, R.; RAPP, U.R.; ALBERT, S. Ras oncogenes and their downstream targets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1773, p. 1177-1195, 2007.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001

REID, D.M.; MONTOYA, M.; TAYLOR, P.R.; BORROW, P.; GORDON, S. Expression of the beta-glucan receptor, dectin -1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocytes interactions. **Journal Leukocytes Biology.** v. 76, p. 86-94, 2004.

RESCIGNO, M.; AVOGADRI, F.; CURIGLIANO, G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1776, p. 108-123, 2007.

RODRÍGUEZ, D.J.; HERNÁNDEZ-CASTILLO, D.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, R.; ANGULO-SÁNCHEZ, J.L. Antifungal activity in vivo of Aloe vera pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products.** v. 21, p. 81-87, 2005.

ROSCA-CASIAN,O.; PARVU, M.; VLASE, L.; TAMAS, M. Antifungal activity of Aloe vera leaves. **Fitoterapia.** v. 78, p. 219-222, 2007.

ROTHENBERG, M.E.; HOGAN, S.P. The eosinophil. **Annual Review Immunology.** v. 24, p. 147-174, 2006.

RUDOLPH, M.G.; STANFIELD, R.L.; WILSON, I.A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. **Annual Review Immunology**. v. 24, p. 419-466, 2006.

SAIMA, Y.; DAS, A.K.; SARKAR, K.K.; SEM, A.K.; SUR, P. Na antitumor pectic polysaccharide from *Ferinia limonia*. **International Journal Biology Macromolecule**, v. 27, p. 333-335, 2000.

SAKURAI, M.H.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. B cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. and its structural requirement. **Immunology**. v. 97, p. 540-547, 1999.

SCHEFFZEK, K.; AHMADIAN, M.R.; WIESMULER, L.; LAUTWEIN, A.; SCHMITZ, F.; WITTINGHOFER, A. The Ras-Gap complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. **Science**, v. 277, p. 333-338, 1997.

SCHUBBERT, S.; BOLLAG, G.; SHANNON, K. Desregulated ras signaling in developmental disorders: new tricks for an old dog. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 17, p. 15-22, 2007.

SCHWARTZ, R.H. A cell-culture model for T-lymphocyte clonal anergy. **Science**. v. 248, p.1349-1356,1990.

SCHWARTZ, R.H. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? **J. Exp. Med.** v. 184, p. 1, 1996.

SEEBURG, P.H.; COLBY, W.W.; CAPON, D.J.; GOEDDEL, D.V.; LEVEINSON, A.D. Biological properties of human c-Hs-ras 1 genes mutated at codon 12. **Nature**, v. 312, p. 71-75, 1984.

SHEETS, M.A.; UNGER, B.A.; GIGGLEMAN Jr. G.R.; TIZARD, I.R. Studies of the effect of acemannan on tetrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. **Mol. Biother.** v. 3, p. 41-45, 1991.

SHEN, M.L.; ZHAI, S.K.; CHEN, H.L.; LUO, Y.D.; TU, G.R. Immunopharmacological effects of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* on experimental animals. **Int. J. Immunopharmacol.** v. 13(5), p. 549-554, 1991.

SIBILLE, C.; CHOMEZ, P.; WILDMANN, C.; VAN PEL, A.; DE PLAEN, E.; MARYANSKI, J.L.; DE BERGEYCK, V.; BOON, T. Structure of the gene tumour transplantation antigen p198: a point mutation generates a new antigen peptide. **Journal. Exp. Med.** v.172, p. 35, 1990.

SONPAVDE, G.; SPENCER, D.M.; SLAWIN, K.M. Vaccine therapy for prostate cancer. **Urologic Oncology.** v. 25, p. 451-459, 2007.

STUELP-CAMPELO, P.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; LEÃO A.A.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **Int. Immunopharmacol.** v. 2, p. 691-698, 2002.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review Immunology.** v. 21, p. 335-376, 2003.

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **Intern. J. Biol. Macromol.** v. 34, p. 63-71, 2004.

TAYLOR, P.R., MARTINEZ-POMARES L., STACY, M., LIN, H.H., BROWN, G.D., GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review Immunology.** v. 23, p. 901-944, 2005

TROMBETTA, E.S.; MELLMAN, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. **Annual Review Immunology.** v. 23, p. 975-1028, 2005.

TURKER, J.; SCZAKIEL, G.; FEUERSTEIN, J.; JOHN, J.; GOODY, R.S.; WITTINGHOFER, A. Expression of p21 proteins in *Escherichia coli* and stereochemistry of the nucleotide-binding site. **The EMBO Journal.** v. 5, n. 6, p. 1351-1358, 1986.

VETTER, I.; WITTINGHOFER, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. **Science.** v. 294, p. 1299-1304, 2001.

VIOLA, A. and LANZAVECCHIA, A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable threshold. **Science.** v. 273, p. 104-106, 1996.

WALTER, E.A.; GREENBERG, P.D.; GILBERT, M.J.; FINCH, R.J.; WATANABE, K.S.; THOMAS, E.D.; RIDDELL, S.R. Reconstitution of cellular immunity against CMV in recipients of allogenic bone marrow by adoptive transfer of T-cell clones from the donor. **New England Journal Medicine**, v. 333, p.1038-1044, 1995.

WATTS, C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. **Annual review Immunology**. v. 15, p. 821-850, 1997.

WEST, A.P.; KOBLANSKY A.A.; GHOSH, S. Recognition and signaling by Toll-like receptors. **Annual Review of Cell and Development Biology**. v. 22, p.409-437. 2006.

WILLMENT, J.A.; LIN, H.H.; REID, D.M.; TAYLOR, P.R. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolissacharide. **Journal Immunology**. v. 171, p. 4569-4573, 2003.

WILLMENT, J.A.; MARSHAL, A.S.; DEID, D.M.; WILLIAMS, D.L.; WONG, S.Y.; GORDON, S. The human β -glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. **European Journal Immunology**. v. 35, p. 1539-1547,2005.

WOMBLE, D.; HELDERMAN, J.H. Enhancement of allo-responsiveness of human lymphocytes by acemannan. **Int. J. Immunopharmacol**. v. 10, p. 967-973, 1988.

WOMBLE, D.; HELDERMAN, J.H. The impact of acemannan on the generation and function of cytotoxic T-lymphocytes. **Immunopharmacol. Immunotoxicol**. v. 14, p. 63-77, 1992.

WU, J.H.; XU, C.; SHAN, C.Y.; TAN, R.X. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects af APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*. **Life Sciences**. v. 78, p. 622-630, 2006.

YAMADA, H.; KOMIYAMA, K.; KIYOHARA, H.; CYONG,J.C.; HIRAKAWA, Y., OTSUDA, Y. Structural characterization and tumor activity of a pectic polysaccharide from the roots of *Angelica acutiloba*. **Planta Medica**. v. 56, p. 182-186, 1990.

YATES, K.M.; ROSENBERG, L.J.; HARRIS, C.K.; BRONSTAD, D.C.; KING, G.K. Pilot study of the effect of acemannan in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 35, p. 177-189, 1992.

YORK, I.A.; ROCK, K.L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. **Annual Review Immunology**. v. 14, p. 369-396, 1996.

ZHANG, L.; TIZARD, I.R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. **Immunopharmacology**. v. 35, p. 119-128, 1996.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)