

CELSON TARSO RODRIGUES VIANA

**Avaliação da atividade antitumoral e
imunomodulatória de fração proteolítica do látex
de *Carica candamarcensis* Hook 1835 em modelo
de carcinoma de Ehrlich.**

Belo Horizonte, 2010

UFMG

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Avaliação da atividade antitumoral e
imunomodulatória de fração proteolítica do látex
de *Carica candamarcensis* Hook 1835 em modelo
de carcinoma de Ehrlich.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**Avaliação da atividade antitumoral e imunomodulatória
de fração proteolítica do látex de *Carica
candamarcensis* Hook 1835 em modelo de carcinoma
de Ehrlich.**

CELSON TARSO RODRIGUES VIANA

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia, nível mestrado da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre.

Área de Concentração: **Farmacologia**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miriam Teresa Paz Lopes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Mara Pinto Dabés
Guimarães

Belo Horizonte, Minas Gerais
Setembro, 2010

EPÍGRAFE

Amor de Índio

Compositor: Beto Guedes e Ronaldo Bastos

Tudo que move é sagrado
E remove as montanhas
Com todo cuidado, meu amor
Enquanto a chama arder
Todo dia te ver passar
Tudo viver a teu lado
Com o arco da promessa
Do azul pintado pra durar
Abelha fazendo mel
Vale o tempo que não voou
A estrela caiu do céu
O pedido que se pensou
O destino que se cumpriu
De sentir seu calor e ser todo
Todo dia é de viver
Para ser o que for e ser tudo
Sim, todo amor é sagrado
E o fruto do trabalho
É mais que sagrado, meu amor
A massa que faz o pão
Vale a luz do teu suor
Lembra que o sono é sagrado
E alimenta de horizontes
O tempo acordado de viver
No inverno te proteger
No verão sair pra pescar
No outono te conhecer
Primavera poder gostar
No estio me derreter
Pra na chuva dançar e andar junto
O destino que se cumpriu
De sentir seu calor e ser tudo

AGRADECIMENTOS

Durante o meu mestrado pude conviver com uma fascinante mistura de pessoas que me ensinaram muito e mantiveram meus dias congestionados da alegria. Agradecimentos nunca são suficientes, essa realização não é só minha é de todos vocês.

Agradeço

A minha mãe Maria Josina de Pinho Rodrigues, a quem eu nunca me canso de agradecer, que muito mais do que ter me dado a vida (até por que isso é bem fácil...) me ensinou o certo e o errado, a retidão, a ter caráter, enfim a viver dignamente (qualquer desvio de conduta, não foi culpa da minha mãe não!). Agradeço pelo apoio, por sempre acreditar em mim, por sempre me fazer sorrir, por sempre me dizer que eu sou inteligente e bonito entre outras mentiras, só pra me fazer sentir um pouco melhor. Obrigado por ser equilibrada, consciente, viva, decente, honesta e espiritualizada (até um pouco demais! De vez enquanto vê uns espíritos e coisa e tal). Você me fez querer continuar e lutar e persistir e caminhar, e cumprir, construir, edificar e transformar (Ah! Agora eu empolguei hein!). Obrigado por tudo.

A Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) pelo meu diploma de médico veterinário, aos professores desta instituição, os que me inspiraram (poucos...), o que me incentivaram (alguns....), que puxaram minhas orelhas (ih! aí foram muitos!). em especial quero citar alguns. A Prof^a. Dr^a. Maria Luzinete Alves Vanzeler por ter me encaminhado no caminho irreversível da Farmacologia. A Prof^a Alessandra Moresco por ter me iniciado na ciência, pela amizade e ajuda, e principalmente por ter me ensinado a usar o Portal Capes (Aham! Não esqueci! mudou a minha vida!!! Agora que estou escrevendo a dissertação acho que to precisando de mais umas aulas....). A Prof^a Dr^a Regina Paz, minha querida orientadora da iniciação científica, uma pessoa maravilhosa que me engrandeceu e me mostrou o que é fazer ciência, que me fez não parar, ir em frente sem

fraquejar. A Prof^a. Dr^a Adriane Jorge de Mendonça que me mostrou maravilhosos caminhos, uma pessoa admirada por todos pela sua dignidade, trabalho, retidão, honestidade, obrigado pelo exemplo. Sim, como eu poderia me esquecer de vocês, a todos os amigos que eu fiz durante os anos de graduação, obrigado por tudo e sinceramente torço para que um dia nos encontremos novamente.

À minha orientadora Professora Miriam Teresa Paz Lopes, grande responsável por este trabalho, sempre com seu olhos argutos e judiciosos (li isso em algum lugar, e sempre quis usar! Acho que foi num livro do Stephen King) agradeço pela confiança, orientação, atenção dispensada e principalmente por me aturar durante todo o período de mestrado, e aguentar a minha teimosia, tenho certeza que uma mula seria mais fácil. Acho que a única coisa em que concordamos é com relação a avalanche de casamentos que ameaça (isso mesmo! A-m-e-a-ç-a) o laboratório, afinal como ela mesmo já disse "o homem solteiro é um animal incompleto; o casado é um completo animal" você é demais, sou seu fã, adoro especialmente seu senso de humor refinado ou sarcasmo como preferirem, que nada mais é do que uma amostra de sua imensa inteligência e experiência de vida. Após tantos desgostos que eu te dei gostaria de lhe fazer uma pequena homenagem, outra frase que eu li em algum lugar "umas são mulheres, algumas professoras, poucas são mestres. As primeiras escuta-se, as segundas respeita-se, as últimas segue-se". Sou muito grato pelo aprendizado.

Ao Professor André Klein, uma pessoa alegre e inteligente a pessoa que deu o pontapé inicial para a realização deste trabalho e um dos grandes responsáveis por ele, e que talvez não saiba o quanto eu sou grato pela ajuda. Obrigado pela ajuda inestimável, pelo apoio, pelos ensinamentos e por tantas dúvidas tiradas.

A Professora Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães, uma pessoa maravilhosa, que me pegou de surpresa, pela simplicidade, humildade, competência e principalmente pelo seu coração tão sem maldade. Obrigado pela confiança,

conselhos e dedicação, muito obrigado por toda ajuda e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Professor Carlos Edmundo Salas Bravo, pelo apoio conselhos, confiança, orientação, amizade, criatividade e principalmente pela paciência!

A Professora Lucíola Silva Barcelos parecerista (se é que essa palavra existe!) do meu projeto de mestrado e grande colaboradora, pessoa presente em todas as etapas deste trabalho, além do grande auxílio durante as dosagens de citocinas, agradeço por todos os conselhos e dicas que muito contribuíram para a realização deste projeto.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT) que me receberam de braços abertos e permitiram que eu fizesse a minha bagunça, por terem caminhado comigo, e por protagonizarem essa etapa da minha vida, e como as vitórias só são completas quando compartilhadas, vamos, lá um por um.

Ao nosso mito vivo Ana Cândida Araújo e Silva, mais conhecida como Aninha (ou Caninha, é de cana mesmo, cana-de-açúcar!, cachaça tals), que me ajudou com todos os cálculos possíveis e imagináveis (ah! Inimagináveis também... número de Avogrado... hunf!) a minha cabeça ainda dói só de pensar em picograma, femtograma, decigrama e por aí vai, e principalmente tenho que agradecer a Ana por ter me ensinado uma das coisas mais importantes que eu aprendi nesse período, que foi como beber pinga, (é gente é isso mesmo! não é só abrir a garrafa e por na boca não!, existe uma técnica praticamente Jedi) conhecimento esse que um dia eu passarei adiante. Obrigado por estar sempre disposta a aconselhar, e também por ser um grande guia nessa caminhada.

A nossa ex-companheira Cinthia, que a pouco nos abandonou, minha companheira de eternos carnavais, passados no laboratório fazendo experimentos, e outros feriados também, obrigado pela amizade, pela confiança

construída, pela doçura e simpatia, pelas danças da macarena em cima da mesa (hehe!) e pelo apoio durante os experimentos, e inestimável contribuição para a realização desta obra.

Ao meu grande amigo Dalton Dittz, por sua natureza generosa e inconsequente, pela vivacidade e alegria, Ah!!! E pelas tardes de terapia ocupacional também, e principalmente pelas gotas de bom senso que sempre escorreram pelas rachaduras de seu reservatório que as vezes parecia ser infinito. Obrigado pela força.

A nossa querida aluna de iniciação científica Denise, sua participação foi imprescindível, nas intermináveis tardes fazendo ELISA e demais atividades deste trabalho, mas agradeço principalmente por encher meu dia com novidades! Valeu.

Ao nosso amigo de todas as horas Luiz Felipe, pessoa de ambições engraçadas, como participar do programa “O Aprendiz” ou ir trabalhar na Disney nas férias, ou ainda participar do circuito das estações adidas, uma pessoa repleta de pequenos sonhos que frequentemente reverberam pelo laboratório, afinal de contas, todos torcemos para que fosse selecionado no “O Aprendiz”, agradeço por toda ajuda e principalmente pelo seu otimismo.

A Fernanda ou Fêfê, como eu prefiro Fernandinha Jararaca, uma pessoa intelectualmente brilhante, de charme e carisma inigualáveis. Gostaria de agradecer principalmente pela convivência agradável. Obrigado por toda a ajuda nesse tempo de mestrado, pelo apoio, pela ajuda com a estatística, por tantas dúvidas tiradas. Sua ajuda foi imprescindível no desenrolar dessa pesquisa, obrigado pela presteza, simpatia, alegria e humildade.

A Kátia Michelle dos olhos sonhadores, a grande atração do laboratório, de shows inesquecíveis (até demais!!!) agradeço por todas as confusões criadas e por toda alegria proporcionada, ela é ótima companheira de trabalho, mas é uma excelente

companheira de festas principalmente inaugurações de copas e afins!!! Valeu, pelos experimentos realizados com todo carinho e dedicação.

Agradeço a Imaculada pelo companheirismo, colaboração, pela agradável colaboração nos experimentos, uma pessoa que participou em todos meus momentos no decorrer deste trabalho e que me ensinou muito, uma pessoa competente e centrada, um exemplo de pesquisadora. Valeu!

A nossa grande amiga Heveline (agora Professora Heveline!) pelo excelente convívio e pelos momentos felizes proporcionados a todos nós.

Ao Rogério pela colaboração e por toda ajuda na realização deste trabalho!

A nossa querida Luciana funcionária da universidade que como presente para nós veio parar no nosso laboratório, agradeço por me permitir conviver com a sua natureza generosa, alguém que ainda consegue perceber a doçura da vida. Agradeço pelos momentos de alegria que tivemos, que sempre me permitiam voltar a ser criança e abandonar todo cinismo que a idade adulta traz consigo.

As Secretárias da Pós graduação, Celinha e Cyntia por toda ajuda e por toda a gentileza que tiveram comigo.

A galera do B3, o corredor mais bombante do ICB, Giovani, Lívia, Luciana, Aline, Ana Flávia, Lindys, Rafael, Patrícia, Rafael (acho que tem mais gente, mas não me lembro agora). Ao pessoal do andar de cima Iva, Daniela Fóscolo, Onésia, Michelle, Maurão, Gustavo, Grazi, Ana Paula. A galera da Fesbinha Augusto, Gabriela, Carol.

A Universidade Federal de Minas Gerais e o Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, pela oportunidade e a CAPES, CNPq E FAPEMIG pelo apoio financeiro concedido.

“Ao infinito... e além”
(Buzz Lightyear, em Toy Story, 1995)

RESUMO

Avaliação da atividade imunomoduladora da fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* Hook F. 1875 em animais portadores do carcinoma de Ehrlich.

Introdução: Nosso grupo vem demonstrando que a fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* (P1G10), apresenta atividade antitumoral sobre o tumor ascítico de Ehrlich. Sabe-se que a imunossupressão provocada pelo tumor de Ehrlich tem papel chave em seu desenvolvimento. Neste trabalho visou-se avaliar o efeito da fração P1G10 sobre eventos relacionados à resposta imune de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich. **Métodos:** camundongas Swiss foram tratadas por 10 dias após a inoculação *i.p.* com 10^7 células de tumor de Ehrlich, e então foi realizada a punção do líquido ascítico para contagem do número de células. O sobrenadante do líquido ascítico foi utilizado para dosagem de TGF- β , TNF- α e VEGF, e sangue periférico foi utilizado para a contagem global e diferencial de leucócitos, e os fêmures foram extraídos para a contagem de células de medula óssea. Em um outro ensaio, após a inoculação das células tumorais ($10^7/100\mu\text{l}/\text{animal}$) em camundongas Balb/c, os animais foram tratados por 10 dias com P1G10 nas doses de 1 e 5 mg/kg ou PBS e imunizados com uma suspensão de hemácias de carneiro (2×10^6 células/ $100\mu\text{l}/\text{animal}$ s.c.) como antígeno, nos dias 1, 3, 7 e 10 do experimento. Após o tratamento, foram coletadas amostras de sangue para a determinação dos títulos de anticorpos contra hemácias de carneiro (IgG e IgM). Os baços foram coletados e a suspensão de linfócitos esplênicos incubada com P1G10 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$) ou concanavalina ($40\mu\text{g}/\text{mL}$) e, após 72h, foi quantificada a proliferação celular pelo método do MTT. **Resultados e Discussão:** Quando os animais foram tratados P1G10 (5mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente a celularidade presente no líquido ascítico ($6,31 \pm 0,70 \times 10^7$ células/ mm^3 , $p < 0,05$, ANOVA, pós teste Dunnet) em comparação com o grupo controle ($10,56 \pm 1,13 \times 10^7$ células/ mm^3 One Way ANOVA, pós teste de Dunnet) o grupo tratado com a dose 1mg/Kg não apresentou redução significativa ($10 \pm 3,7 \times 10^7$ cel/ml). Quando os animais foram

pré-tratados a fração P1G10 nas doses de 1 e 5 mg apresentaram uma redução da celularidade do líquido ascítico ($11,14 \pm 0,5^{***}$ e $10,64 \pm 0,33^{***} \times 10^7$ cel/ml respectivamente, controle $14,3 \pm 0,67 \times 10^7$ cel/ml, $p < 0,05$, ANOVA, pós teste Bonferroni). O tratamento com P1G10 promoveu aumento significativo dos níveis de VEGF (3mg/kg - $914,54 \pm 13,15^*$ pg/mL, 5 mg/kg - $931,98 \pm 16,03^{***}$ pg/mL, controle - $838,68 \pm 25,64$ pg/mL – ANOVA, pós teste Student Newman-Keuls). e uma redução dos níveis de TNF- α (3mg/kg - $22,30 \pm 2,78^*$, 5 mg/kg - $16,28 \pm 3,60^{***}$, controle $34,24 \pm 3,19$ pg/mL) e da fração ativa do TGF- β (5 mg/kg - $108,13 \pm 4,39^*$; controle - $96,34 \pm 4,18$ pg/mL). A administração de P1G10 promoveu uma leucocitose (Leucócitos totais -1mg/kg - $7,66 \pm 1,10^* \times 10^7$ cel/mm³, 3 mg/kg - $7,92 \pm 1,12^* \times 10^7$ cel/mm³, controle - $5,1 \pm 0,61 \times 10^7$ células/mm³ - One Way ANOVA, pós teste de Dunnett), por neutrofilia (1 mg/kg - $70,92 \pm 7,60^{***} \times 10^6$ células/mm³, 3 mg/kg - $58,71 \pm 11,33^* \times 10^6$ células/mm³, controle - $27,87 \pm 8,13 \times 10^6$ células/mm³, ANOVA, pós teste Dunnett), e diminuição do número de células da medula óssea (1mg/kg - $2,8 \pm 0,4^* \times 10^6$ células/mm³, controle - $4,3 \pm 0,7 \times 10^6$ células/mm³ $p > 0,05$, teste t de Student). Não foram observadas diferenças significativas nos títulos de anticorpos entre os grupos avaliados. Houve aumento significativo na metabolização do MTT com os linfócitos esplênicos dos animais tratados com a dose de 5mg/kg (DO - $0,42 \pm 0,01^*$; controle: $0,36 \pm 0,01$) ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$ – ANOVA, pós teste Student Newman Keuls). **Conclusão:** Dessa maneira, P1G10 se mostra capaz de inibir o crescimento tumoral do carcinoma ascítico de Ehrlich, quando os animais são tratados ou pré-tratados. Os dados sugerem que o tratamento com P1G10 apesar de não aumentar os níveis de anticorpos, tem uma ação sobre os níveis de citocinas e promove a proliferação de linfócitos e aumenta a quantidade de leucócitos, portanto sugerimos que a ação antitumoral ocorra, em parte, pela ação de P1G10 sobre a imunidade celular. **Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG e CAPES.

ABSTRACT

Evaluation of immunomodulatory activity of proteolytic fraction of latex from *Carica candamarcensis* Hook F. 1875 in animals with Ehrlich carcinoma.

Introduction: Our group have been demonstrated that proteolytic fraction of latex from *Carica candamarcensis* (P1G10) shows antitumor activity on Ehrlich ascites carcinoma. It is known that immunosuppression induced by Ehrlich carcinoma has a key role in its development. This work aimed to evaluate the effect of P1G10 fraction of events related to immune response in animals with Ehrlich ascites carcinoma. **Methods:** Swiss mice were treated for 10 days after inoculation *i.p.* with 10^7 Ehrlich cells, and then the puncture of ascitic fluid was performed to count the number of cells. The supernatant of the ascitic fluid was used for measurement of TGF- β , TNF- α and VEGF, and peripheral blood was used for counting total and differential leukocytes, and the femurs were taken for counting of bone marrow cells. In another test, after inoculation of tumor cells ($10^7/100\mu\text{l}/\text{animal}$) Balb/c animals were treated for 10 days with P1G10 at doses of 1 and 5 mg / kg or PBS and immunized with a suspension of sheep erythrocytes (2×10^6 cells/ $100\mu\text{l}/\text{animal}$, s.c.) like antigen on days 1, 3, 7 and 10 of the experiment. After treatment, blood samples were collected for determination of antibody amounts against sheep erythrocytes (IgG and IgM). The spleens were collected and the suspension of splenic lymphocytes were incubated with P1G10 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$) or concanavalin ($40\mu\text{g}/\text{mL}$) and after 72h, cell proliferation was measured by MTT method. **Results and Discussion:** When the animals were treated with P1G10 (5mg/kg), it was able to reduce the cellularity present in ascitic fluid significantly ($6,31 \pm 0,70 \times 10^7$ cells / mm^3 , $p < 0,05$, ANOVA, post test Dunnet) compared with the control group ($10,56 \pm 1,13 \times 10^7$ cells/ mm^3) but group treated with 1mg/kg dose showed no significant reduction ($10 \pm 3.7 \times 10^7$ cells / ml). When animals were pretreated with P1G10 doses of 1 and 5 mg showed a reduction in the cellularity of ascites fluid ($11,14 \pm 0,5^{***}$ and $10,64 \pm 0,33^{***} \times 10^7$ cells / ml respectively, control $14.3 \pm 0,67 \times 10^7$ cells / ml, $p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni posttest). Treatment with P1G10 promoted

the increase of VEGF levels significantly (3 mg / kg – $914,54 \pm 1315^*$ pg / mL, 5 mg / kg – $931,98 \pm 16,03^{***}$ pg / mL, control - $838,68 \pm 25,64$ pg / mL - ANOVA, post-test Student-Newman Keuls) and decrease levels of TNF- α (3mg/kg – $22,30 \pm 2,78^*$, 5 mg / kg – $16,28 \pm 3,60^{***}$, control $34,24 \pm 3,19$ pg / mL) and the fraction of active TGF- β (5 mg / kg – $108,13 \pm 4,39^*$; control – $96,34 \pm 4,18$ pg / mL). The administration of P1G10 promoted a leukocytosis (Leukocyte total -1mg/kg – $7,66 \pm 1,10^* \times 10^7$ cells/mm³, 3 mg / kg - $7.92 \pm 1.12^* \times 10^7$ cells/mm³, control – $5,1 \pm 0,61 \times 10^7$ cells/mm³ - One Way ANOVA, Dunnett post test), with neutrophilia (1 mg / kg – $70,92 \pm 7,60^{***} \times 10^6$ cells/mm³, 3 mg / kg – $58,71 \pm 11,33^* \times 10^6$ cells/mm³, control – $27,87 \pm 8,13 \times 10^6$ cells/mm³, ANOVA, Dunnett post test), and decreased number of bone marrow cells (1mg / kg – $2,8 \pm 0,4^* \times 10^6$ cells / mm³, control – $4,3 \pm 0,7 \times 10^6$ cells/mm³ $p > 0,05$, Student t test). There were not significant differences in antibody levels between evaluated groups. There were significant increase in the metabolism of MTT with splenic lymphocytes from animals treated with a dose of 5mg/kg (OD - $0.42 \pm 0.01^*$; control: 0.36 ± 0.01) (* $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ - ANOVA, Student Newman Keuls post test). **Conclusion:** Thus, P1G10 shown capable of inhibiting tumor growth of Ehrlich ascites carcinoma, when the animals are treated or pre-treated. The data suggest that treatment with P1G10 while not increasing the levels of antibodies, has an action on the levels of cytokines and promotes lymphocyte proliferation and increases the amount of leukocytes, therefore we suggest that the antitumor action occurs, in part, by P1G10 action of the cellular immune system. **Financial Support:** CNPq, FAPEMIG and CAPES.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL - microlitro

µL - microlitros

µm - micrômetro

ANOVA - analysis of variance

APS - amônio persulfato

ATV – Associação de tripsina e versene

BAPNA - N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroaniline

CAE – carcinoma ascítico de Ehrlich

CNV – concanavalina A

D.O - densidade óptica

Da - dalton

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Deoxyribonucleic acid

DTT - Dithiothreitol

e.p.m.- erro padrão da média

EBSS - Earle's balanced salt solution

EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid - ácido etilenodiamino tetra-acético.

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FBS – Fetal bovine serum (fetal bovine calf serum)

g - grama

G - gravidade

h - hora

HRP - horseradish peroxidase

HTAB - Brometo de hexa – 1,6 - bisdeciltrimetilamônio

i.p.- intraperitoneal

IAA - iodoacetamida

IC- concentração inibitória

IFN- g- Interferon-gamma

IgG – imunoglobulina G

IgM - imunoglobulina M

IL-1 – interleucina 1

IL-2 – interleucina 2

kDa – quilodalton

kg – quilograma

L-10 – interleucina 10
L-6 – interleucina 6
M – Molar
mA - miliampere
mg – miligrama
MHC - major histocompatibility complex
min - minuto
mL- mililitros
mM- milimolar
mm³ – milímetros cúbicos
MMS - miracle mineral solution
MTT- 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2*H*-brometo de tetrazolium
N – normal
NK – Natural Killer
nm – nanômetro
°C - graus celsius
OPD- o-fenilenodiamina
P.A. - Padrão Analítico
PBS - phosphate buffered saline
PGE – prostaglandina E
PGE₂ – prostaglandina E₂
pH – potencial hidrogeniônico
rpm - rotações por minuto
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
s.c - subcutâneo
SDS - dodecilsulfato de sódio
SDS-Page - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SRBC - Sheep Red Blood Cells
TEMED- Tetramethylethylenediamine
TGF β – Transforming growth factor beta
TMD - 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina
TNF α - Tumor necrosis factor- alpha
Tris - tris(hidroximetil)aminometano
UV – ultravioleta
V - volts
V.T - volume tumoral
VEGF – Vascular endothelial growth factor
W - watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil cromatográfico representativo do látex ativado na coluna “Sephadex G-10”.	56
Figura 2. Perfil eletroforético de diferentes amostras de látex de <i>C. candamarcensis</i> e Fração P1G10 em gel SDS/PAGE 12% em condições desnaturantes.	56
Figura 3. Avaliação do volume tumoral de animais portadores do tumor de Ehrlich sólido tratados com a fração P1G10.	57
Figura 4. Avaliação da massa tumoral de animais portadores do tumor de Ehrlich sólido e tratados com a fração P1G10	58
Figura 5. Avaliação da atividade antitumoral da fração P1G10 contra carcinoma de Ehrlich ascítico.	59
Figura 6. Representação gráfica segundo Kaplan-Méier das curvas de sobrevivência dos grupos de animais inoculados com o carcinoma ascítico de Ehrlich e tratados com PBS (controle) ou P1G10 (1, 3, 5 mg/Kg).	61
Figura 7. Avaliação <i>in vitro</i> do efeito citotóxico de P1G10 contra células carcinoma de Ehrlich	62
Figura 8. Efeitos do tratamento com P1G10 sobre a quantidade e o tipo de leucócitos periféricos em animais inoculados com o tumor de Ehrlich ascítico.	63
Figura 9. Efeito do tratamento com a fração P1G10 de <i>C. candamarcensis</i> sobre o número de células em medula óssea de camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich ascítico.	65
Figura 10. Determinação dos níveis de citocinas no sobrenadante do líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico, tratados com a fração proteolítica P1G10.	67
Figura 11. Determinação imunoenzimática de IgM (A) e IgG (B) em animais portadores do carcinoma de Ehrlich tratados com a fração P1G10.	68
Figura 12. Avaliação da resposta proliferativa de P1G10 sobre linfócitos esplênicos de animais portadores do carcinoma de Ehrlich tratados com fração proteolítica.	70
Figura 13. Efeito do pré-tratamento com fração P1G10 sobre o número de células tumorais de animais portadores de carcinoma de Ehrlich ascítico.	71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Justificativa	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Materiais	28
3.1.1 Equipamentos	28
3.1.2 Kits e anticorpos	29
3.1.3 Reagentes químicos	29
3.1.3 Soluções	30
3.1.3.1 Soluções utilizadas na obtenção e análise bioquímica do látex de <i>Carica candamarcensis</i>	30
3.1.3.2 Soluções utilizadas no preparo do antígeno de membrana de hemácias de carneiro	33
3.1.3.3 Soluções utilizadas na resposta linfoproliferativa	35
3.1.3.4 Soluções utilizadas na reação de ELISA para a detecção de IgG e IgM	36
3.1.3.5 Soluções utilizadas na reação de ELISA para a detecção de VEGF, TNF- α e TGF- β	38
3.1.4 Biológicos	39
3.1.5 Materiais diversos	39
3.2 Métodos	41
3.2.1 Obtenção e purificação das frações do látex de <i>Carica candamarcensis</i>	41
3.2.2 Determinação da concentração protéica	41
3.2.3 Determinação da atividade proteolítica específica	42
3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	43
3.2.5 Manutenção do tumor	44
3.2.6 Preparo das células tumorais para inoculação	44
3.2.7 Avaliação da atividade antitumoral de P1G10 contra carcinoma de Ehrlich em sua forma sólida	45
3.2.8 Avaliação da atividade antitumoral da fração P1G10 contra carcinoma de Ehrlich ascítico	46
3.2.9 Avaliação do efeito de P1G10 sobre a sobrevivência de animais portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich	46

3.2.10 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do Sal de Tetrazolium (MTT)	46
3.2.11 Contagem global de leucócitos	47
3.2.12 Confeção de esfregaço sanguíneo e coloração das lâminas	48
3.2.13 Contagem diferencial de leucócitos	48
3.2.14 Determinação do número de células da medula óssea	48
3.2.15 Dosagens dos níveis séricos das citocinas VEGF, TGF- β e TNF- α	48
3.2.16 Avaliação do efeito de P1G10 sobre a resposta humoral de animais portadores de carcinoma de Ehrlich ascítico	50
3.2.17 Avaliação da atividade proliferativa de P1G10 sobre linfócitos obtidos de animais portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich	52
3.2.18 Avaliação da atividade antitumoral em animais portadores do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica quando estes são pré tratados com a fração P1G10.	53
3.3 Análise estatística	53
4. RESULTADOS	55
4.1 Obtenção e caracterização da fração P1G10	55
4.2 Avaliação da atividade antitumoral de P1G10 contra carcinoma de Ehrlich em sua forma sólida	57
4.3 Avaliação da atividade antitumoral da fração P1G10 contra carcinoma de Ehrlich ascítico	58
4.4 Avaliação do efeito de P1G10 sobre a sobrevivência de animais portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich	60
4.5 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do Sal de Tetrazolium (MTT)	61
4.6 Contagem global e diferencial de leucócitos	63
4.7 Determinação do número de células da medula óssea	65
4.8 Dosagens dos níveis séricos das citocinas VEGF, TGF- β e TNF- α	66
4.9 Avaliação do efeito de P1G10 sobre a resposta humoral de animais portadores de carcinoma de Ehrlich ascítico	68
4.10 Avaliação da atividade proliferativa de P1G10 sobre linfócitos obtidos de animais portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich	69
4.11 Avaliação da atividade antitumoral em animais portadores do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica quando estes são pré tratados com a fração P1G10.	70
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO	82
7. REFERÊNCIAS	83

1. Introdução

As neoplasias, ou cânceres, representam um conjunto de doenças responsáveis por sete milhões de mortes anuais, ou seja, 12,5% de todos os óbitos no mundo. No Brasil, as neoplasias estão em segundo lugar como causa de mortalidade geral (15,1%), superadas apenas pelas doenças cardiovasculares (31,6%) e à frente das causas externas (14,6%). A compreensão dos mecanismos básicos envolvidos no crescimento tumoral é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, especialmente para as formas mais avançadas da doença para as quais as opções atuais têm impacto limitado sobre sua progressão (TORREZINI e ATHANAZIO, 2007).

No momento, o tratamento farmacológico do câncer se faz principalmente com o uso de agentes citotóxicos que atuam promovendo alterações na estrutura ou quebra de DNA (alquilantes, antibióticos citotóxicos, antimetabólitos etc.), exceção feita aos agonistas e antagonistas de hormônios, que são classificados como moduladores da proliferação celular. Dessa maneira, aqueles quimioterápicos atuam, preferencialmente, sobre células em divisão, não afetando as capacidades de invasão e metástase que o tumor albergue. Em função do modo de ação desses fármacos, ocorrem com alta frequência efeitos tóxicos sobre os tecidos normais em divisão. Por outra parte a busca de fármacos que apresentem atividade antimetastática, ou seja, que impeçam a colonização de novos tecidos, e/ou que apresentem a capacidade de estimular o sistema imunológico a combater a progressão tumoral talvez fosse vantajoso para um tratamento antitumoral mais seguro (CALABRESI et al., 2003; BEUTH, 2010).

No início do século XX, em 1909, Paul Ehrlich propôs o papel do sistema imune no controle do crescimento de tumores, porém o estágio de desenvolvimento experimental da imunologia naquela época não permitiu a comprovação científica da hipótese. Na década de 1950, Macfarlane Burnet e Lewis Thomas formalizaram a hipótese da imunovigilância, sugerindo inclusive que a principal vantagem evolutiva da imunidade celular seria o controle do crescimento neoplásico nos organismos multicelulares. Um requisito para a aceitação da hipótese seria a observação experimental de que animais

imunodeficientes apresentam incidência maior de neoplasias. Inicialmente, estudos em camundongos atímicos não mostraram um aumento na incidência de tumores espontâneos ou induzidos, o que relegou o conceito de imunovigilância ao abandono pela comunidade científica por pelo menos duas décadas (TORREZINI e ATHANAZIO, 2007).

A imunomodulação é um mecanismo fisiológico de regulação da resposta imunológica via mecanismos supressores e estimuladores. A exacerbação das respostas imunes é definida como imunoestimulação e implica diretamente na estimulação do sistema imune e potencialização da resposta de defesa. Ao contrário, a imunossupressão implica, principalmente, no decréscimo da atividade do sistema imune, ocorrendo devido a uma gama de fatores genéticos, ambientais e terapêuticos, favorecendo o estabelecimento de infecções (ZANDONAI, 2007).

Considerando a necessidade de equilíbrio entre as duas atividades para o funcionamento imunológico normal, desde a década de 80 a identificação e caracterização de compostos naturais com atividade imunomodulatória tem se apresentado como área de interesse científico. Vários compostos têm sido utilizados como agentes imunomodulatórios, incluindo adjuvantes naturais, agentes sintéticos e anticorpos reagentes. Contudo grande parte desses compostos apresenta limitações quanto ao uso devido ao risco de infecções e desenvolvimento de auto-imunidade (ZANDONAI, 2007).

A identificação e caracterização de compostos naturais com atividade imunomodulatória abrem uma possibilidade de uso para a medicina moderna. Estudos realizados com *Phellodendri cortex*, demonstraram que esta planta possui uma atividade imunoestimulante sobre linfócitos B, e ainda a partir de atividade popularmente conhecida na medicina tradicional indiana, o extrato alcoólico de *Mangifera indica* Linn, popularmente conhecida no Brasil como mangueira, mostrou atividade imunomodulatória com estimulação dose dependente (ZANDONAI, 2007).

No desenvolvimento de neoplasias, o papel da imunidade celular durante os primeiros estágios da tumorigênese permanece controverso. No entanto, existem fortes evidências sobre a sua importância na progressão e disseminação do câncer. Em pacientes com câncer imunossuprimidos, freqüentemente há relatos de recorrência ou de tumores secundários, sendo

isto um sinal clínico que suporta esta hipótese. Muitos estudos têm demonstrado a deficiência da resposta imune em pacientes diagnosticados com câncer avançado. Diversos mecanismos de escape da vigilância imune têm sido descritos, incluindo a imunoseleção de variantes tumorais antígeno-negativas, a baixa regulação da expressão do MHC (complexo de histocompatibilidade) de classe I, células T supressivas, e a produção de citocinas e outros fatores imunossupressivos (BOTTI et al., 1998).

Um grande número de citocinas, hormônios e outras substâncias secretadas pelos tumores têm demonstrado propriedades imunomoduladoras. A maior parte dos estudos sobre as moléculas imunossupressoras secretadas pelos tumores aponta como responsáveis o fator de crescimento beta (TGF- β), a interleucina 10 (IL-10), e a prostaglandina E₂ (PGE₂) (WOJTOWICZ-PRAGA, 1997).

A carência da resposta imune antitumoral em pacientes com câncer e em modelos tumorais murinos, freqüentemente, não se deve a ausência de antígenos tumor-específicos, mas a defeitos na regulação imune. A grande questão é como os tumores podem crescer na presença de uma imunidade antitumoral. O principal mecanismo é a produção de citocinas imunossupressivas pelas células tumorais ou a indução de tais fatores em células infiltradas nos tumores. Têm sido documentadas muitas linhagens de células tumorais que constitutivamente produzem o fator de crescimento beta (TGF- β), interleucina 10 (IL-10) ou prostaglandina E₂ (PGE-E₂) (KUPPNER et al., 1990; TORRE-AMIONE et al., 1990; MAXWELL et al., 1992; BOMSTEIN et al., 1993). Ensaios *in vitro* têm demonstrado que estas moléculas inibem as células natural killer (NK) ou a célula mediadora de citotoxicidade linfocitária, ou inibem a produção de IL-2 pelos linfócitos T (ROOK et al., 1986; KUPPNER et al., 1990). O TGF- β , em particular, talvez tenha um papel chave na imunossupressão induzida pelo tumor. Essa citocina é a mais potente imunossupressora descrita até o momento, e tem sido constantemente isolada de uma variedade de linhagens celulares tumorais, e no plasma de portadores de tumor (WOJTOWICZ-PRAGA, 1997).

Um grande avanço no estudo dos tumores tem sido utilizar métodos experimentais, onde são usados tumores transplantáveis ou transmissíveis. O

estudo de neoplasias em modelos animais facilita a avaliação e melhor compreensão da imunologia dos tumores, ao mesmo tempo em que constituem instrumento apropriado para a investigação de efeitos imunomoduladores de substâncias com potencial antineoplásico (SEGURA, 2000). Dentre esses tumores de animais, mantidos em laboratório, pelo transplante de células tumorais a hospedeiros susceptíveis, temos como exemplo, o tumor de Ehrlich (DAGLI, 1992).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, é correspondente a um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906. Originalmente, de crescimento sólido foi convertido na forma ascítica por Loewenthal e Jahn em 1932 e, desde então, é estudado na forma sólida, quando as células são inoculadas no tecido subcutâneo, ou na forma ascítica, quando inoculado na cavidade peritoneal (EHRlich, 1906; LOEWENTHAL e JAHN 1932; KLEIN e KLEIN, 1956).

Segundo DAGLI (1992) a avaliação histológica do tumor de Ehrlich na forma sólida pode ser descrita como: células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares. Este tumor é considerado pouco imunogênico por não expressar MHC de classe I durante o seu crescimento. Caracterizado por levar à baixa resposta de linfócito T a mitógenos e a uma progressiva perda na atividade de célula NK (natural killer) do baço. Além disso, o tumor na forma sólida provoca no hospedeiro uma acentuada esplenomegalia, hematopoiese esplênica e desenvolvimento de células supressoras (SEGURA et al., 1997; MORALES et al., 1999; BERGAMI-SANTOS et al., 2004).

SEGURA e colaboradores (1997) mostraram que o tumor de Ehrlich na forma ascítica induziu uma redução no número de linfócitos TCD4⁺ no baço e o total destas células expressando IFN- γ . Outra observação foi o aumento de macrófagos e células CD18, sugerindo uma modulação da resposta de linfócitos Th1. Estes dados sugerem que os linfócitos são previamente ativados, porém estes não migraram para o local do tumor, favorecendo o crescimento do mesmo. Os autores acreditam que a retenção dos linfócitos

ativados no baço pode ser explicada pelo aumento de macrófagos supressivos, que liberam substâncias inibitórias ao sistema imune como PGE2 ou pela produção de TGF- β pelo próprio tumor, que leva à inibição da ativação de células T. Nesse estudo também foi verificado um aumento no número de linfócitos B.

A influência do crescimento tumoral na proliferação e diferenciação das células pluripotentes e nas células progenitoras da medula óssea tem sido sugerida por inúmeras observações. Como muitos outros tumores experimentais, o tumor de Ehrlich produz alterações severas no sistema hematopoético do hospedeiro, sendo frequentemente associadas com imunodepressão, anemia, trombocitopenia e leucocitose granulócito-dependente (PARHAR e LALA, 1985, 1988; NELSON et al., 1990; PARKER e PRAGNELL, 1995). Estes eventos resultariam da produção de fatores solúveis pelas células tumorais ou da interação entre a célula imunocompetente-célula tumoral (BROXMEYER, 1987; KOBARI et al., 1990; BONTA e BEM-EFRAIM, 1993). Utilizando a técnica de cultura de células precursoras mielóides em meio semi-sólido, KEEB e LALA (1978) demonstraram uma diminuição das células da medula óssea comprometidas com o desenvolvimento de colônias de granulócitos-macrófagos em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Além disso, PESSINA et al. (1982) estudaram os efeitos de fatores produzidos por macrófagos e células tumorais de Ehrlich sobre as células precursoras granulocíticas-macrofágicas. Neste sentido, prostaglandinas da série E (PGE), particularmente PGE2, e TGF- β , produzidos por diferentes populações de células com atividade supressora, incluindo a própria célula tumoral, estariam associados aos mecanismos de imunossupressão da medula óssea (WALKER et al., 1994; YOUNG et al., 1996; ELEXPURU et al., 1997). Estes fatos são particularmente importantes ao se considerar que o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich provoca uma reação inflamatória local, altera padrões de migração celular, além de estimular/ativar macrófagos. Na verdade, a intensidade da reação inflamatória provocada pelas células tumorais é de fundamental importância na evolução do crescimento tumoral (BONTA e BEM-EFRAIM, 1993; BARTH e MORAHAN, 1994).

Há algum tempo, dados de literatura vêm mostrando o uso terapêutico de proteases na oncologia, seja como fármaco principal ou como adjuvante.

Misturas enzimáticas contendo papaína, tripsina e quimiotripsina demonstraram ter eficácia clínica atuando como supressores tumorigênicos, reduzindo disseminação metastática e aumentando o tempo de sobrevida ou mesmo aliviando os efeitos adversos gerados pelo tratamento convencional e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (LEIPNER e SALLER, 2000). Isto aparece como um paradoxo, já que a literatura descreve inúmeros exemplos de proteinases com atividade pro-carcinogênica. Entretanto, a maioria desses exemplos se referem a metaloproteinases e algumas cisteino-proteinases de ocorrência em vertebrados (MOHANAM et al., 2001, ROUSSELET, et al., 2004; EGEBLAD et al., 2005).

Existem evidências de que pequenas diferenças entre as cisteino-proteinases de ocorrência em vertebrados e as cisteino-proteinases de plantas sejam responsáveis por estes efeitos contrapostos. Um possível mecanismo de ação das cisteino-proteinases vegetais sobre tumores seria o de atuar sobre o balanço entre protease e inibidores de proteases (DESSER et al., 1993). Na mesma linha, outros autores afirmam que as proteases exógenas possam induzir a síntese de inibidores que inativam proteases endógenas, que participam do processo de metástase (SLOANE et al, 1986; KEPRELA, 2001).

Outro possível mecanismo de ação das proteases no câncer é através da modulação da expressão de moléculas de adesão CD44 presentes na superfície de células tumorais, envolvidas no processo de metástase. Estudos *in vitro* demonstram uma queda na expressão dessas moléculas em células B16F10 (melanoma murino) na presença de papaína e bromelaína (WALD et al, 2001). Animais tratados com a fastuosaína, outra cisteíno proteinase apresentaram uma redução da expressão de CD44 e redução da invasão medida através de matrigel (GUIMARÃES-FERREIRA et al., 2007). Sabe-se, também, que as proteases levam à diminuição dos níveis séricos de TNF- β cuja função é estimular a síntese de DNA de forma dose-dependente assim como, promover imunossupressão; com isso o tumor deixa de ser alvo do sistema imune (SILVA, 1999). Apesar de haver estudos sobre as formas de atuação das proteases no câncer, o mecanismo de ação não está completamente elucidado.

A bromelina, uma mistura de cisteíno-proteases, modula as respostas imunológicas e já tem sido proposta sua utilização para o uso clínico.

A bromelina aumenta a ativação de células T e a produção de TNF- α , IL1, IL-6 e IFN- γ -dependente, em células mononucleares de sangue periférico humano (DESSER et al., 1993), ativa macrófagos e monócitos e também foi demonstrado que a bromelina inibe a resposta das células T (MYNOTT, 1999).

Estudos demonstraram que a bromelina remove receptores específicos da superfície celular incluindo CD44, CD45RA, CD6, CD7 e CD8 com aumento da expressão do MHC de classe I (HALE et al., 1992), porém a forma como ela exerce este efeito estimulatório e inibitório sobre o sistema imune permanece desconhecida. Estudos preliminares (ROWAN et al., 1990) já indicavam que os efeitos imunoestimulatórios e inibitórios podem ser atribuídos as cisteíno-proteases que constituem a bromelina.

1.1 Justificativa

Nos últimos 10 anos, nosso grupo vem estudando as propriedades bioquímicas e farmacológicas de cisteíno-proteases derivadas do látex de *Carica candamarcensis*. Duas dessas possuem propriedade mitogênica em células de mamíferos (GOMES et al, 2010). Uma fração menos purificada (P1G10), contendo essas proteases, apresenta interessante atividade cicatrizante sobre dermoabrasões (MELLO et al., 2006) e queimaduras em camundongos, além de atividade citoprotetora/cicatrizante gástrica em ratos (MELLO et al., 2008) (Patente – USPTO, 11/378.196 “*Proteases from Carica having mitogenic activity and their methods of use*” publicado 17/03/2006, USA). Além disso, pudemos demonstrar o envolvimento de P1G10 no processo inflamatório, uma vez que a administração local induziu efeito edematogênico dose dependente, tendo como mediadores envolvidos histamina, serotonina e prostaglandinas e a administração sistêmica apresentou efeito antiedematogênico. O pré-tratamento sistêmico com P1G10 inibiu o recrutamento celular para a cavidade peritoneal induzido pela carragenina, e ainda, a administração da fração em implante subcutâneo de esponja promoveu aumento da vascularização e da quantidade de macrófagos na mesma (Christiano, 2008).

Constatamos que a fração P1G10 possui baixa toxicidade aguda, não altera a atividade das P450, não apresenta efeito mutagênico, medido pelo teste Ames e teste de micronúcleo, em concentrações que garantem sua

aplicação terapêutica com margem de segurança por diferentes vias de administração (VILLALBA et al., 2007). O estudo farmacocinético, em andamento, mostra que por diferentes vias de administração se obtém níveis de eficácia farmacológica. Já foram obtidas formulações de liberação controlada em β -ciclodextrina (DENADAI et al., 2006) e inclusão em lipossomas, além dos resultados dos estudos clínicos de fase I como cicatrizante cutâneo. A intenção do grupo é de viabilizar os estudos clínicos (fases II-III) e registro na ANVISA inicialmente, como cicatrizante cutâneo e a *posteriori*, como cicatrizante gástrico.

Paralelamente às atividades descritas acima, a atividade antitumoral e antimetastática da fração P1G10 também estão sendo avaliadas. Resultados obtidos com a utilização de um modelo tumoral de melanoma murino B₁₆F₁ inoculados no flanco de camundongos C57BL6 evidenciam uma redução estatisticamente significativa no peso do tumor para o grupo tratado com P1G10 na dose de 5 mg/kg ($0,25 \pm 0,21$ g) em relação aos grupos controle (solução salina) ($2,74 \pm 0,70$ g) e P1G10 1 mg/kg ($1,99 \pm 0,87$ g). Contraditoriamente ao observado em tecido não transformado, P1G10 mostrou ação antiangiogênica sobre o tumor de melanoma murino.

Já, em modelo metastático, utilizando melanoma B16F10 inoculados nas orelhas de camundongos C57BL6, foi observada uma redução de 45% no número de animais com metástases pulmonares no grupo que recebeu 1 mg/kg de P1G10 quando comparado ao grupo controle, bem como, uma redução no número de pontos de metástase (FIGUEREDO et al., 2007). Em um trabalho que participou nosso grupo temos demonstrado que a atividade antitumoral-antimetastática pode ser ampliada para outras cisteíno proteinases de plantas como, por exemplo, a bromelina (BAEZ et al., 2007).

Considerando que outras cisteíno proteases, vêm demonstrando atividades antiinflamatória, antitumoral e imunológica (BEUTH et al., 2008) e com base em resultados prévios mostrando que P1G10 possui atividade antitumoral sobre melanomas, acreditamos que essa fração possa exercer sua ação antineoplásica sobre outros tumores de diferentes origens embrionárias. Além disso, por termos sugerido o envolvimento da fração no processo inflamatório no que se refere à migração de leucócitos, é nossa hipótese que pelo menos uma das formas de ação antitumoral de P1G10 seja através da

modulação da atividade do sistema imune, o qual pode desencadear mecanismos de morte das células tumorais. Assim, é nossa finalidade, neste trabalho, avaliarmos as atividades antitumoral e imunomodulatória de P1G10 através de um modelo que cause alterações no sistema imune do hospedeiro, o carcinoma de Ehrlich.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar a atividade antitumoral da fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* (P1G10) e sua ação sobre a imunidade celular e humoral de camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade antitumoral da fração em animais portadores do tumor de Ehrlich em sua forma sólida e ascítica.
2. Avaliar a sobrevivência de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com diferentes doses (1, 3 e 5 mg/kg) de P1G10.
3. Avaliar os efeitos de P1G10 sobre a resposta imunológica inespecífica celular através da contagem global e diferencial de leucócitos.
4. Avaliar os efeitos de P1G10 sobre os níveis das citocinas TNF- α , VEGF e TGF- β .
5. Avaliar os efeitos de P1G10 sobre a resposta imunológica humoral de animais portadores de tumor de Ehrlich, em sua forma ascítica.
6. Determinar se a fração P1G10 altera o número total de células da medula óssea em animais portadores do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica.

3. Material e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

- **Consul - Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, SP, Brasil** - Refrigerador ajustado à temperatura de 4°C; freezer à temperatura de -20°C.
- **Fanem, São Paulo, SP, Brasil** – Banho-maria calibrado a 37°C, centrífuga Excelsa 2 modelo 205 N.
- **Fisher Scientific, California, EUA** - Ultra-sonicador modelo FS-28H.
- **Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil** - Agitador magnético modelo 252.
- **Janke & Kunkel IKA, Labortenik, Alemanha** - Homogeneizador Ultra-turrax.
- **Mettler Micronal Instrumentos S/A, São Paulo, SP, Brasil** - Balança eletrônica analítica modelo MT-200.
- **Milipore Corporation, Bedford, EUA** - Deionizador de água por meio de osmose reversa.
- **Nevoni Equipamentos Médicos e Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil** - Bomba aspirante modelo “H”.
- **Novatécnica Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil** - Medidor de pH modelo NT-PH2 - equipado com eletrodo modelo V-620 C - Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- **Nuaire Equipaments, Pymouth, Minneapolis, EUA.** Estufa incubadora 36,5 °C, atmosfera controlada e contendo 2,5% CO₂ (v/v).
- **Olympus Corporation, New York, EUA.** Microscópio ótico linha CB, microscópio ótico invertido modelo CK2.
- **Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão.** Espectrofotômetro de duplo feixe para faixas UV (ultravioleta) e visível modelo UV-150-02.

- **Spectramax Plus, Molecular Devices, CA, EUA** - Leitor de microplacas de ELISA.
- **Thermolyne, Dubuque, Iowa, EUA** - Shaker Roto Mix modelo 48200.
- **Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, Campinas, SP, Brasil** - Capela com fluxo laminar de ar ultrafiltrado.

3.1.2 Kits e anticorpos

- **R & B Systems, Minneapolis, EUA** - Kits de imunoensaio DuoSet ® VEGF, TNF- α , TGF- β anti-mouse.

3.1.3 Reagentes químicos

- **Amershan Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra** – Soro Fetal Bovino (FBS).
- **Bristol-Meyes-Squibb Indústria Farmacêutica S/A, São Paulo, SP, Brasil** – Anfotericina B.
- **Calbiochem, St. Diego, EUA** – Albumina de soro bovino tipo V.
- **Gibco-BRL Corporate Headquarters, Gaithersburg, EUA** – Meio de cultura RPMI – 1640 desidratado.
- **Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, SP, Brasil** – Solução aquosa de tripsina (ATV).
- **Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil** – Peróxido de hidrogênio, cloreto de potássio, dihidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, polioxietilinsorbitano monolaurato (Tween 80).
- **Laboratórios Wyeth-Whitehall, São Paulo, SP, Brasil** - Ampicilina sódica.
- **Merck, Darmstadt, Alemanha** - Bicarbonato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), etileno-diamino-tetracetato dissódico dihidratado (EDTA), etanol

absoluto, fosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico e dibásico de sódio, triton X-100.

- **Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA** - Ácido cítrico monohidratado, brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio ou sal de tetrazólio (MTT), *Earle's balanced salt solution* (EBSS), estreptomicina, ácido clorídrico, hepes, ácido sulfúrico, Brometo de hexa – 1,6 - bisdeciltrimetilamônio (HTAB), iodoacetamida (IAA), o-fenilenodiamina (OPD), 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB), dodecilsulfato de sódio (SDS).
- **White Martins do Brasil S/A, Contagem, MG, Brasil** - Nitrogênio líquido.

3.1.3 Soluções

3.1.3.1 Soluções utilizadas na obtenção e análise bioquímica do látex de *Carica candamarcensis*

Tampão acetato de sódio 1,0 M pH 5,0:

Acetato de sódio.....136,08 g

Água destilada q.s.p.1000,00 mL

O pH foi ajustado para 5. A partir da diluição desta solução foi obtido o tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5.

Solução de EDTA 500 mM:

EDTA.....37,22 g

Água destilada q.s.p.200,00 mL

O EDTA foi completamente dissolvido em 180 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 1,0 M e o volume completado para 200 mL.

Solução de cisteína 200 mM:

Cisteína.....12,10 g

Água destilada q.s.p.500,00 mL

Tampão de ativação (Tampão acetato de sódio 1 M, cisteína 25 mM, EDTA 10 mM e DTT 5 mM)

Cisteína 200 mM	40,00 µL
EDTA 500 mM	4,00 mL
DTT.....	160,00 mg
Tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) q.s.p.....	200,00 mL

Solução de BAPNA 100 mM

BAPNA.....	90,00 mg
DMSO.....	2,00 mL

Esta solução foi mantida a -20°C até o momento de uso.

Solução de Ácido Acético 60% (v/v)

Ácido Acético PA.....	60,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução para o gel separador desnaturante 12% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v)	1,20 mL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8; 0,4 % SDS (p/v)	750,00 µL
Água deionizada	1,02 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	25,00 µL
TEMED	5,00 µL

Solução para o gel concentrador desnaturante 5% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v).....	166,80 µL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v)	250,00 µL
Água deionizada	571,20 µL
Solução aquosa de APS 10% (p/v).....	10,00 µL
TEMED	2,00 µL

Solução para gel separador ácido não desnaturante 7,5% pH 4,3

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v).....	1,25 mL
Ácido acético glacial P.A.....	170,00 µL
Solução de hidróxido de potássio 1 M.....	430,00 µL
Água deionizada.....	3,05 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v).....	70,00 µL
TEMED.....	30,00 µL

Solução fixadora para géis

Metanol P.A.....	50,00 mL
Ácido acético glacial P.A.....	10,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução de azul-brilhante de coomassie para coloração de géis

Corante azul-brilhante de Coomassie G-250.....	125,00 mg
Ácido acético glacial P.A.....	10,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução descorante de géis

Metanol P.A.....	5,00 mL
Ácido acético glacial P.A.....	7,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução tampão de amostra eletroforese desnaturante

Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v).....	700,00 µL
Glicerol.....	300,00 µL
SDS.....	100,00 mg
Azul de bromofenol.....	0,12 mg

Tampão de corrida eletroforese desnaturante

Tris base.....	755,00 mg
Glicina.....	3,60 g

SDS.....250,00 mg
 Água destilada q.s.p.....250,00 mL

Solução salina 0,9%

NaCl.....9,00 g
 Água destilada q.s.p.....1000,00 mL

Tampão PBS pH 7,4

Fosfato dibásico de sódio.....1,15 g
 Fosfato monobásico de potássio.....250,00 mg
 Cloreto de sódio.....8,20 g
 Cloreto de potássio.....200,00 mg
 Água destilada q.s.p.....1000,00 mL

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C , 2 atm durante 20 min.

3.1.2 Soluções utilizadas no preparo do antígeno de membrana de hemácias de carneiro

Tampão de Alserver's

Cloreto de sódio.....21 g
 Citrato de Sódio.....4 g
 Glicose.....10,25 g
 Água destilada q.s.p.....500,00 mL

Todas as substâncias foram pesadas e transferidas para um balão volumétrico de 500,00 mL. Homogeneizou até completa dissolução e completou-se o volume com a água. A solução foi transferida para garrafas de cultura, colocando-se as tampas um pouco frouxas e autoclavou-se em vapor fluente por 30 min. Apertou-se as tampas, esperou-se esfriar e armazenou-se em geladeira (4°C).

Tampão Tris-HCl 0,05 mM, EDTA 0,1 mM - pH 7,6

A) Solução A – Tris 0,2M

Tris (Sigma).....48,46 g
Água destilada q.s.p.2000,00 mL

B) Solução B – HCl 1M

Ácido Clorídrico P.A.42,50 mL
Água destilada q.s.p.500,00 mL

C) Solução C – Tris-HCl, EDTA, pH 7,6

Solução A1000,00 mL
Solução B153,60 mL
EDTA.....75,00 mg
Homogeneizou-se todos os componentes e ajustou-se o pH com HCl concentrado para 7,6.

D) Solução D – Tris-HCl

Solução A1000,00 mL
Solução B153,60 mL
Ajustou-se o pH para 7,6.

E) Solução de uso – Tris-HCl 0,05 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,6

Solução C.....volume total
Solução D q.s.p.2000,00 mL
A solução foi homogeneizada e armazenada em geladeira (4°C).

Solução salina 0,85%

Cloreto de sódio.....8,50 g
Água destilada q.s.p.....1000,00 mL
O cloreto de sódio foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 1000,00 mL. Ao sal foi adicionada quantidade suficiente de água para completa dissolução e o volume foi completado. A solução foi armazenada em geladeira (4°C).

3.1.3.3 Soluções utilizadas na resposta linfoproliferativa

Meio RPMI-1640 pH 7,40

Meio RPMI-1640 desidratado (comercial)	10,43 g
Bicarbonato de sódio	1,20 g
Hepes	2,38 g
Ampicilina sódica.....	0,10 g
Estreptomicina	0,10 g
Água deionizada q.s.p.	1000,00 mL

Todas as substâncias foram pesadas e transferidas para um béquer contendo 900,00 mL de água deionizada. Sob agitação, o pH foi baixado para cerca de 4,00 com uma solução de HCl 10 M, para completa dissolução dos constituintes do meio. Após a homogeneização, a solução teve acertado o pH para 7,2 e foi esterilizada em membrana Millipore® (0,22µm). Em seguida, o meio foi aliquotado e armazenado a 4°C.

Meio RPMI-1640 suplementado (FBS 1 ou 10%)

FBS.....	1,00 ou 10,00 mL
Meio RPMI-1640 completo q.s.p.....	100,00 mL

Este meio foi preparado no momento do uso, adicionando-se o soro fetal bovino ao RPMI completo, assepticamente.

Solução Salina de Fazekas St-Groth

Cloreto de sódio.....	8,00 g
Cloreto de potássio.....	0,40 g
Fosfato dibásico de Sódio (12H ₂ O).....	1,77 g
Fosfato monobásico de sódio (1H ₂ O).....	0,69 g
Glicose	2,00 g
Água destilada q.s.p.....	1000,00 mL

Os componentes foram pesados, transferidos para um balão volumétrico de 1000,00 mL, e solubilizados em água. A solução foi autoclavada a 120°C, vapor fluente por 30 min e armazenada a 4°C.

Solução de cloreto de amônio e bicarbonato de sódio

Cloreto de amônio.....8,30 g
 Bicarbonato de sódio.....1,00 g
 Água destilada q.s.p.1000,00 mL

Os sais foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 1000,00 mL. Em seguida foram solubilizados em água. A solução formada foi armazenada em frasco âmbar na geladeira e esterilizada em membrana Millipore® (0,22 µm), no momento do uso.

Solução de MTT

MTT..... 5,00 mg
 PBS1,00 mL

3.1.3.4 Soluções utilizadas na reação de ELISA para a detecção de IgG e IgM

Tampão de ligação (tampão carbonato pH 9,6)

Carbonato de sódio.....1,59 g
 Bicarbonato de sódio.....2,93 g
 Água destilada q.s.p.1000,00 mL

Os sais foram dissolvidos em água e o pH da solução foi acertado para 9,6. A solução foi armazenada em geladeira (4°C).

Tampão de lavagem

Cloreto de sódio.....8,50 g
 Tween 20.....0,50 mL
 Água destilada q.s.p. 1000,00 mL

O cloreto de sódio foi pesado, transferido para um balão volumétrico de 1000,00 mL e solubilizado em uma parte de água. Em seguida, foi adicionado o Tween 20 e o volume foi completado. A solução foi armazenada em geladeira (4°C).

Tampão de bloqueio

A) PBS 0,1 M pH 7,6

Fosfato dibásico de sódio (2H ₂ O).....	0,54 g
Fosfato monobásico de potássio (H ₂ O).....	1,47 g
Cloreto de sódio.....	8,42 g
Água destilada q.s.p.	1000,00 mL

Após o preparo, acertou-se o pH para 7,6 e estocou-se a solução a 4°C em geladeira.

B) Tampão de bloqueio (Caseína 2%)

Caseína.....	20,00 g
PBS 0,1 M pH 7,6 q.s.p.	1000,00 mL

Dissolveu-se a caseína, sob agitação constante, em 800,00 mL de PBS 0,1M pH 7,6, aquecido a cerca de 90°C. A seguir acertou-se o volume final para 1000,00 mL com PBS 0,1 M pH 7,6 e filtrou-se em papel filtro (Whatman nº1). A solução foi aliqotada em tubos Falcon de 50 mL e estocada a -20°C, até o momento do uso.

Tampão de incubação (com caseína a 0,25%)

Tween 20.....	0,50 mL
Caseína	2,50 g
PBS 0,1 M pH 7,6 q.s.p.....	1000,00 mL

Dissolveu-se a caseína, sob agitação constante, em 800,00 mL de PBS 0,1M pH 7,6, aquecido a cerca de 90°C. A seguir adicionou-se o Tween 20 e acertou-se o volume final para 1000,00 mL com PBS 0,1 M pH 7,6. A solução foi filtrada em papel filtro (Whatman nº1) e, em seguida, aliqotada em tubos Falcon de 50 mL e estocada a -20°C, até o momento do uso.

Tampão de substrato

Fosfato dibásico de sódio anidro.....7,19 g
Ácido cítrico5,19 g
Água destilada q.s.p.1000,00 mL
A solução com pH acertado para 5,0 foi então, guardada em geladeira a 4°C.

Acrescentar em 10 mL do tampão substrato:

Peróxido de Hidrogênio 30%4,00 µL
OPD6,00 mg
Sob agitação constante, diluiu-se cuidadosamente o OPD em 10 mL de tampão do substrato. A seguir, ainda sob agitação, foi adicionado o peróxido de hidrogênio. Esta solução foi preparada no momento do uso.

Solução para interromper a reação

Ácido sulfúrico 4N.....240,00 mL
Água destilada260,00 mL
Adicionou-se o ácido sobre a água num balão lentamente, homogeneizou-se e armazenou-se em frasco âmbar à temperatura ambiente.

3.1.3.5 Soluções utilizadas na reação de ELISA para a detecção de VEGF, TNF- α e TGF- β

Reagente diluente (BSA 0,1%)

PBS estéril.....40,00 mL
BSA.....0,04 g

Solução de ácido sulfúrico a 4M

Ácido Sulfúrico (18M).....115,00 mL
Água destilada q.s.p.....500,00 mL

Solução para paralisação da reação

Ácido sulfúrico 4M.....	30,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Tampão de bloqueio (BSA 1%)

PBS estéril.....	40,00 mL
BSA.....	0,40 g

Tampão de lavagem

Tween 20.....	650,00 mL
PBS.....	1300,00 mL

3.1.4 Biológicos

Látex exsudado de frutos imaturos de *Carica candamarcensis* Hook. F. 1875 originário do Chile, fornecidos pelo Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais (ICB, UFMG, Belo Horizonte, M.G, Brasil).

Foram utilizados camundongas (*Mus musculus albinus* Min Palumbo, 1868) das linhagens Suíça (Swiss) e BALB/c com 8 semanas de idade, pesando entre 20 e 30 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO/ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em caixas plásticas (10 animais em cada uma) e foram alimentados com ração industrializada e água *ad libitum*.

Foi utilizado o sangue total de um carneiro (*Ovis aries aries* Linnaeus, 1758), adulto, pertencente a Escola de Veterinária da UFMG, mantido no galpão de clínica de ruminantes.

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas e regulamentos do com o comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), protocolo de autorização nº 90/09.

3.1.5 Materiais diversos

- **Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA** - Tubos tipo “eppendorf” com capacidade para 0,50 e 1,50 mL.
- **Fenin-Optik, Blakenburg, Alemanha** - Câmaras de Neubauer.
- **Fizatron, Equipamentos Eletrônicos para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil** - Barras magnéticas.
- **Gilson Sas, França** - Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2,00; 20,00; 200,00 e 1000,00 μ L, acompanhados de ponteiros de polipropileno.
- **Millipore Corporation, Bedford, EUA** - Membranas filtrantes de nitrato de celulose, com 0,45 μ m e 0,22 μ m de diâmetro de poro.
- **Nunc Inter Med A/S, Roskilde, Dinamarca** - Garrafas de poliestireno de 50,00 mL para cultura, placas de poliestireno de 96 cavidades.
- **Quimex Corning Incorporated, New York, New York, EUA** – Pipetas graduadas de vidro, tubos de polipropileno com fundo cônico de 15,00 e 50,00 mL de capacidade e dotados de tampa rosqueável.
- **Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA** - Saco de diálise com poro 10 kDa de diâmetro.
- **S.S White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil** - Material cirúrgico.
- **Sytat Software Inc., Richmond, California, EUA** - Software Sigma Plot versão 10.0 e Prisma versão 5.0 para análise de resultados em forma gráfica e testes estatísticos.
- **Vidrolabor-Thermex Astra Brasil Ind. Vidros, F. Vasconcelos, SP, Brasil** - Vidraria.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção e purificação das frações do látex de *Carica candamarcensis*

A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, o látex foi coletado e armazenado a 4° C. Posteriormente, o mesmo foi liofilizado e novamente armazenado a -20° C. As separações cromatográficas foram feitas em diferentes amostras e com látex colhidos em diferentes períodos. Para a separação cromatográfica, foi dissolvido 3,0 g do látex liofilizado em 15,0 mL de tampão de ativação. A mistura foi agitada durante 30 min e centrifugada (9.000 g) durante 10 min a 4° C. O sobrenadante foi filtrado, sendo repetido o procedimento descrito acima com o resíduo, utilizando 5,00 mL do tampão de ativação. Os filtrados obtidos foram recolhidos, desprezando-se os resíduos.

A amostra obtida anteriormente foi aplicada em uma coluna contendo resina Sephadex G-10, após esta ter sido equilibrada com tampão acetato de sódio 1,00 M. As frações coletadas foram triadas mediante a determinação da absorbância a 280 nm. As primeiras frações obtidas da coluna G-10 foram reunidas, formando o primeiro pico cromatográfico (P1G10).

Com um sistema de ultrafiltração que utiliza uma membrana de 10 kDa, as amostras de P1G10 foram filtradas, lavando-as 3 vezes com água deionizada e recolhendo a solução residual, que posteriormente foi liofilizada. A determinação da concentração protéica total, a atividade proteolítica específica e a análise em gel de poliacrilamida SDS-Page da amostra recolhida foram realizadas como parâmetro para a caracterização da fração (SILVA et al., 2003; MELLO et al., 2006). Dessa forma, separamos um lote de P1G10 com quantidade suficiente para desenvolver o presente estudo (4,23 g).

3.2.2 Determinação da concentração protéica

A concentração protéica de P1G10 foi determinada através da técnica de Lowry – Folin, como descrita por DAWSON et al. (1995). Para tanto, as seguintes soluções foram preparadas:

- Solução 1: 2% de Na₂CO₃ em 0,10 mol/L de NaOH

- Solução 2: 0,5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1% de citrato de sódio
- Solução 3: mistura de 50,0 mL da solução 1 e 1,0 mL da solução 2
- Solução 4: reagente de Folin 1:2 em água deionizada

Inicialmente, foi construída uma curva-padrão relacionando a concentração protéica e a atividade ótica. Para isso, foi aliqotado, em triplicata, 1,0; 2,0 e 3,0 μL de uma solução padrão de lisozima (10 mg/mL), completando com a solução 3 para obtenção de um volume total de 1,0 mL. Após homogeneização, a mistura foi deixada por 10 min em temperatura ambiente. Terminado este período, 100 μL da solução 4 foi adicionada, agitada e mantida por 30 min, também em temperatura ambiente, para a determinação da absorvância em comprimento de onda de 750 nm. O espectrofotômetro foi zerado com uma solução contendo 1,0 mL da solução 3 e 100 μL da solução 4 (solução branco).

Diferentes amostras de P1G10 foram diluídas em água deionizada, sendo repetidos, os procedimentos acima descritos. A concentração protéica foi determinada, mediante a interpolação das absorvâncias obtidas das amostras com a reta da curva de calibração ou pelo emprego da equação, obtida da mesma.

3.2.3 Determinação da atividade proteolítica específica

A atividade proteolítica específica das amostras de P1G10 foi determinada, segundo SILVA et al. (2003), através da medida da atividade amidásica em substrato BAPNA. Para isso, a seguinte solução foi preparada:

- 30 mL de tampão fosfato 25 mM pH 8
- 750 μL de cisteína 200 mM
- 120 μL de EDTA 0,5 M
- 90 μL de substrato BAPNA 100 mM

Em triplicata, amostras de P1G10 foram aliqotadas, para obtenção de uma mistura na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ da solução acima especificada. A mistura foi incubada em banho de água a 37°C por um período variável de 1 min a 12 h até obtenção de uma coloração amarelo-clara. A reação foi interrompida com a adição de 60 μL de solução de ácido acético 60% (v/v). A leitura foi feita em

espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm com o aparelho zerado com 1,0 mL da solução acima descrita na ausência de amostra.

A atividade específica das amostras foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$A = a \times b \times c$$

A= absorvância

a= coeficiente de extinção molar ($8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

b= comprimento da cubeta (1 cm)

c= concentração do complexo formado (M)

Atividade específica = nM/min/ μg de enzima

3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

A solução para gel separador foi aplicada em uma placa de vidro com 8,0 x 10,0 x 0,3 cm de dimensões, munidas de espaçadores e vedantes de borracha. Após o gel separador ter polimerizado, o gel concentrador foi adicionado sobre o primeiro. Antes da polimerização foi adicionado um pente com 10 dentes. Após a polimerização do último gel, os pentes e os vedantes foram cuidadosamente retirados, sendo a montagem colocada na cuba de eletroforese contendo o tampão de corrida. Uma corrente elétrica de 80 V de tensão, 20 mA de corrente e 2W de potência foi aplicada durante 30 min a 7 °C (pré-corrida). Um volume do tampão de amostra foi adicionado correspondente a 1/6 do volume total da amostra. Nas amostras contendo proteases também foi adicionado 1 μL de solução MMS 50 mM. Para desnaturação das amostras, essas foram fervidas por 5 min, antes da aplicação no gel. A aplicação foi feita nas canaletas localizadas no pólo negativo do gel. A eletroforese foi desenvolvida em corrente elétrica de 80 V de tensão, 20 mA de corrente e 2 W de potência, durante aproximadamente 2 h a 7 °C.

Terminada a corrida eletroforética o gel foi exposto à solução fixadora por 30 min. Após esse período, o gel foi lavado 2 vezes com água destilada para hidratá-lo. Em seguida, foi adicionada a solução de azul-brilhante de coomassie

para coloração de géis a qual permanecerá por 30 min ou até o aparecimento das bandas. O fundo do gel (background) foi descorado com a solução descorante. Foi retirada foto digital (câmara Kodak DC-40) do gel sobre um transiluminador para a análise dos resultados. A intensidade das bandas foi calculada por densitometria usando o software Kodak versão 1D-3.5.

A massa molecular foi estimada através da análise do gel desnaturante corrida com padrões de peso molecular de massas conhecidas: lisozima, 14.300 Da; quimiotripsinogênio, 25.000 Da e ovalbumina, 45.000 Da. A relação entre o logaritmo natural dos pesos moleculares dos padrões com sua distância de migração foi relacionada com a distância de migração das amostras testadas para determinação do peso molecular destas. Essa determinação foi realizada com auxílio do *software* Kodak versão 1D-3.5. (LAEMMLI, 1970).

3.2.5 Manutenção do Tumor

Na avaliação da atividade antitumoral de P1G10, foi utilizado como modelo experimental, o carcinoma ascítico de Ehrlich. A manutenção das células tumorais é feita *in vivo*, através da injeção intraperitoneal de 10^7 células a cada 7 dias em camundongas receptoras, obtidas por punção mecânica do líquido ascítico dos animais doadores (SAAD-HOSSNE et al., 2003). No preparo do fluido para a inoculação, o mesmo foi lavado com PBS e a densidade celular ajustada para 10^7 células/100µL.

3.2.6 Preparo das células tumorais para inoculação

No dia da inoculação tumoral, foram coletados 3,0 mL de fluído ascítico de camundongas pré-inoculados há aproximadamente 7 dias com carcinoma de Ehrlich. Esse fluído foi centrifugado (1500 rpm) durante 5 min e o sobrenadante descartado. A seguir, as células foram suspensas em PBS e centrifugadas novamente. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes ou até a obtenção de um sobrenadante límpido, claro e denso, que corresponde a uma suspensão celular com o mínimo de fibrina e hemácias. Para ajuste da densidade celular, foi realizada a contagem e o teste de viabilidade das células tumorais. Para isto, 20 µl

de suspensão celular foram adicionados a 1980 µl de PBS. Após a homogeneização, foram retirados 100 µl da suspensão diluída e adicionados 100 µl de corante azul de Tripan a 0,1%. A contagem foi feita em câmara de Neubauer, sendo contadas as células contidas nos quatro quadrantes externos. As células coradas em azul foram consideradas inviáveis, e as células translúcidas consideradas viáveis. Para inoculação, a viabilidade considerada foi em torno de 90%. Para o experimento, 10^7 células do tumor de Ehrlich foram inoculadas na cavidade peritoneal, para que o tumor se desenvolvesse em sua forma ascítica, ou 5×10^6 células foram inoculadas, via s.c., no flanco direito para que o tumor se desenvolvesse em sua forma sólida (ASSIS et al., 2007). A fórmula final para determinação do número de células viáveis foi deduzida, segundo DAGLI et al. (1992):

$$\text{Número de células/mL} = (\text{Número de células contadas} \times \text{Fator de correção}) \div 4$$

Sendo que:

$$\text{Fator de correção} = \text{Fator de profundidade} (10^4) \times \text{Fator de diluição} (200)$$

3.2.7 Avaliação da atividade antitumoral de P1G10 contra carcinoma de Ehrlich em sua forma sólida

Nessa avaliação foram formados 4 grupos, sendo um o controle que recebeu somente veículo (PBS) e outros 3 grupos testes que receberam P1G10 nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg. O tratamento foi iniciado 4 dias após a inoculação de células e feito diariamente, por 21 dias, via subcutânea. Ao final, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seus tumores primários removidos, pesados e medidos. Para a determinação do volume, o tumor foi mensurado através de duas medidas: uma no sentido da maior extensão e outra no sentido da menor extensão, com o auxílio de um paquímetro (GHONEUM et al., 2008). Assim, o volume tumoral (VT) foi obtido através da seguinte fórmula:

$$VT (mm^3) = 0,52 AB^2$$

Sendo A, a medida do menor eixo e B a do maior eixo.

3.2.8 Avaliação da atividade antitumoral da fração P1G10 contra carcinoma de Ehrlich ascítico

Após 3 dias da inoculação, o tratamento dos animais foi iniciado. Foram formados 4 grupos, sendo um controle, que recebeu veículo (PBS) e outros 3 grupos teste, que receberam P1G10 nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg. As administrações ocorreram diariamente, durante 10 dias consecutivos, por via s.c.. Ao final do tratamento, foi realizada a punção do líquido ascítico e a determinação da sua celularidade. Para isso, 10 µL do líquido ascítico foram adicionados a 990 µL de meio RPMI 1640. Desta suspensão, foram retirados 50 µL e adicionados a 50 µL do corante azul de Tripán a 0,1%. A contagem foi feita em câmara de Neubauer, como descrito acima no item 3.2.7 (SAAD-HOSSNE et al., 2003; ASSIS et al., 2007).

3.2.9 Avaliação do efeito de P1G10 sobre a sobrevivência de animais portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich

Com o intuito de observar uma possível progressão do tempo de sobrevivência de animais com o carcinoma ascítico de Ehrlich, quando tratados com a fração P1G10, foi realizada uma análise de sobrevivência. Para isso, foram considerados 4 grupos experimentais: um grupo controle que recebeu 100 µL de PBS e outros 3 grupos de animais tratados com a fração P1G10 nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg. O tratamento foi iniciado 3 dias após a inoculação das células (10^7 células / 100 µL / animal) e continuado por 10 dias consecutivos. Após o término do tratamento, foi feito o acompanhamento diário dos animais e foram contabilizados os óbitos/dia. Os dados obtidos foram expressos graficamente pela curva de sobrevivência de Kaplan-Méier e os resultados comparados entre si pelos testes de Wilcoxon, Harrington-Fleming e Longrank.

3.2.10 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do sal de brometo de tetrazolium (MTT)

A citotoxicidade da fração proteolítica P1G10 foi avaliada utilizando a linhagem celular do carcinoma ascítico de Ehrlich derivado de camundongo. As células foram cultivadas suspensas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor, 100 U penicilina/mL e 100 µg de estreptomicina/mL, em uma incubadora umidificada com uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (KVIECINSKI et al., 2008). As células foram semeadas, em placa de 96 poços em uma densidade de 10⁶ células/poço. Após 24 h do plaqueamento, as amostras de P1G10 foram adicionadas dissolvidas em meio RPMI com 10% de FBS, nas concentrações de 10⁻⁶, 10⁻⁵, 5x10⁻⁵ e 10⁻⁴ g/mL. As células ficaram expostas por 48 h ao meio de cultura com ou sem P1G10 (controle). Ao final do período de incubação, a citotoxicidade foi avaliada pelo método da redução do MTT. O ensaio do MTT é um teste de competência metabólica baseado na avaliação da performance mitocondrial, que depende da conversão de amarelo do corante 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazolium (MTT) para o formazan roxo pela succinato desidrogenase das células viáveis (MOSMANN, 1983). Para isso, foram adicionadas 10 µL de uma solução contendo 5 mg/mL de MTT. Decorridas 4 h, o formazan produzido pela redução do MTT, foi dissolvido em DMSO, e a absorvância foi mensurada através da leitura em espectrofotômetro a 550 nm, sendo determinada a porcentagem de redução do corante em relação ao controle. testada em 6 replicatas e 3 experimentos foram realizados. A partir do resultado a IC 50 foi determinada através de regressão linear.

3.2.11 Contagem global de leucócitos

Uma alíquota de 10 µL de sangue total foi adicionada a 190 µL de solução de Turk. Agitou-se bem e cerca de 10 µL da suspensão formada foi colocada em uma câmara de Neubauer para realização da contagem, utilizando os quatro campos externos da câmara. Após a contagem, foi calculado o número total de leucócitos, pela fórmula:

$$\text{Leucócitos/mL} = \text{valor contado} \times 10^4 \times \text{Diluição/Número de campos}$$

Sendo 10^4 = Fator de correção do volume

3.2.12 Confeção de esfregaço sanguíneo e coloração das lâminas

Uma gota do sangue total foi obtida através do corte da extremidade da cauda de camundongas Swiss com uma tesoura e colocada sobre uma lâmina limpa. Com a ajuda de outra lâmina, em uma inclinação de 45 °, foi confeccionado o esfregaço através do deslizamento de uma sobre a outra, em sentido oposto. Após a secagem, as lâminas foram coradas por May-Grünwald e Giemsa (CARVALHO e SILVA et al., 1988).

3.2.13 Contagem diferencial de leucócitos

Os leucócitos foram contados em esfregaço sanguíneo, preparado e corado, como descrito no item 3.2.12. A contagem foi feita até se obter uma soma igual a 100, o que está relacionado ao percentual de leucócitos no esfregaço. Após a contagem, o percentual encontrado foi multiplicado pelo valor global de leucócitos para encontrar o valor por mL. As avaliações leucocitárias, foram realizadas em todos os animais de todos os grupos, antes do início do tratamento e da inoculação tumoral, sendo esses dados reunidos formando o grupo denominado de “naive”.

3.2.14 Determinação do número de células da medula óssea

Camundongas Swiss foram inoculadas com 10^7 células de carcinoma ascítico de Ehrlich por via intraperitoneal. A partir do 3º dia, os animais foram tratados por via subcutânea s.c. com PBS (controle) ou P1G10 a 1 mg/kg, sendo o tratamento repetido 1 vez ao dia, durante 10 dias. No dia seguinte, os animais foram sacrificados e seus fêmures foram extraídos e cortados nas suas extremidades distais. Para a retirada das células, o canal interno do fêmur foi lavado com 3 ml de PBS. O líquido celular obtido foi corado com cristal violeta

(0,5% em 30% de ácido acético) e inserido na câmara de Neubauer para a contagem das células em microscópio óptico (objetiva de 40x) (SODERBERG et al., 1996).

3.2.15 Dosagens dos níveis das citocinas VEGF, TGF- β e TNF- α

Após o tratamento com P1G10 nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg durante 10 dias consecutivos, por via subcutânea, foi realizada a punção do líquido ascítico e o sobrenadante foi utilizado para dosagens dos níveis das citocinas VEGF, TGF- β e TNF- α .

A detecção e quantificação de cada citocina foram feitas pela técnica do *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). O protocolo usado para cada citocina foi composto dos mesmos procedimentos com diferenças apenas nas concentrações dos anticorpos de captura e biotinilados, que variam em suas diluições para cada citocina, de acordo com as padronizações. Tais concentrações estavam nas faixas recomendadas pelo fabricante (R&D Systems). Primeiramente, sensibilizou-se a placa com 100 μ L / poço do anticorpo de captura anti-citocina purificado. Este anticorpo foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, pois tal solução aumenta a adsorção do anticorpo na placa. A incubação da placa foi feita em câmara úmida, *overnight*, a 4° C. O bloqueio das ligações inespecíficas ocorreu adicionando-se 200 μ L/poço de tampão de bloqueio (BSA 1%), diluído em tampão carbonato-bicarbonato e incubando-se a placa em câmara úmida, por 2 h, a 37° C. Após sensibilização e bloqueio da placa foram adicionados, num volume de 100 μ L/poço, os padrões (citocinas recombinantes) e as amostras, que foram incubadas em câmara úmida, por 2 h, a 37° C. Nesta etapa, não foi colocado material em dois poços na primeira coluna, para que estes servissem de branco e no restante foram feitas diluições seriadas do padrão que possui concentração padronizada de citocinas, para posterior realização da curva padrão. Em seguida, foi adicionado, num volume de 100 μ L/poço, o anticorpo anti-citocina biotinilado diluído em tampão PBS/Tween e o material foi incubado em câmara úmida, por 2 h, a 37° C. A seguir, foram adicionados 100 μ L/poço de solução contendo um conjugado de HRP (horseradish peroxidase) e estreptoavidina, diluído em

PBS/Tween, as placas foram incubadas por 2 h, em câmara úmida, a 37° C. Finalmente, para se revelar a reação anticorpo-citocina, o substrato para a enzima (HRP) foi adicionado (100 µL/poço). Tal solução se constituiu de 25 mL de tampão citrato-fosfato, 10 mg de OPD (*o*-Phenylene-diamine) e 10 µl de peróxido de hidrogênio a 30 volumes. Após 15 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de solução de ácido sulfúrico a 2 N. A placa foi lavada com solução de PBS/Tween (250 µL/poço) após cada etapa do protocolo. A leitura espectrofotométrica foi realizada em comprimento de onda de 492 nm (GENTILE, 2001).

3.2.16 Avaliação do efeito de P1G10 sobre a resposta humoral de animais portadores de carcinoma de Ehrlich ascítico

Para a obtenção de antígenos de membrana de hemácias de carneiro, foram coletados cerca de 300 mL de sangue periférico de carneiro (*Ovis aries aries* Linnaeus, 1758) sem anticoagulante, ao qual foram adicionados 300 mL de Tampão de Alserver's (50% v/v). A mistura foi centrifugada a 3000 rpm/ 4° C/ 30 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com salina 0,9% por 3 vezes. Em seguida, o sedimento foi suspenso com 40 mL de TRIS-HCl 0,05 M contendo 0,1 mM de EDTA e agitado em vortex. Após a agitação, a suspensão foi centrifugada a 25.000 G a 4°C/ 30 min e desprezou-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. Em seguida, foi adicionado 20 mL de SDS a 0,1% contendo 0,02% de azida sódica. A preparação foi distribuída em alíquotas de 0,05 mL e conservada a -20°C (VAN LOVEREN et al., 1991; TEMPLE et al., 1993).

As concentrações de proteínas dos antígenos de membrana de hemácias de carneiro foram determinadas utilizando-se o método de Lowry- Folin (DAWSON et al., 1995), como descrito no item 3.2.2.

Para avaliação da resposta imunológica (estudo agudo) foram utilizados camundongas da linhagem BALB/c, portadoras do tumor de Ehrlich (tratamento por 15 dias). O estudo de fase crônica (30 dias) não foi realizado porque os

animais não sobreviveriam 30 dias com o tumor. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 6 grupos de 4 ou 5 animais e tratados da seguinte forma:

- **Grupo 1:** solução controle (PBS) por via s.c.
- **Grupo 2:** solução controle (PBS) por via s.c. e imunizados com hemácias de carneiro via s.c.
- **Grupo 3:** dose 1 (1 mg/kg) de P1G10, via s.c.
- **Grupo 4:** dose 2 (5 mg/kg) de P1G10, via s.c.
- **Grupo 5:** dose 1 (1 mg/kg) de P1G10, via s.c., sendo esses animais imunizados com hemácias de carneiro (*Ovis aries aries*), via s.c.
- **Grupo 6:** dose 2 (5 mg/kg) de P1G10, via s.c., sendo esses animais imunizados com hemácias de carneiro (*Ovis aries aries*), via s.c.

As administrações de P1G10 ocorreram a partir do 3º dia após a inoculação das células de carcinoma ascítico de Ehrlich e foram repetidas, uma vez ao dia, durante 11 dias. Os grupos 1, 3 e 4 foram avaliados quanto a resposta imune celular, e os grupos 2, 5 e 6 foram avaliados quanto a resposta imune humoral.

A imunização dos animais dos grupos 2, 5 e 6, foi realizada nos dias 1, 3, 7 e 10, pela inoculação de 2×10^6 hemácias de carneiro, por via sub cutânea. No 12º dia, os animais dos grupos 2, 5 e 6 receberam uma dose de reforço contendo 2×10^6 hemácias de carneiro por via sub cutânea. No 15º dia, foi realizada a exsanguinação e obtenção do soro, seguido do sacrifício dos animais. O soro foi utilizado para a detecção de IgG e IgM anti-hemácias de carneiro. Para isso, foi utilizada a técnica de ELISA indireto, que foi realizada em microplacas de 96 poços, sensibilizadas com 2 µg/100 µL/poço da preparação antigênica de membrana de hemácias de carneiro diluída em tampão de ligação (tampão carbonato) e incubado por 24 hs em câmara úmida a 4°C. Após esse tempo, foi feita a lavagem (tampão de lavagem) das placas por cinco vezes e então adicionou-se a cada poço, 150 µL de tampão de bloqueio (PBS e caseína 2%) e incubou-se por 30 minutos a 37°C. Após 10 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço das amostras de soro diluídas em tampão de incubação a 1:25

(duplicatas), e incubadas ou-se a 37°C por 1 hora. Após 10 lavagens sucessivas adicionou-se 100 µL dos conjugados específicos (anti-IgM e anti-IgG conjugados com a peroxidase) de camundongos, diluídos a 1:5000 em tampão de incubação e mantidos a 37°C por 1 hora. Após outras 10 lavagens, adicionou-se 100 µL de uma solução tampão substrato contendo OPD (o-fenilenodiamina) e peróxido de hidrogênio. As placas foram incubadas à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 15 min. Em seguida foram adicionados 50 µL de solução de H₂SO₄ 4N, para paralisar a reação. As absorbâncias foram determinadas com auxílio de um leitor automático para microplacas, no comprimento de onda de 492 nm, e os resultados expressos como densidade óptica (D.O.).

3.2.17 Avaliação da atividade proliferativa de P1G10 sobre linfócitos obtidos de animais portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich

Inicialmente, os animais foram inoculados com 10⁷ células tumorais, como descrito nos itens 3.2.6 e 3.2.8 . Após 3 dias, o tratamento foi iniciado com 1 ou 5 mg/kg, sendo realizado uma vez ao dia, durante 11 dias. Após este período, os animais foram sacrificados e seus baços retirados assepticamente, para a obtenção dos linfócitos conforme descrito por BENENCIA et al., 2000; TULINSKA et al., 2000; PEIJIE et al., 2003; e ALVAREZ et al., 2004.

O baço foi colocado em meio de RPMI 1640 e dilacerado com pinças e tesouras estéreis. A suspensão obtida foi filtrada em gaze também estéril, sendo o filtrado centrifugado a 1000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento de células esplênicas foi adicionado 5 mL de cloreto de amônio a 0,83%, contendo bicarbonato de sódio a 1%, sendo agitado rapidamente em vórtex, e em seguida, mantido em repouso em banho de gelo, por 5 min (para ocorrer a lise das hemácias). Após este período, foram adicionados 5 mL de RPMI 1640 suplementado com 1% de FBS, seguido da centrifugação a 1200 rpm/10 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento de células foi adicionado 10 mL da solução salina de Fazeka's St. Groth. Em seguida, as células esplênicas foram quantificadas em câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para 5 x 10⁵ células/100 µL. A suspensão celular (100 µL) foi semeada em placas de 96

poços, sendo reservados 6 pocinhos para cada animal. Logo em seguida foram feitos tratamentos, em triplicata, de acordo com: 10 µL de Concanavalina A (40 µg/mL) + 10 µL de PBS ou 10 µL de P1G10 (10 µg/mL) + 10 µL de Concanavalina A (40 µg/mL)

As placas foram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e com 95% de umidade relativa por 72 horas (YASNI et al., 1993; ROSEGHINI et al., 2006). Após este período a proliferação celular foi avaliada através do método do MTT, como descrito acima no item 3.2.10. Os resultados do ensaio de proliferação celular foram expressos em densidade óptica (D.O.).

3.2.18 Avaliação da atividade antitumoral em animais portadores do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica quando estes são pré tratados com a fração P1G10

Camundongas Swiss foram pré-tratadas por 10 dias, e então, inoculadas por via intraperitoneal com 10⁷ células de tumor de Ehrlich, aguardou-se então um período de 10 dias (sem tratamento algum) para o desenvolvimento tumoral, e no 11º dia após a inoculação foi realizada punção do líquido ascítico para contagem do número de células, conforme o item 3.2.6 e 3.2.8

Foram formados 4 grupos, sendo um controle, que recebeu veículo (PBS) e outros 2 grupos teste, que receberam P1G10 nas doses de 1 e 5 mg/kg. As administrações ocorreram diariamente, durante 10 dias consecutivos, por via sub cutânea.

3.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram efetuadas através do programa GraphPad Prism 5.0, utilizando análise de variância (ANOVA), seguida pelos pós-testes de Bonferroni, Student-Newman-Keuls e Dunnet, de acordo com cada procedimento e descrito em cada legenda em resultados. Para avaliar se houve diferença significativa entre os grupos, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Na análise da sobrevivência, os dados obtidos foram expressos graficamente pela curva de sobrevivência de Kaplan-Méier e os resultados comparados entre si pelo testes de Wilcoxon, Harrington-Fleming e Longrank.

4. Resultados

4.1 Obtenção e caracterização da fração P1G10

O látex liofilizado foi dissolvido em tampão de ativação e aplicado a uma coluna cromatográfica Sephadex G-10. A separação em dois picos bem definidos, P1G10 e P2G10 se fez a partir do perfil protéico (absorbância a 280 nm), como representado na Figura 1. O pico P1G10 corresponde às frações 25 a 42 e o P2G10 às frações 48 a 66. As frações que compõem o pico P1G10 foram reunidas e submetidas à concentração e liofilização como descrito no item 3.2.1. De 15 g de látex aplicados na coluna, foram obtidos 4,23 g de P1G10, representando um rendimento de 28%. A atividade amidásica específica foi de 29,09 nM.min⁻¹.mg⁻¹ (item 3.2.3) e a quantidade de proteína total de 84,6 ± 1,60 % (medido conforme item 3.2.2).

Para avaliação da composição protéica, foi realizada uma eletroforese em condições desnaturantes (Figura 2) onde a análise do gel mostrou a presença de um perfil eletroforético semelhante para as várias amostras de P1G10, com as principais bandas protéicas correspondendo a massas moleculares de 23 a 27kDa. Também observando a Figura 2, é possível verificar a manutenção do perfil protéico em amostras do látex de *C. candamarcensis* coletadas em diferentes momentos.

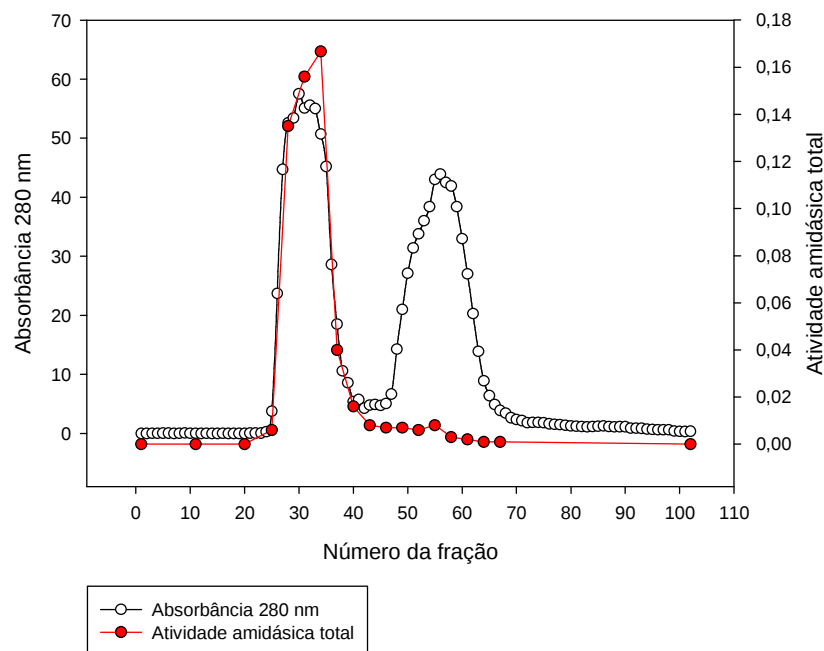


Figura 1: Perfil cromatográfico representativo do látex ativado na coluna “Sephadex G-10”. A solução de látex ativado de *C. candamarcensis* foi aplicada em coluna “Sephadex G-10” e eluída com solução de acetato de sódio 1,0 M (pH 5,0), com fluxo de 0,25 mL/min. Frações de 5 mL foram coletadas para determinação do perfil protéico (absorbância a 280 nm) e atividade amidásica total, conforme descrito na metodologia (itens 3.2.1 e 3.2.3, respectivamente).

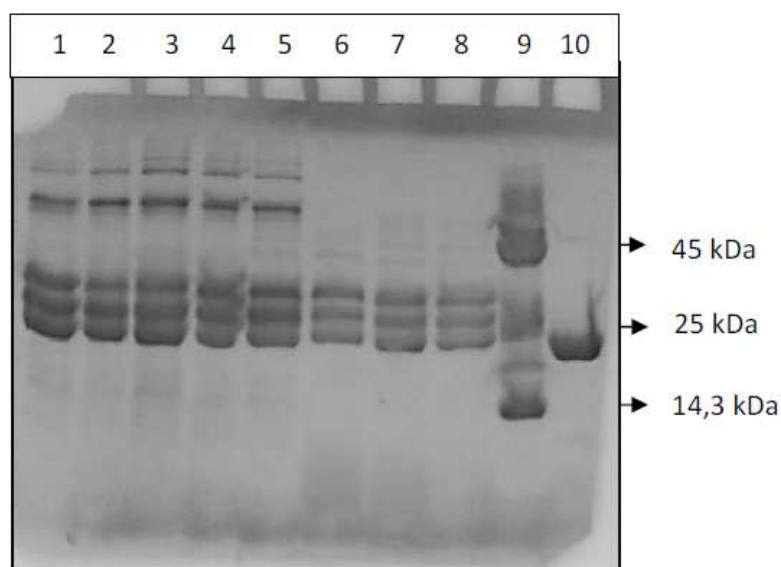


Figura 2: Perfil eletroforético de diferentes amostras de látex de *C. candamarcensis* e fração P1G10 em gel SDS/PAGE 12% em condições desnaturantes. Trinta microgramas de cada amostra foram aplicadas, sendo a corrida eletroforética e o gel corado por Coomassie blue G-250 conforme item 3.2.4. Canaletas 1 a 5, amostras de diferentes lotes de P1G10; canaletas 6 a 8, amostras de diferentes lotes de látex de *C. candamarcensis*; canaleta 9, padrão de peso molecular (10 µg de ovalbumina, 45 kDa; 10 µg de quimiotripsinogênio, 25 kDa e 10 µg de lisozima, 14,3 kDa) e canaleta 10, amostra de P2G10.

4.2 Avaliação da atividade antitumoral de P1G10 sobre carcinoma de Ehrlich sólido

Nessa avaliação, camundongas portadoras do tumor sólido de Ehrlich foram tratadas diariamente com a fração proteolítica, começando no 8º dia e estendendo-se até o 29º dia, após a inoculação das células. A atividade antitumoral foi mensurada pelas alterações no volume tumoral no decorrer do ensaio e pela massa ao final do experimento. A Figura 3 mostra que a administração de P1G10 na dose de 3 mg/kg causou uma diminuição do volume tumoral, a partir do 5º dia de tratamento (13º do experimento), sendo significativa apenas no 21º dia de tratamento (27º do experimento). A redução observada foi de 42,2% (3 mg/kg, $942,45 \pm 255,00 \text{ mm}^3$ $p < 0,05$, Two Way ANOVA, pós teste Bonferroni) quando comparado ao grupo controle ($1839 \pm 481,70 \text{ mm}^3$). Os animais foram pesados a cada 48 horas para ajuste da concentração da solução não havendo diferenças significativas entre os grupos avaliados (dados não mostrados).

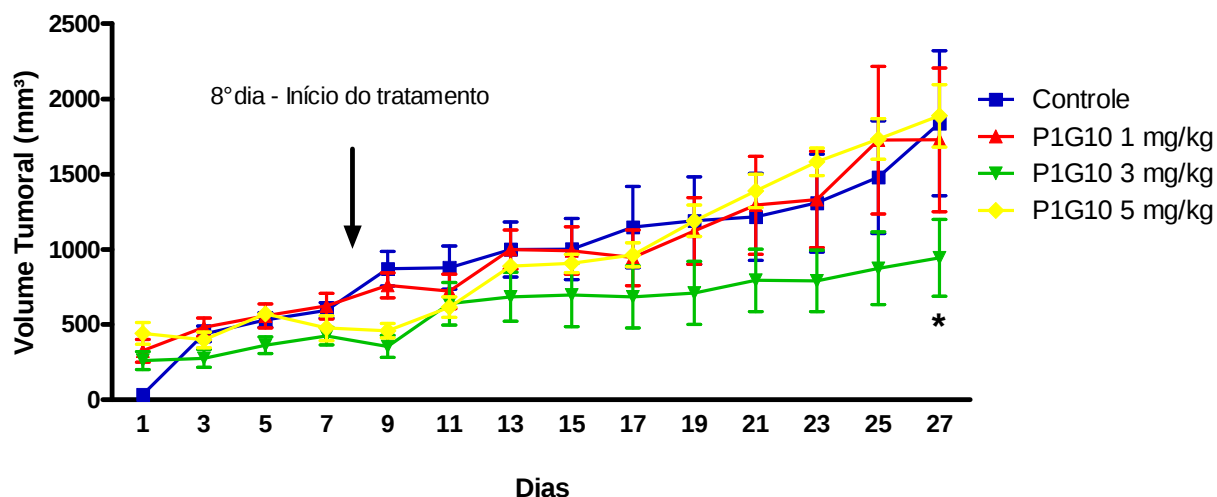


Figura 3. Avaliação do volume tumoral de animais portadores do tumor de Ehrlich sólido tratados com a fração P1G10. Camundongas Swiss, receberam inóculos de 5×10^6 células no flanco direito. Após 8 dias da inoculação, foi iniciado o tratamento com P1G10 nas doses de 1, 3 ou 5 mg/kg, sendo mantido por 29 dias. Durante todo o período de tratamento, o volume tumoral foi aferido a cada 48 h, utilizando paquímetro. Os resultados são apresentados como média $\pm$ e.p.m do volume tumoral de 10 animais, em função do tempo. * indica resultado significativamente diferente em relação ao controle, para $p < 0,05$, Two Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni.

Ao final do tratamento (29º dia do experimento), os animais foram sacrificados e seus tumores pesados. Na Figura 4, é possível verificar que a administração de P1G10 na doses de 1 ou 3 mg/kg reduziu a massa tumoral, entretanto, apenas na dose de 3 mg/kg, a redução foi significativa (68 %, 0.29 ± 0.10 g, $p < 0.05$) em relação ao grupo controle (0.91 ± 0.12 g, One Way ANOVA, pós teste de Dunnet).

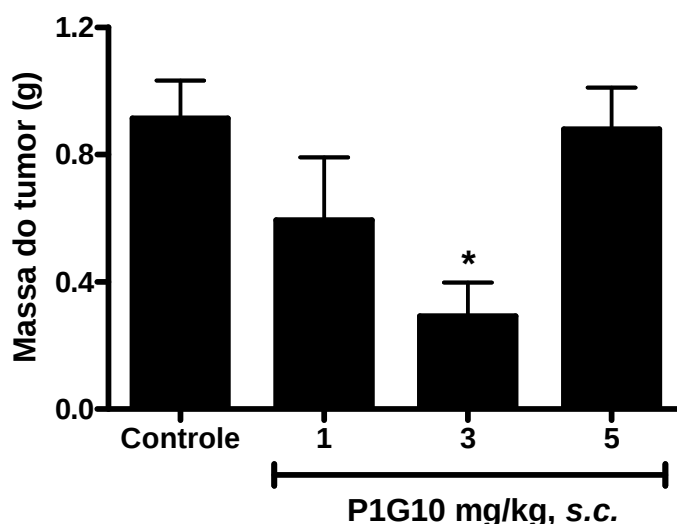


Figura 4. Avaliação da massa tumoral de animais portadores do tumor de Ehrlich sólido e tratados com a fração P1G10. Camundongas Swiss receberam inóculo de $5 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ de células no flanco direito. Após 8 dias da inoculação, foi iniciado o tratamento com P1G10 nas doses de 1, 3 ou 5 mg/kg, sendo mantido durante 21 dias. Ao final desse período, os animais foram sacrificados, seus tumores coletados e pesados. Os resultados são apresentados como média $\pm$ e.p.m da massa tumoral de 10 animais. * indica resultado significativamente diferente em relação ao controle, para $p < 0.05$ (One Way ANOVA, pós teste de Dunnet).

4.3 Avaliação da atividade antitumoral em animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico

Para a avaliação da atividade antitumoral, camundongas Swiss receberam inóculo celular na densidade de $1 \times 10^7/100 \mu\text{L}$, *i.p.* e foram tratadas

com PBS ou P1G10 (1, 3 ou 5 mg/kg) por 10 dias, a partir do 3º dia do experimento. Ao término do tratamento os animais foram sacrificados e tiveram o líquido ascítico puncionado onde a celularidade foi mensurada. A Figura 5 mostra que a administração de P1G10 causou uma diminuição da celularidade presente no líquido ascítico, sendo que na dose de 5 mg/kg, esta diferença foi estatisticamente diferente do grupo controle. O número total de células alcançado ao final do tratamento dos animais tratados com a dose de 5 mg/Kg foi de $6,31 \pm 0,70 \times 10^7$ células/ mm³ ($p < 0,05$), representando um decréscimo de 40,2 %, quando comparado ao grupo controle ($10,56 \pm 1,13 \times 10^7$ células/mm³, One Way ANOVA, pós teste de Dunnet). Os animais foram pesados a cada 48 horas para ajuste da concentração da solução não havendo diferenças significativas entre os grupos avaliados (dados não mostrados).

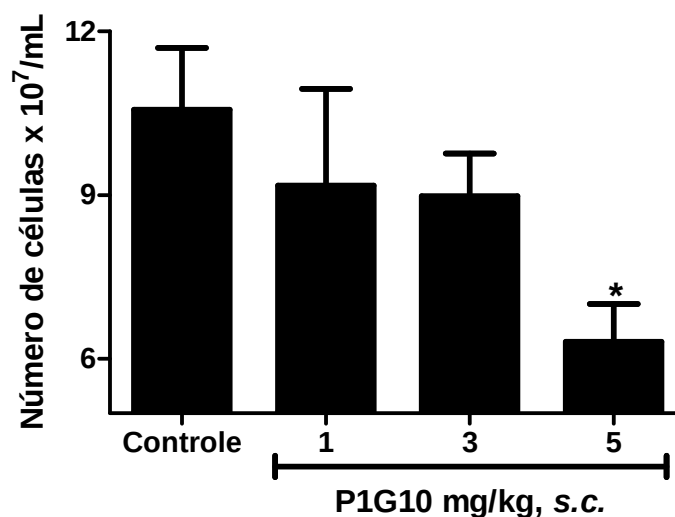


Figura 5: Avaliação da atividade antitumoral da fração P1G10 contra carcinoma de Ehrlich ascítico. Camundongas Swiss foram inoculadas com $10^7/100 \mu\text{L}$ de células de carcinoma de Ehrlich na cavidade peritoneal. Após 3 dias da inoculação, os animais receberam o tratamento com salina (controle) ou P1G10 (1, 3 e 5 mg/kg) via s.c., sendo este continuado por 10 dias. Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados e a celularidade do líquido ascítico, mensurada. Os resultados são mostrados como média $\pm$ e.p.m. do número de células/mm³ de 10 animais. *Indica resultado diferente estatisticamente do Controle, $p < 0,05$ (One Way ANOVA seguida de pós-teste Dunnet).

4.4 Avaliação do efeito de P1G10 sobre a sobrevivência de animais portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich

Na avaliação da sobrevida dos animais portadores do carcinoma de Ehrlich ascítico e tratados com P1G10, foi feita a observação e contagem dos óbitos durante 30 dias após a inoculação tumoral. Os dados obtidos foram expressos graficamente pela curva de sobrevivência de Kaplan-Méier e os resultados comparados entre si pelos testes de Wilcoxon, Harrington-Fleming e Longrank (Figura 6), quando é possível verificar que não aparecem diferenças significativas entre os grupos analisados. As 9 primeiras mortes ocorreram no 17º dia, sendo 4 no grupo controle, 3 e 2 nos grupos tratados com P1G10 nas doses de 3 e 1 mg/kg, respectivamente. As demais mortes em todos os grupos foram gradativas, atingindo a totalidade no 30º dia. No entanto, ainda pelo gráfico, observamos uma maior sobrevida dos animais tratados com P1G10 5 mg/kg, porém, como já mencionado, sem diferença estatística significativa. Nessa dose, o primeiro óbito foi registrado no 19º dia, dois dias após esses registrados nos demais grupos. A totalidade das mortes ocorreram no 23º, 27º e 30º dias nos grupos controle, 1, 3 e 5 mg/kg.

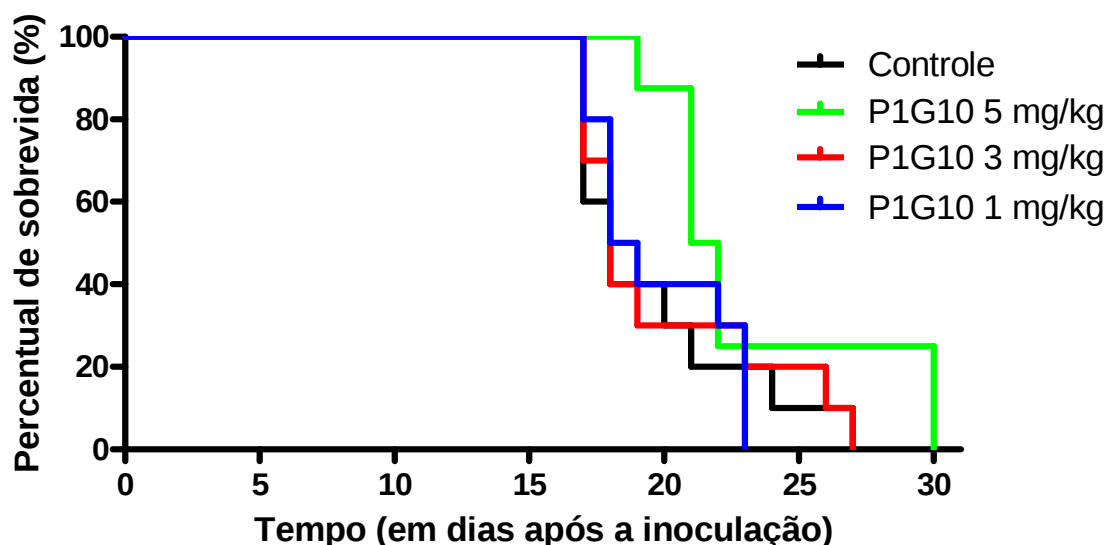


Figura 6: Representação gráfica segundo Kaplan-Meier das curvas de sobrevivência dos grupos de animais inoculados com o carcinoma ascítico de Ehrlich e tratados com PBS (controle) ou P1G10 (1, 3, 5 mg/Kg). Camundongas Swiss foram inoculadas com 10^7 células de carcinoma de Ehrlich, via *i.p.* O tratamento se iniciou 3 dias após a inoculação de células e perdurou por 10 dias, a partir de quando os animais foram mantidos em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, água e ração *ad libitum* e os óbitos foram contabilizados diariamente. Para as análises estatísticas foram utilizados os testes de Longrank, Wilcoxon e Harrington-Fleming, sem diferença estatística, $p = 0,519$ teste de Longrank e $p = 0,502$ teste de Harrington-Fleming.

4.5 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do Sal de Tetrazolium (MTT)

A citotoxicidade da fração proteolítica P1G10 foi avaliada sobre células de Carcinoma de Ehrlich, usando o método da metabolização do MTT. Os resultados dessa análise, mostrados na Figura 7A, indicam que a fração P1G10 apresentou uma atividade citotóxica significativa, dose dependente, sobre células de Ehrlich, sendo as inibições de viabilidade de 33, 47, 75 e 80% para as concentrações de 10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} e 10^{-4} g/mL, respectivamente. Através da análise por regressão linear (Figura 7B), verificou-se que a fração exibiu um valor de IC_{50} de 6,9 μ g/mL.

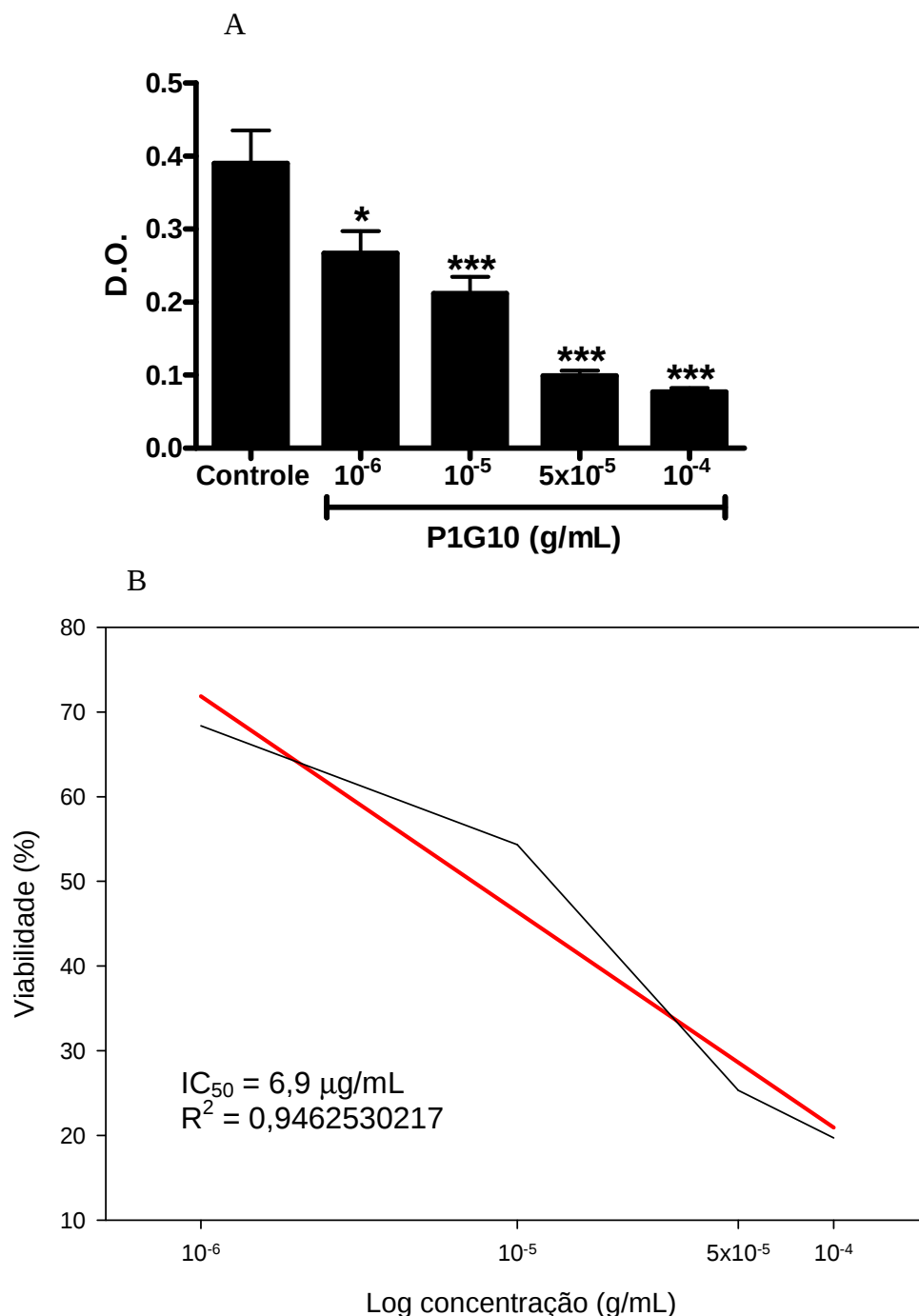
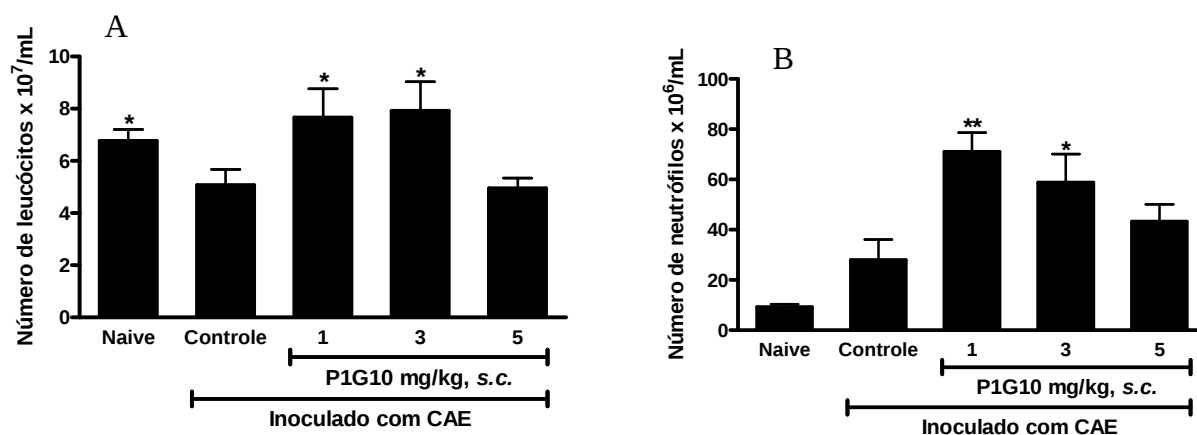


Figura 7. Avaliação *in vitro* do efeito citotóxico de P1G10 contra células carcinoma de Ehrlich. Células de tumor de Ehrlich foram semeadas em placas de 96 cavidades, na densidade de 1×10^6 células/100 µL/cavidade. Após 48 horas, foram expostas a diferentes concentrações de P1G10 (10^{-6} a 10^{-4} g/mL). Após 72 horas de exposição, foi feita a avaliação da viabilidade celular, pelo teste do MTT. No gráfico são mostrados os valores das densidades óticas (D.O.) obtidas para cada concentração (A). Seguindo-se a conversão dos dados (D.O.) para porcentagem de viabilidade em relação ao grupo controle (considerado 100% de viabilidade), foi realizada análise de regressão linear, a partir da qual foi determinada a IC₅₀ (B). * Indica resultados significativos em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$, One Way ANOVA com pós teste Bonferroni).

4.6 Contagem global e diferencial de leucócitos.

Os resultados obtidos na contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico de animais portadores de tumor de Ehrlich ascítico estão mostrados na Figura 8. Como se pode observar na Figura 8A no grupo controle tratado apenas com PBS houve uma redução do número de leucócitos ($5,1 \pm 0,61 \times 10^7$ células/mL) em sangue periférico, em comparação ao grupo Naive ($6,8 \pm 0,34 \times 10^7$ células/mL). A administração de P1G10 promoveu um aumento significativo no número de leucócitos totais, nas doses de 1 ($7,66 \pm 1,10 \times 10^7$ células/mL) e 3 mg/kg ($7,92 \pm 1,12 \times 10^7$ células/mL), em relação ao grupo controle ($5,1 \pm 0,61 \times 10^7$ células/mL - One Way ANOVA, pós teste de Dunnett), alcançando os níveis dos animais Naive.

Pela contagem diferencial, observa-se que o tratamento com P1G10 promoveu um aumento significativo de neutrófilos (Figura 8B), em relação ao grupo controle ($27,87 \pm 8,13 \times 10^6$ células/mm³, ANOVA, pós teste Dunnett), nos grupos tratados com 1 mg/kg ($70,92 \pm 7,60 \times 10^6$ células/mm³) e 3 mg/kg, ($58,71 \pm 11,33 \times 10^6$ células/mm³). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas no número de linfócitos (Figura 8C), eosinófilos (Figura D), monócitos (Figura 8E) e basófilos (Figura 8F) entre os grupos avaliados. A dose de 1mg/kg levou a um aumento significante estatisticamente do número de precursores de neutrófilos (Figura 8G).



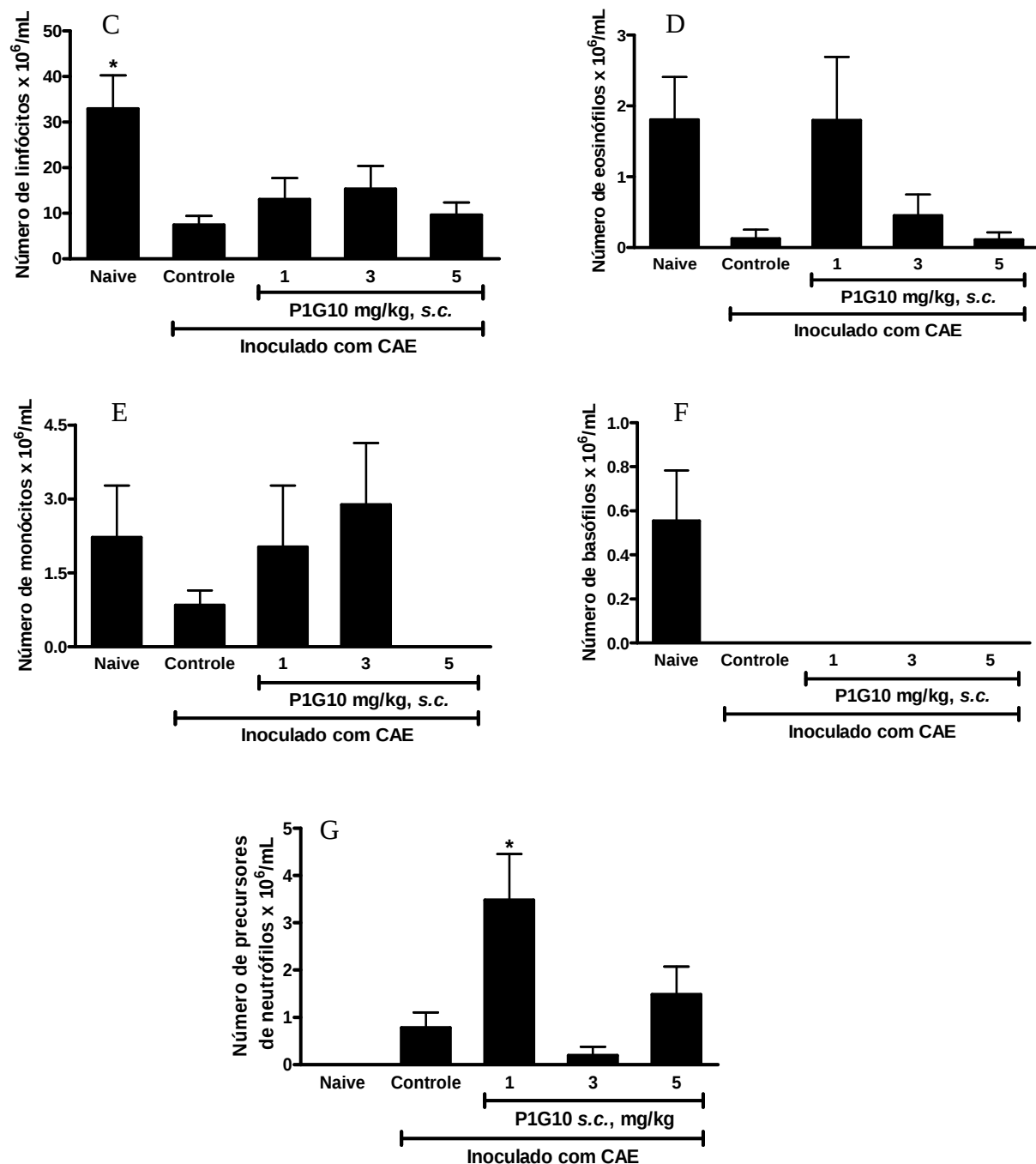


Figura 8. Determinação dos níveis de citocinas no sobrenadante do líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico, tratados com a fração proteolítica P1G10. Efeito *in vivo* da injeção s.c de fração proteolítica obtida a partir do primeiro pico cromatográfico (P1G10) de *C. candamarcensis* sobre os níveis de VEGF (A), TNF- α (B), TGF- β 1 fração total (C) e ativa (D) após 10 dias de tratamento. A dosagem foi realizada pelo método ELISA com o kit R&D Systems. O líquido ascítico de animais tratados por 10 dias foi coletado e o sobrenadante utilizado para a dosagem. Os resultados foram comparados com grupo tratado com PBS. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão de todos os animais do grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ ANOVA, pós teste de Student Newman-Keuls.

4.7 Determinação do número de células da medula óssea

Após 10 dias de tratamento com PBS ou P1G10 (1 mg/kg), os animais portadores do tumor de Ehrlich foram sacrificados e tiveram os fêmures retirados para a aferição da quantidade de células presentes na medula óssea. A Figura 9 mostra que a administração de P1G10 causa uma diminuição desse número ($2,8 \pm 0,4 \times 10^6$ células/ mm^3), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$, teste t de Student, controle - $4,3 \pm 0,7 \times 10^6$ células/ mm^3), representando um decréscimo de 34,9%.

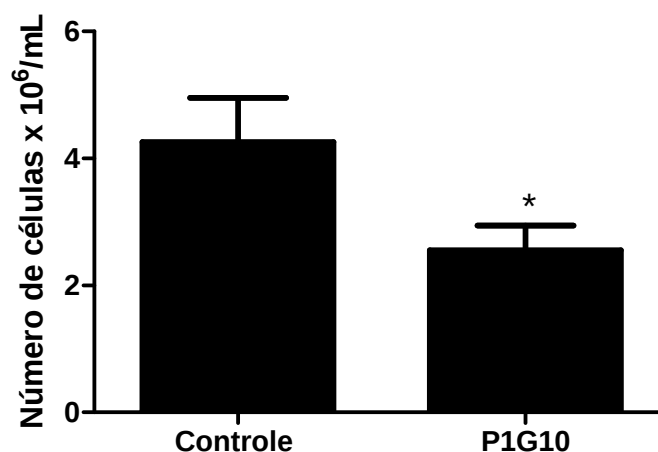


Figura 9. Efeito do tratamento com a fração P1G10 de *C. candamarcensis* sobre o número de células em medula óssea de camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich ascítico. Camundongas Swiss foram inoculadas com 1×10^7 células na cavidade peritoneal. A partir do 3º dia, após a inoculação, os animais foram tratados com PBS ou P1G10 (1mg/kg), por via subcutânea. O tratamento durou 10 dias, após os quais, os animais sacrificados e seus fêmures removidos para contagem de células presentes na medula óssea. Os resultados são mostrados como média $\pm$ e.p.m. do número de células x $10^6/\text{mm}^3$. * Indica resultado estatisticamente diferente do grupo controle, para $p < 0.05$, ANOVA – pós teste de Student Newman-Keuls

4.8 Dosagens dos níveis das citocinas VEGF, TGF- β e TNF- α .

As dosagens das citocinas VEGF, TNF- α e TGF- β total e ativa foram feitas utilizando-se o sobrenadante obtido após a centrifugação do líquido ascítico dos animais portadores de carcinoma de Ehrlich, tratados por 10 dias com a fração P1G10.

Quanto aos níveis de VEGF, como mostrado na Figura 10 A, houve um aumento destes nas camundongas tratadas com as doses de 3mg/kg ($914,54 \pm 13,15$ pg/mL) e 5 mg/kg ($931,98 \pm 16,03$ pg/mL) de P1G10, o que foi significativamente maior ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente) quando comparado ao grupo controle ($838,68 \pm 25,64$ pg/mL – ANOVA, pós teste Student Newman-Keuls).

Já quanto aos níveis de TNF- α houve uma redução significativamente relevante e inversamente proporcional ao aumento de VEGF (Figura 10 B). Nos animais tratados com as doses de 3 e 5 mg/kg, observaram-se reduções de 34,8% ($22,30 \pm 2,78$, $p < 0,05$) e 52,4% ($16,28 \pm 3,60$, $p < 0,01$), respectivamente, em relação ao controle ($34,24 \pm 3,19$ – ANOVA, pós teste Student Newman Keuls). Na figura 10 C, podemos observar que para os níveis de TGF- β 1 total não houve diferença entre os grupos tratados e o controle, porém quando realizamos as dosagem da fração ativa do TGF- β 1 (Figura 10D), houve um aumento significativo, de 12,2%, no grupo tratado com a dose de 5 mg/kg ($108,13 \pm 4,39$ pg/mL), quando comparado ao grupo controle ($96,34 \pm 4,18$ pg/mL, $p < 0,05$, ANOVA, pós teste Student Newman Keuls).

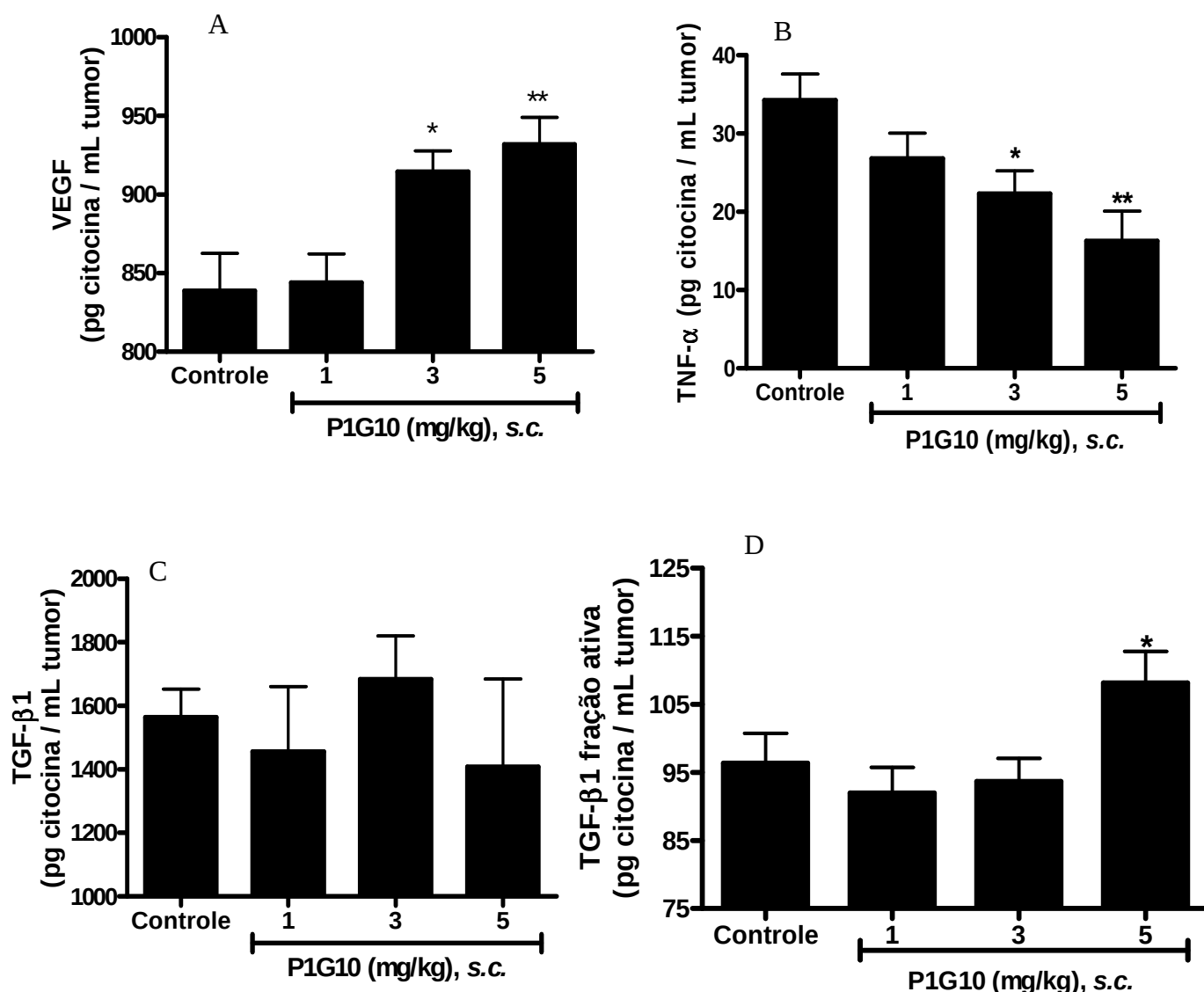


Figura 10: Determinação dos níveis de citocinas no sobrenadante do líquido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico, tratados com a fração proteolítica P1G10. Efeito *in vivo* da injeção s.c de fração proteolítica obtida a partir do primeiro pico cromatográfico (P1G10) de *C. candamarcensis* sobre os níveis de VEGF (A), TNF-α(B), TGF-β1 fração total (C) e ativa (D) após 10 dias de tratamento. A dosagem foi realizada pelo método ELISA com o kit R&D Systems. O líquido ascítico de animais tratados por 10 dias foi coletado e o sobrenadante utilizado para a dosagem. Os resultados foram comparados com grupo tratado com PBS. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão de todos os animais do grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ ANOVA, pós teste de Student Newman-Keuls.

4.9 Avaliação do efeito de P1G10 sobre a resposta humoral de animais portadores de carcinoma de Ehrlich ascítico

A resposta humoral foi avaliada pela dosagem de IgM e IgG através da reação de ELISA, em soro de animais tratados durante 11 dias com P1G10 e imunizados com a suspensão de hemácias de carneiro íntegras em densidade padronizada (SRBC). Os resultados deste ensaio estão apresentados na Figura 11, onde se pode verificar que neste estudo de fase aguda, os níveis de IgM e IgG dos animais tratados com P1G10 não apresentaram diferença estatisticamente significativa em comparação com seus respectivos controles.

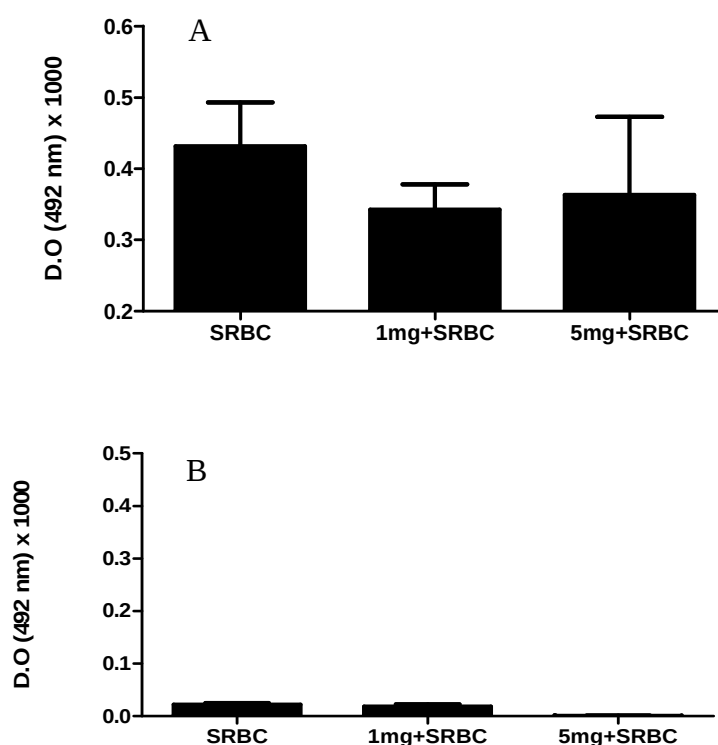


Figura 11: Determinação imunoenzimática de IgM (A) e IgG (B) em animais portadores do carcinoma de Ehrlich tratados com a fração P1G10. A dosagem de IgM e IgG foi realizada pelo método ELISA e a leitura obtida 492 nm. OS soroS dos animais tratados (P1G10 1mg/kg e 5mg/kg) e imunizados (SRBC) foram coletados e utilizados para a dosagem de IgM e IgG na diluição de 1:25. Os resultados foram comparados entre os grupos imunizados e tratados com PBS. Cada valor representa a absorvância média $\pm$ e.p.m. (n=35) de todos os animais do grupo (ANOVA, pós teste

de Newman-Keuls). SRBC- suspensão de hemácias de carneiro íntegras em densidade padronizada.

4.10 Avaliação da atividade proliferativa de P1G10 sobre linfócitos obtidos de baços de animais portadores de carcinoma de Ehrlich ascítico

Os animais portadores de tumor ascítico foram tratados por 11 dias com P1G10 (1 e 5 mg/kg), sendo sacrificados e seus baços retirados para a obtenção de linfócitos. Essas células foram submetidas ao tratamento *in vitro* com Concanavalina A (40 µg/mL) ou P1G10 (10 µg/mL) + Concanavalina A (40 µg/mL) e tiveram a viabilidade medida pelo ensaio do MTT. No grupo de animais que recebeu P1G10 na dose de 1 mg/Kg, não se observou diferença estatisticamente significativa. Entretanto, o grupo de animais que recebeu P1G10 na dose de 5mg/kg e foi estimulado com o mitógeno e a fração P1G10 apresentou uma densidade óptica média de $0,42 \pm 0,01$, o que foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle que apresentou densidade óptica média de $0,36 \pm 0,01$ (Concanavalina A) (Figura 12).

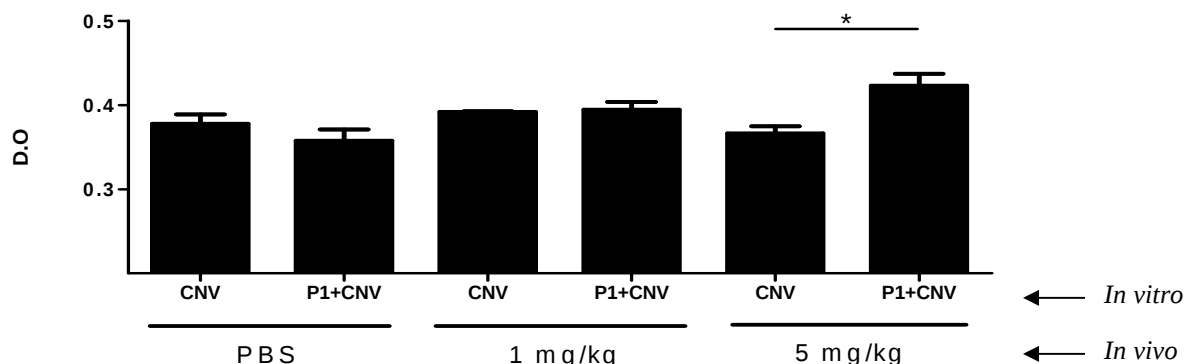


Figura 12: Avaliação da resposta proliferativa de P1G10 sobre linfócitos esplênicos de animais portadores do carcinoma de Ehrlich tratados com fração proteolítica. Após 14 dias de tratamento (1 ou 5 mg/kg) os animais foram sacrificados e os baços foram retirados. Os linfócitos esplênicos foram incubados em triplicata por 72 horas com Concanavalina A (40 µg/mL) e com ou sem P1G10 (10 µg/mL) em meio RPMI-1640. A medida foi realizada pelo método do MTT. Os resultados dos grupos que receberam P1G10 e Concanavalina A, *in vitro*, foram comparados com os respectivos grupos que receberam apenas Concanavalina A. Cada valor representa a média ± e.p.m. (ANOVA, pós teste de Newman-Keuls). D.O= densidade óptica, PBS = phosphate buffered saline; P1 = P1G10 10 µg/mL; CNV= Concanavalina A 40 µg/mL.

4.11 Avaliação da atividade antitumoral em animais portadores do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica quando estes são pré tratados com a fração P1G10

Nesta avaliação, os animais foram pré-tratados por 10 dias (1 ou 5 mg/kg) e, então, receberam inóculo celular na densidade de $10^7/100 \mu\text{L}$, via *i.p.* Após 10 dias da inoculação, os animais foram sacrificados e o líquido ascítico puncionado, para medida da celularidade. A Figura 13 mostra que a administração de P1G10 causa uma diminuição da celularidade presente no líquido ascítico, sendo esta diferença estatisticamente significativa para ambas as doses. O número de células dos camundongos pré tratados com 1 e 5

mg/kg foi de $11,14 \pm 0,5$ ($p < 0,001$, redução de 21,93%) e $10,64 \pm 0,33 \times 10^7$ ($p < 0,001$, redução de 25,44%) células/ mm^3 , respectivamente, sendo o do grupo controle tratado com PBS de $14,27 \pm 0,67 \times 10^7$ células/ mm^3 (ANOVA, pós teste de Bonferroni).

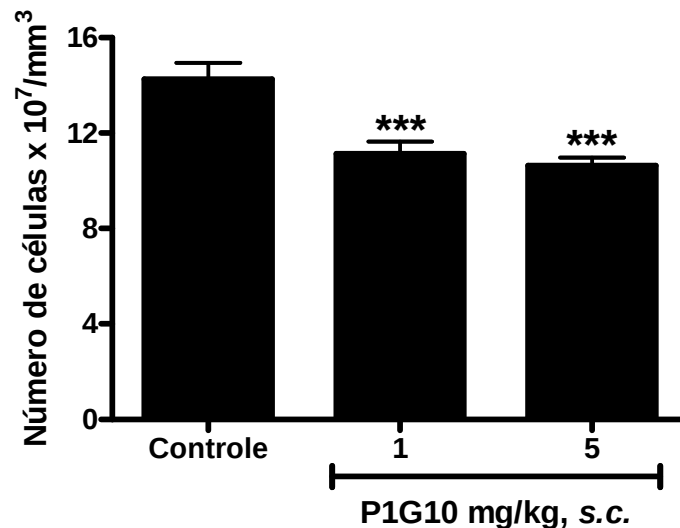


Figura 13: Efeito do pré-tratamento com fração P1G10 sobre o número de células tumorais de animais portadores de carcinoma de Ehrlich ascítico. Camundongas Swiss foram submetidas ao pré-tratamento com PBS ou P1G10 (1 e 5 mg/kg) por 10 dias antes da inoculação de células de carcinoma de Ehrlich 10^7 células/ $100\mu\text{L}$, *i.p.*. Após a inoculação foi aguardado um período de 10 dias sem tratamento para o desenvolvimento do tumor. A quantidade de células foi mensurada após os 20 dias do início do experimento. Cada coluna representa a média $\pm$ e.p.m. de $n = 30$. *** Indica resultado estatisticamente diferente do grupo controle com $p < 0,001$ (ANOVA, pós teste de Bonferroni).

5. Discussão

Nós recentemente demonstramos, *in vivo*, a eficácia antitumoral da fração P1G10 evidenciada pela redução da massa tumoral em modelo de melanoma murino B16F1 e pela redução do percentual de ocorrência e do número de pontos de metástase em modelo metastático B16F10, com aumento do tempo de sobrevivência para ambos os modelos (FIGUEIREDO, 2009). Considerando que outras cisteíno proteases e em particular a bromelina, vem demonstrando atividades antiinflamatória, antitumoral e imunológica (BEUTH et al., 2008), nos interessamos em examinar os efeitos antitumorais e os sobre o sistema imune de P1G10, de forma a tentar elucidar seu mecanismo de ação, com essa finalidade foi escolhido o carcinoma de Ehrlich ascítico, que é descrito como um modelo tumoral que causa alterações no sistema imune do hospedeiro (YASUHIRA, 1966; SOEDA, 1967; OKUBO, 1971; JAKÓBISIAK et al., 1982; OLINESCU et al., 1983; ATTIA et al., 2008 MANDAL e PODDAR, 2008).

Neste estudo nós avaliamos as atividades antitumoral e imunomodulatória de P1G10 sobre camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich. Inicialmente, foram obtidas e caracterizadas amostras de P1G10. Os resultados ilustrados nas Figuras 1 e 2 mostram que a fração recuperada após a separação cromatográfica foi essencialmente de P1G10. Como observado na Figura 1, houve a separação nítida em dois picos de acordo com o perfil protéico, P1G10 e P2G10. As separações cromatográficas foram feitas em diferentes amostras e com látex colhidos em diferentes períodos, sendo observada a manutenção dos perfis eletroforéticos em gel SDS/PAGE, com as principais bandas protéicas de variando de 23 a 27 kDa (Figura 2). Esses resultados indicam que o método de separação cromatográfica utilizado é reproduzível e que a manutenção da constituição protéica independe de fatores como a época de colheita do látex e tempo de armazenamento das amostras. Dessa forma, separamos um lote de P1G10 com quantidade suficiente para desenvolver o presente estudo (4,23 g).

Nas avaliações de atividade antitumoral de P1G10 em variações do modelo de tumor de Ehrlich, nossos resultados revelaram uma significativa

redução em volume e massa para a forma sólida (3 mg/kg, s.c.) e em celularidade para a forma ascítica (5 mg/kg, s.c.) (Figuras 3, 4 e 5).

Está descrito que cisteíno proteases endógenas que são expressas e reguladas em microambientes definidos, com respostas complementares e frequentemente contraditórias, dependem do sistema biológico examinado e, geralmente, estimulam a angiogênese e crescimento tumoral. Quando advém de uma fonte exógena, e são administradas as cisteíno proteases tem diversas atividades farmacológicas e contraditoriamente exibem atividades antitumorais (GUIMARÃES-FERREIRA et al., 2007).

A administração de extrato de plantas com alta concentração de enzimas proteolíticas com diferentes finalidades terapêuticas é originária da medicina tradicional das Américas Central e do Sul (LEIPNER e SALLER, 2006). Outras enzimas proteolíticas de origem vegetal tal como, a papaína, a bromelina e a fastuosaina, já demonstraram atividade antitumoral. A bromelina mostrou eficácia antimetastática, e inibiu o crescimento e invasão de células tumorais em doses que variaram entre 12 e 50 mg/kg (METZIG et al., 1999; TYSNES et al., 2001; BAEZ et al., 2007) em diferentes modelos tumorais. A fastuosaina demonstrou atividade *in vivo* e *in vitro* contra melanoma murino (GUIMARÃES-FERREIRA et al., 2007) e o efeito protetor da papaína, sozinha ou associada com a tripsina e quimiotripsina, contra melanoma, também já foi descrito (BELLELLI et al., 1990; WALD et al., 1998). Porém, o mecanismo envolvido nessa proteção contra o câncer, ainda é pouco compreendido.

Quanto à medida de sobrevivência de camundongas portadoras do tumor de Ehrlich ascítico, no grupo tratado com 5 mg/kg de P1G10 foi observada uma maior sobrevida não havendo mortes até o 19º dia enquanto que, nos demais grupos as mortes tiveram início no 17º dia. No entanto, esse aumento de sobrevida não foi estatisticamente significativo. O tratamento com bromelina levou a um aumento significativo do tempo de sobrevida de camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich, sendo que os autores atribuem esse efeito a redução do crescimento tumoral (BAEZ et al., 2007). O fato de observarmos atividade antitumoral sobre tumor de Ehrlich, tanto em tumor sólido quanto ascítico, e não constatarmos um aumento significativo de sobrevida nos animais com tumor ascítico tratados com P1G10 pode não ter ocorrido em função das condições experimentais. Nos protocolos descritos na

literatura podemos encontrar a administração intraperitoneal de células tumorais variando entre 1×10^6 e 5×10^6 /animal (SAAD-HOSSNE et al., 2003; ASSIS et al., 2007). No estudo de sobrevida foram administradas 1×10^7 células/animal, o que pode ter sido motivo para um desenvolvimento mais agressivo do tumor e, portanto, inviabilizar a observação de alguma alteração na sobrevida dos animais. Em especial, ao compararmos nosso resultado com o encontrado por BAEZ et al. (2007), que utilizaram o tratamento com bromelina, salientamos que a via utilizada foi a intraperitoneal, ou seja, a protease esteve em contato direto com as células tumorais, diferentemente de P1G10 que foi administrada por via subcutânea. Por outro lado, resultados do nosso grupo de pesquisa mostram que P1G10 (5 mg/kg) sobre modelos de melanoma metastático (B16F10) e não metastático (B16F1) produz significativo aumento de sobrevida de camundongos C57BL6, assim como descrito por WALD et al., (2001) que demonstraram o aumento do tempo de sobrevivência para camundongos C57BL6 portadores de melanoma B16F10 tratados com a mistura enzimática (tripsina, quimiotripsina e papaína).

Diversas espécies da família das Caricaceae, tem sido utilizadas contra uma variedade de enfermidades como úlcera gástrica (MELLO et al., 2008) queimaduras (GOMES et al., 2010) e malária (MUNOZ et al., 2000), dentre outras. Existem alguns estudos que trazem a utilização de produtos de *Carica papaya* na terapia do câncer, porém não tem sido descrito o efeito inibitório sobre tumores de qualquer outro membro da família Caricaceae.

A partir da constatação da atividade antitumoral da fração P1G10 no modelo em estudo, seguimos na tentativa de demonstrar possíveis mecanismos de ação. P1G10 teve a atividade citotóxica mensurada pelo método de MTT, sendo determinada uma IC50 de 6,9 $\mu\text{g/mL}$ sobre a cultura das células do carcinoma de Ehrlich (Figura 7). De acordo com RIESER et al., (1996), para extratos de plantas não purificados, os valores de IC50 inferiores a 20 $\mu\text{g/mL}$ são considerados ativos, enquanto que para compostos puros, estes valores devem ser inferiores a 4 $\mu\text{g/mL}$ (aproximadamente 10^{-6} M). Levando em conta essas referências, podemos indicar uma importante atividade citotóxica de P1G10, considerando que esta amostra não é um composto puro. Dados de literatura mostram que a bromelina também apresentou valor de IC50 dentro da faixa estabelecida para agentes citotóxicos sobre células de adenocarcinoma

mamário (16 µg/mL) (BAEZ et al., 2007). Porém, o mesmo não ocorreu sobre as linhagens de melanoma B16F10 e Ehrlich, cujos valores de IC50 foram maiores que 31 µg/mL (BAEZ et al., 2007). Por outro lado, estudos anteriores sobre linhagens de melanomas murinos não metastático (B16F1) e metastático (B16F10) mostraram que o efeito antitumoral e antimetastático, respectivamente, de P1G10, provavelmente, não advém da sua atividade citotóxica, uma vez que a IC50 determinada foi de aproximadamente 30 µg/mL. Assim, nossos resultados sugerem a participação da citotoxicidade como um dos mecanismos de ação de P1G10 sobre o tumor de Ehrlich, não descartando a possibilidade de existirem outros mecanismos envolvidos.

Uma variedade de substâncias, como polissacarídeos, lectinas, peptídeos, saponinas, óleos e outras, oriundas de plantas foram descritas como capazes de estimular o sistema imune, apresentando atividade imunomoduladora (DAVIS e KUTTAN, 2000). Para avaliar os efeitos sobre o complexo e dinâmico sistema imune, é necessário a utilização de métodos padronizados e seguros, estudos que antes eram realizados somente pela histopatologia dos órgãos linfóides (KAWABATA, 1995), atualmente são realizados através da resposta linfoproliferativa (resposta celular) e pela determinação de anticorpos específicos (resposta humoral) (HERZYK e GORE, 2004). A avaliação da resposta celular e humoral é sugerida pelo FDA (Food and Drugs Administration, USA), por possuir maior valor preditivo à toxicidade humana que as metodologias anteriormente utilizadas (OLSON et al., 2000).

A resposta imune humoral foi aqui avaliada através da determinação imunoenzimática dos níveis das imunoglobulinas IgM e IgG, em estudo agudo, após a estimulação do sistema imune com hemácias de carneiro (SRBC) e administração de P1G10 em um protocolo que durou 15 dias (Figura 11). Avaliações de imunização de animais com suspensão de hemácias de carneiro íntegras em concentração padronizada são amplamente descritas na literatura (VAN LOVEREN et al., 1991; KUTTAN et al., 1992; TEMPLE et al., 1993; ZIAUDIDIN et al., 1993; JAFARZADEH et al., 2009; HANIEH et al., 2010; WHITE et al., 2010).

Neste estudo, a imunização foi constatada pelo aumento dos níveis de IgM, no entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos de animais (SRBC, P1G10 1mg/kg+SRBC, P1G10

5mg/kg+SRBC) , portadores de tumor imunizados e tratados com P1G10. Os níveis de IgG, por sua vez, não foram suficientes para se verificar qualquer alteração em relação ao estímulo utilizado o que pode ser justificado pela cinética da produção entre as classes de imunoglobulinas. A produção de IgM pode ser detectada nos primeiros dias após o estímulo, enquanto que a IgG somente apresentaria níveis detectáveis após este período. (KOGANEI et al., 2007). O estudo de fase crônica (30 dias) não foi realizado, porque, as primeiras mortes ocorreram no 17º dia, nos grupo controle, e nos grupos tratados com P1G10 nas doses de 3 e 1 mg/kg (Figura 6), então ao final de 30 dias correríamos o risco de não haver animais sobreviventes para esta avaliação.

O modelo de imunização com hemácias de carneiro, como já comentado, é amplamente utilizado na avaliação da resposta humoral tendo se mostrado eficaz. Como exemplo, podemos citar o trabalho de PRATHEESHKUMAR e KUTTAN (2010) e de HAINEH et al. (2010), que detectaram atividade estimulatória utilizando o extrato metanólico da *Vernonia cinera* O. Hoffm. 1988 e o outro utilizando suplemento a dieta de aves com *Ipomoea batatas* Lamarck 1808, enquanto que, JAFARZADEH et al. (2009) comprovou que a saliva exposta a fumaça do cigarro tem profundo efeito imunossupressor. Todos utilizando as mesmas técnicas utilizadas neste estudo.

Conforme resultado da resposta linfoproliferativa apresentado na Figura 12, se observa que naqueles grupos tratados com P1G10 e que receberam Concanavalina A, houve alteração significativa, somente no grupo de animais tratados com a dose de 5 mg/Kg. Portanto, embora a fração P1G10 não exerça influência na resposta imunológica humoral na fase aguda, ela parece interferir na resposta imunológica celular. Resultados similares já foram descritos utilizando extrato de *Viscum album* Linnaeus 1753 (KUTTAN e KUTTAN, 1992), que estimulou a imunidade em animais normais e portadores de tumor. KUMAR et al. (1994) descreveu uma atividade imunoestimulatória de uma preparação herbal usada por populações orientais, em animais portadores de tumores.

Na literatura são descritas proteases como capazes de estimular a proliferação celular em mamíferos. A trombina e a tripsina, serino proteases,

são exemplos de estimuladores de proliferação celular através da ativação dos receptores PARs (Proteinases Activated Receptors) que levam a ativação da via das MAP quinases (KAWABATA, 2003). O estímulo desta via por cisteíno proteases não pertencentes a mamíferos, já foi descrito. A gingipaína, uma cisteíno protease sintetizada pela bactéria *Porphyromonas gingivalis*, considerada como uma das principais causadoras de periodontite, é capaz de induzir as células epiteliais locais a liberarem a interleucina pró-inflamatória IL-6, num processo dependente da clivagem de PAR-1 e PAR-2 com a ativação de MAP-quinases (LOURBAKOS et al., 2001).

Estudos anteriores do grupo, com proteases purificadas a partir da fração P1G10, apresentaram atividade mitogênica sobre fibroblastos L929 através da ativação de ERK-2, mostrando a participação da via das MAP-quinases neste efeito (GOMES et al., 2005). Outra possibilidade seria a atuação direta das proteases em receptores de fatores de crescimento, tais como os de EGF e de PDGF. Estes receptores também podem ser ativados via MAP-quinases e exercer assim a modulação de genes ligados à proliferação celular. A presença de EGF em plantas não foi documentada, porém em um trabalho foi descrita a presença de receptor transmembrânico para EGF em *Rabidopsis thaliana* (KOHORN et al., 1992), abrindo precedentes para a presença de fatores de crescimento similares ao EGF em plantas.

Explorando as atividades imunomodulatórias de P1G10, foi avaliado ainda, o quantitativo de células na medula óssea e no sangue periférico (leucócitos), assim como, a análise diferencial deste último em animais portadores do tumor de Ehrlich. Após 10 dias de desenvolvimento do carcinoma ascítico de Ehrlich, houve uma redução do número de leucócitos no sangue periférico, corroborando com os resultados de PARHAR e LALA (1985, 1988), NELSON e colaboradores (1990), PARKER e PRAGNELL (1995). A administração de P1G10 (1 ou 3 mg/kg) em animais portadores de tumor fez com que o número de leucócitos circulantes voltasse aos níveis dos animais sem tumor e sem tratamento (Figura 8). Esses resultados sugerem uma atividade moduladora de P1G10 sobre a quantidade de leucócitos na circulação, seja pela manutenção desse número ou pelo aumento da liberação das células pela medula. Em paralelo, os animais portadores de tumor e tratados com P1G10 (1 mg/kg) tiveram uma redução estatisticamente

significativa no número de células da medula óssea, (Figura 9). Essa modulação na quantidade de células da medula óssea corrobora com o acima proposto sobre a quantidade de leucócitos na circulação. Diversos estudos têm demonstrado efeitos sobre a medula óssea de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com extratos de diferentes plantas e compostos (*Chlorella vulgaris*, *Pluchea quitoc* e titanocenos) (QUEIROZ et al., 2001; ZIAUDIDIN et al., 1971; YMOORE et al., 1992). O extrato de *W. somnifera*, uma planta bastante usada na medicina tradicional da Índia foi capaz de aumentar a contagem de células sanguíneas e da medula óssea, aumentando a estimulação da atividade fagocitária de macrófagos, indicando atividade estimuladora desse extrato sobre o sistema hematopoético (AGARWAL et al., 1999; DAVIS e KUTTAN, 2000). Por outro lado, diferentemente do observado com P1G10, a literatura descreve que as substâncias que aumentam a quantidade de leucócitos também aumentam a quantidade de células em medula óssea (DAVIS e KUTTAN, 1998; DAVIS e KUTTAN, 2000; RASOOLA e VARALAKSHMI, 2006).

Contudo, na dose de 5mg/kg observou-se a atividade antitumoral sem qualquer efeito sobre o número de leucócitos (Figuras 5 e 8). Isso nos dá subsídios para descrever dois efeitos independentes, sendo um a atividade moduladora da quantidade de leucócitos na circulação e outro, a atividade citotóxica propriamente dita. Vale salientar que o modelo animal de tumor ascítico oferece limitações quanto ao tempo de tratamento, que no caso da avaliação da atividade antitumoral, fica restrito a 10 dias, considerando a totalidade dos animais vivos. Nesse período, é possível que na dose de 5 mg/kg de P1G10 a ação citotóxica prevaleça e que nas doses menores (1 e 3 mg/kg) somente se observe a atividade de reversão da leucopenia provocada pelo carcinoma de Ehrlich. Podemos supor que se o período de tratamento fosse maior, teríamos uma atividade antitumoral também nessas últimas doses, por um efeito citotóxico cumulativo e ou através da estimulação do sistema imune celular.

Na continuidade do estudo da capacidade imunomodulatória de P1G10, nossos resultados demonstram que o tratamento com a fração levou a alteração da produção de diversas citocinas. Houve uma significativa redução dos níveis plasmáticos de TNF- α , um aumento expressivo de VEGF e TGF- β

fração ativa. O TNF- α é uma citocina expressa por células envolvidas com o processo inflamatório (neutrófilos, linfócitos ativados, células “natural killer” (NK), células endoteliais, mastócitos e macrófagos) que sabidamente possui uma potente atividade antitumoral (BARON, et al., 1991; CHA et al., 1999; BORISH et al., 2003) e age sinergicamente sobre as células cancerosas via efeitos necróticos e apoptóticos (SASAGAWA et al., 2000; SUK et al., 2001). Os níveis séricos de TNF- α se apresentam aumentados em casos de severa caquexia, infecções crônicas e estágios avançados de câncer (BORISH et al., 2003). Ao contrário do que poderíamos imaginar, em função de sua atividade antitumoral, a nossa fração promoveu a diminuição dos níveis de TNF- α (Figura 10B). Acreditamos que a eficácia antitumoral/citotóxica no grupo de animais tratados com a dose de 5 mg/Kg provocou a redução dos níveis de TNF- α ou que a fração P1G10 também teria uma ação antiinflamatória, sendo essa última hipótese reforçada pelo aumento do TGF- β fração ativa.

O TGF- β é sabidamente uma citocina imunossupressiva já que exerce um efeito inibitório sobre linfócitos B, linfócitos T-auxiliares e linfócitos citotóxicos, além de inibir a secreção de imunoglobulinas por linfócitos B e a citotoxicidade de fagócitos mononucleares e células natural killer (NK) (BORISH e STEINKE, 2006).

A dose de 5 mg/Kg foi capaz de atuar na ativação do TGF- β , (Figura 10D) e contraditoriamente, a mesma dose provocou uma aumento na atividade de linfócitos (Figura 12). O TGF- β tem múltiplos efeitos sobre uma grande variedade de tipos celulares, sendo esses efeitos essenciais para a homeostasia e para seus efeitos promotores e inibidores do crescimento tumoral (BORISH et al., 2003; BOLLARD e ROONEY, 2008). O sucesso do desenvolvimento do tumor se deve a sua capacidade de se evadir da atividade antiproliferativa do TGF- β , e de se aproveitar de sua capacidade inibitória sobre as células mediadoras da imunidade e de seu efeito estimulatório sobre as células estromais do tumor e angiogênese (BOLLARD e ROONEY, 2008). A terapia oral com enzimas proteolíticas, uma mistura que contém papaína, bromelina, tripsina e quimiotripsina, reduz os níveis de TGF- β , sendo esse em parte seu mecanismo de ação antitumoral (DESSES et al., 2001; PACZEK et al., 2001). Todavia, o tratamento com P1G10, também uma mistura enzimática, não causou redução dos níveis de TGF- β , (Figura 10C) e ainda estimulou a

ativação do mesmo (Figura 10D). Fisiologicamente a ativação do TGF- β acontece pela ação de enzimas proteolíticas, as metaloproteinases (TAYLOR, 2009), talvez a ativação do TGF- β observada em nossos ensaios seja por uma influência de P1G10, já que a mesma se trata de uma mistura enzimática com ação proteolítica.

O VEGF é um mitógeno e fator de crescimento específico de células endoteliais que atua na regulação da proliferação, diferenciação e crescimento vascular. É considerada uma molécula chave na formação de novos vasos sanguíneos e, crescimento e organização do leito vascular (FERRARA, 2000; TOI et al., 2001). O aumento da expressão de VEGF está intimamente relacionado com o aumento da densidade dos microvasos (SENGER et al., 1982). No modelo ascítico de Ehrlich, o VEGF desempenha papel fundamental no acúmulo de fluido e crescimento da ascite tumoral (TEIXEIRA et al., 2006; FERREIRA et al., 2007). Pela secreção de VEGF o tumor ascítico aumenta a permeabilidade de microvasos preexistentes, que revestem a cavidade peritoneal, para estimular a progressão tumoral por meio da formação da ascite (NAGY et al., 1995). A inibição do acúmulo de fluido, crescimento tumoral e redução da densidade de microvasos pela neutralização do VEGF, já foram demonstrados (KIM et al., 1993; BORGSTROM et al., 1996; MESIANO et al., 1998) sublinhando a importância do VEGF nesse processo. Contudo, nossos resultados mostraram um aumento dos níveis de VEGF inversamente proporcional à atividade antitumoral.

Já foi descrito que os neutrófilos podem secretar o VEGF (GAUDRY et al., 1997; TAICHMAN et al., 1997; WEBB et al., 1998), assim o aumento deste fator de crescimento ocasionado pelo tratamento com P1G10 poderia ser devido ao aumento dos leucócitos circulantes, principalmente neutrófilos, observado nas doses de 1 e 3 mg/kg. No entanto, na dose de 5 mg/kg, em que também se observa um aumento dos níveis de VEGF, não foi observado um aumento do número de leucócitos circulantes. Considerando que o VEGF também provoca aumento da permeabilidade vascular (TAMMELA et al., 2005) podemos hipotetizar que, com a dose de 5mg/kg poderia ter ocorrido aumento do número de leucócitos circulantes que, por meio da liberação do VEGF e aumento da permeabilidade vascular ocasionada por este, extravasaram para o peritônio, o que poderia ter impedido a constatação de seu aumento em

sangue periférico. Portanto, a eficácia antitumoral nos animais portadores do carcinoma de Ehrlich e tratados com a dose de 5mg/Kg e o não aumento de leucócitos periféricos nessa dose, poderia estar relacionado ao fato da nossa fração estimular o acúmulo de leucócitos no sítio de desenvolvimento tumoral, via VEGF.

Recentemente tem sido avaliado o papel que o sistema imune desempenha na progressão ou bloqueio do desenvolvimento tumoral (UENO et al., 2007). Tem sido proposto que a resposta sistêmica ao tumor deveria elevar os níveis de leucócitos (JILMA et al., 1999), resposta esta que pode ser inibida pelo tumor (KAPOOR et al., 2005; TAN et al., 2008), e que a presença de linfócitos pode ser importante na resposta antitumoral (IMAGAWA et al., 2004)

Considerando que a nossa fração aumentou a quantidade de leucócitos circulantes, na presença do tumor que a mesma provocou um estímulo da proliferação de linfócitos e modulação dos níveis de citocinas, podemos sugerir uma modulação do sistema imune pela ação da fração do látex de *C. candamarcensis* de maneira que favoreceria a eliminação do tumor. Baseado nessa premissa, e considerando que o estabelecimento do tumor é decorrente de uma falha na imunidade inata/celular, pré-tratamos por 10 dias os animais com a fração com a intenção de melhorar ou aumentar a sua imunidade e, então, inoculamos o tumor ascítico, imaginado que a fração potencializaria a capacidade do sistema imune de reconhecer e inibir o processo neoplásico. Ambas as doses estudadas (1 e 5 mg/kg) apresentaram atividade antitumoral mais significativa que no pós tratamento, corroborando com a proposta de que a modulação do sistema imune possa ser, pelo menos, uma das formas de ação de P1G10 como agente antitumoral.

6. Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o tratamento com P1G10 em camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich apesar de não estimular a imunidade humoral, apresenta uma provável ação sobre a imunidade celular já que tem uma ação sobre os níveis de citocinas e promove a proliferação de linfócitos e eleva os níveis de leucócitos circulantes, além disso apresentou citotoxicidade, reduziu a massa, volume e a celularidade em modelos de carcinoma de Ehrlich, indicando que P1G10 poderia ser um agente antitumoral com propriedades imunomodulatórias.

7. Referências

AGARWAL, R.; DIWANAY, S.; PATKI, P.; PATWARDHAN, B. Studies on immunomodulatory activity of *Withania somnifera* (Ashwagandha) extracts in experimental immune inflammation. **Journal of ethnopharmacology**, v.67, n.1, p.27-35, 1999.

ÁLVAREZ, L.; GIL, A.G.; EZPELETA, O.; JÁLON-GARCIA, J.A.; CERAIN, L. Immunotoxic effects of Ochratoxin a in Wistar rats after oral administração. **Food and chemical toxicology**, v. 42, p. 825-834, 2004.

ASSIS, F.A. Efeito do selênio orgânico e da vitamina E no crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor experimental de Ehrlich. **Dissertação de Mestrado**, 2007, FM-UFMG, 109 p. 2007.

ATTIA, W.Y.; GABRY, M.S.; EL-SHAikh, K.A.; OTHMAN, G.A. The anti-tumor effect of bee honey in Ehrlich ascite tumor model of mice is coincided with stimulation of the immune cells. **The Egyptian journal of immunology / Egyptian Association of Immunologists**, v. 15, n. 2, p. 169-183, 2008.

BÁEZ, R.; LOPES, M.T.; SALAS, C.E.; HERNÁNDEZ, M. In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. **Planta medica**, v. 73, n.13, p.1377-1383, 2007.

BARON, S.; TYRING, S.K.; FLEISCHMANN, W.R.J.R.; COPPENHAVER, D.H.; NIESEL, D.W.; KLIMPEL, G.R.; STANTON, G.J.; HUGHES, T.K. The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v.10, n. 266, p. 1375-1383, 1991

BARTH, M. W.; MORAHAN, P. S. Role of macrophages in the host response to Lewis lung peritoneal carcinomatosis. **Cancer immunology, immunotherapy**, v. 38, p.233-240, 1994.

BELLELLI, A.; MATTIONI, M.; RUSCONI, V.; SEZZI, M.L.; BELLELLEI, L. Inhibition of tumor growth, invasion and metastasis in papain-immunized mice. **Invasion & Metastasis**, v.10, p. 142 – 169, 1990.

BENENCIA, F.; COURRÈGES, M.C.; COLOUMBIÉ, F.C. In vivo and in vitro immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* aqueous leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p. 199-205, 2000.

BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Science**, n.75, p. 245-255, 2004.

BEUTH, J.; OST, B.; PAKDAMAN, A.; RETHFELDT, E.; BOCK, P.R.; HANISCH, J.; SCHNEIDER, B. Impact of complementary oral enzyme application on the postoperative treatment results of breast cancer patients--results of an epidemiological multicentre retrospective cohort study. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, n. 47, suppl, p. S45-54, 2001.

BOGDAN, C.; PAIK, J.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin-10. **J. Biological Chemistry**, n.267, p.233-234, 1992.

BOLLARD, C.M.; ROONEY, C.M. Role of TGF- β in Tumor Protection and Antitumor Immunity. In : JAKOWLEW, S.B. **Transforming growth factor- β in cancer therapy** Volume II: Cancer treatment and therapy. Totowa: Humana press, p. 383-400, 2008.

BOMSTEIN, Y.; OPHIR, R.; HARSHEMES, H.; BEN-EFRAIM, S.. Release of immunosuppressive factor(s) by MOPC-315 murine plasmacytoma cells: A possible mechanism of defense. **Anticancer Research**. v.13, p. 2125–2129, p.1993.

BONTA, I.L.; BEN-EFRAIM, S. Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumour activity. **Journal of leukocyte biology**, v.54, p.613-626, 1993.

BORGSTROM, P.; HILLAN, K.J.; SRIRAMARAO, P.; FERRARA, N. Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by antivascular endothelial growth factor neutralizing antibody, novel concept of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. **Cancer Research**, v. 56, p. 4032–4039, 1996.

BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. **The Journal of allergy and clinical immunology**, n.111, suplemento 2, p. S460-475, 2003.

BOTTI, C.; SEREGNI, E.; FERRARI, L.; MARTINETTI, A. Bombardieri, E. Immunosuppressive factors: role in câncer development and progression. **The International Journal of Biological Markers**, n.13, v.2, p. 51-69, 1998.

BROXMEYER, H. E.; WILLIAMS, D. E.; COOPER, S.; SHADDUCK, R. K.; GILLIS, S.; WAHEED, A.; URDAL, D. L.; BICKNEL, D. C. Comparative effects in vivo of recombinant murine interleukin 3, natural murine colony-stimulating factor-1, and recombinant murine granulocytemacrophage colony stimulating factor on myelopoiesis in mice. **The Journal of clinical investigation**, n.79, p.72-75, 1987.

CALABRESI P.; CHABNER B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: **GOODMAN & GILMANN**. 10th, p. 1035-1093, Mc Graw-Hill, Rio de Janeiro.

CARVALHO, M. G.; SILVA, M. B. S., **Hematologia, Técnicas Laboratoriais e Interpretação**, p. 28-32, 1988.

CHA, S.S.; KIM, M.S.; CHOI, Y.H.; SUNG, B.J.; SHIN, N.K.; SHIN, H.C.; SUNG, Y.C.; OH, B.H. A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity, **Immunity**, v.2, n.11, p. 253-261, 1999.

DAGLI, M.L.Z. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.1, p. 97-103, 1992.

DAVIS, L.; KUTTAN, G. Suppressive effect of cyclophosphamide-induced toxicity by *Withania somnifera* extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p.209–214, 1998.

DAVIS, L.; KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera* **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 193-200, 2000.

DAWSON, M.D.; DUGGAN, G. ARENT, D.J. Erratum: Optical measurements of electronic band structure in tensile strain (Ga,In)P-(Al,Ga,In)P quantum wells. **Physical review. B, Condensed matter**, v.52, n.23, 16940-16941, 1995.

DENADAI, A.M.L.; SANTORO, M.M.; LOPES , M.T.P.; CHENNA, A.; SOUZA, F.B.; AVELAR, G.M.; GOMES, M. T. R.; GUZMAN, F.; SALAS, C.E., SINISTERRA, R.D. A supramolecular complex between proteinases and β -cyclodextrin that preserves enzymatic activity: Physicochemical characterization. **BioDrugs**, v.20, n.5, p. 283-291, 2006.

DESSER, L.; REHBERGER, A.; KOKRON, E.; PAUKOVITS, W. Cytokine synthesis in human peripheral blood mononuclear cells after oral administration of polyezyme preparations. **Oncology**, v.50, p. 403–407, 1993.

DESSER, L.; HOLOMANOVA, D.; ZAVADOVA, E.; PAVELKA, K.; MOHR, T.; HERBACEK, I. Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-beta levels in human blood. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, n.47, Suppl, p. S10-15 2001.

DUFFIE, G. P.; YOUNG, M. R. Tumoricidal activity of alveolar and peritoneal macrophages of C57B1/6 mice bearing metastatic or nonmetastatic variants of Lewis lung carcinoma. **Journal of leukocyte biology**, v.49, v.8, 1991.

EGEBLAD, M.; LITTLEPAGE, L.E.; WERB, Z. The fibroblastic coconspirator in cancer progression. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v.70, p.383-388. 2005.

EHRLICH, P. Experimentelle carcinom studien na Mausen. **Journal of Experimental therapeutic of Frankfurt**, v.1, p.78-80, 1906.

ELEXPURU, A.; MARTIN-NIETO, J.; JIMENEZ, A.; GOMEZ, C.; VILLALOBO, A. Ehrlich ascites tumor cells produce a transforming growth factor-beta (TGF β)-like activity but lack receptors with TGF β -binding capacity. **Molecular and cellular biochemistry**, v.170, p.153–162, 1997.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; BRAQUET, P.; JANCAR, S. Inhibiton of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF antagonists. **International journal of immunopharmacology**, n.12, p.57, 1990b.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumour in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v.14, p.125–132, 1990a.

FERRARA N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. **Recent progress in hormone research**, v.55, p.15-35, 2000.

FERREIRA, M.A.; BARCELOS, L.S.; TEIXEIRA, M.M.; BAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). **Life Sciences**, v. 81, p. 210–217, 2007.

FIGUEIREDO, C. Avaliação das propriedades antitumoral e antimetastática de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* em modelo de melanoma murino. **Dissertação de Mestrado**, 2009 , ICB-UFMG, 87p. 2009.

GAUDRY, M.; BREGERIE, O.; ANDRIEU, V.; EL BENNA, J.; POCIDALO, MA.; HAKIM, J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. **Blood**, v.90, p. 4153-4161, 1997.

GENTILE, L.B. Modulação por PGE2 no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de ehrlich (TAE). **Dissertação de Mestrado**, 2001, FM-UNESP, 103 p. 2001.

GUIMARÃES-FERREIRA, C.A.; RODRIGUES, E.G.; MORTARA, R.A., CABRAL, H.; SERRANO, F.A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; TRAVASSOS, L.R. Antitumor effects in vitro and in vivo and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. **Neoplasia**, v.9, n.9, p.723-733, 2007.

GHONEUM, M.; BADR EL-DIN, N.K.; NOAMAN, E.; TOLENTINO, L. *Saccharomyces cerevisiae*, the Baker's Yeast, suppresses the growth of Ehrlich carcinoma-bearing mice. **Cancer immunology, immunotherapy**, v.57, n.4, p.581-592, 2007.

GOMES, F.S.L.; SPÍNOLA, C.V.; RIBEIRO, H.A.; LOPES, M.T.P.; CASSALI, G.D.; SALAS, C.E. Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. **Burns (Oxford)**, v.36, p. 277-283, 2010.

GOMES, M. T. R.; MELLO, V. J.; RODRIGUES, K. C. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. **Planta Medica**, v. 71, p. 244-248, 2005.

HALE, L. P.; HAYNES, B. F. Bromelain treatment of human T cells removes CD44, CD45RA, E2/MIC2, CD6, CD7, CD8, and Leu 8/LAM1 surface molecules and markedly enhances CD2-mediated T cell activation. **Journal of immunology**. n.149, p.3809–3816, 1992.

HANIEH, H.; GERILE, C.; NARABARA, K.; GU, Z.; ABE, A.; KONDO, Y. In vivo immunomodulatory effects of dietary purple sweet potato after immunization in chicken. **Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaihō**, v.81, p.116-21, 2010.

HERZYK, D.J.; GORE, E.R. Adequate immunotoxicity testing in drug development. **Toxicology letters**, v. 149, p. 115-122, 2004.

IMAGAWA, Y.; SATAKE, K.; KATO, Y.; TAHARA, H.; TSUKUDA, M. Antitumor and antiangiogenic effects of interleukin 12 gene therapy in murine head and neck carcinoma model. **Auris, nasus, larynx**, v.31, n.3, p.239–245, 2004.

JAFARZADEH, A.; BAKHSHI, H.; REZAYATI, M.T.; NEMATI, M. Cigarette smoke-exposed saliva suppresses cellular and humoral immune responses in an animal model. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v.59, n.11, p. 760-3, 2009.

JILMA, B.; BLANN, A.; PERNERSTORFER, T.; STOHLAWETZ, P.; EICHLER, H.G.; VONDROVEC, B.; AMIRAL, J.; RICHTER, V.; WAGNER, O.F. Regulation of adhesion molecules during human endotoxemia. No acute effects of aspirin. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 159, n. 3, p. 857–863, 1999.

JAKÓBISIAK, M.; KAŃTOCH, M.; LASEK, W.; DOBACZEWSKA, H.; OBŁAKOWSKI, P. Specific and non-specific immunotherapy of Ehrlich Ascites Carcinoma in mice. **Folia biologica (Krakow)**, v.30 n. 3-4, p. 91-97 1982.

KAPOOR, S.; PAL, S.; SAHNI, P.; DATTA GUPTA, S.; KANTI HATTOPADHYAY, T. Effect of pre-operative short course famotidine on tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: a double blind, placebo controlled, prospective randomized study. **The Journal of surgical research**. v.129, n.2, p.172–175, 2005.

KAWABATA, A. Gastrointestinal functions of proteinase-activated receptors. **Life Science**, v. 74, p. 247-254, 2003.

KAWABATA, T.T.; BURLESON, G.R.; ERNST, P.B.; ULLRICH, S.E.; Immunotoxicology of regional lymphoid tissue: the respiratory and gastrointestinal tracts and skin. **Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology**, v.26, p. 8-19. 1995.

KEEB, G.; LALA, P.K. Effect of Ehrlich ascites tumour transplantation in mice on the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies in vitro. **European journal of câncer**, v.14, p.331–342, 1978.

KEPRELA E. Cysteine proteinases in tumor cell growth and apoptosis **Neoplasma**, v.48, n.5, p. 332-349, 2001.

KIM, K.J.; LI, B.; WINER, J.; ARMANINI, M.; GILLETT, N.; PHILLIPS, H.S.; FERRARA, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth *in-vivo*. **Nature**, v.362, p. 841–844, 1993.

KLEIN, G; KLEIN, E. Conversion of solid neoplasm into ascites tumors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.63, p.640-661, 1956.

KOBARI, L.; WEIL, D.; LEMOINE, F.M.; DUBOIS, C.; THIAN, D.; BAILOU, C.; GUIGON, M.; GORIN, N.C.; NAJMAN, A. Secretion of tumour necrosis factor- α by fresh human acute on lymphoblastic leukemic cells: role in the disappearance of normal CFU-GM progenitors. **Experimental Hematology**, v. 46 p.187-192, 1990.

KOGANEI, A.; TSUCHIYA, T.; SAMURA, K.; NISHIKIBE, M. Use of whole sheep red blood cells in ELISA to assess immunosuppression in vivo. **Journal of immunotoxicology**, v.4, n.1, p.77-82, 2007.

KOHORN, B. D.; LANE, S.; SMITH, T. A. An *Arabidopsis* serine/threonine kinase homologue with an Epidermal Growth Factor repeat selected in yeast for its specificity for a thylakoid membrane protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 10989-10992, 1992.

KUMAR, V.P.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. Effect of "rasayanas" a herbal drug preparation on cell-mediated immune responses in tumour bearing mice. **Indian journal of experimental biology**, v.37, n.1, p. 23-26, 1994.

KUPPNER, M.C.; SAWAMURA, Y.; HAMOU, M.F.; DE TRIBOLET, N. Influence of PGE2- and cAMP-modulating agents on human glioblastoma cells killing by interleukin-2-activated lymphocytes. **Journal of Neurosurgery**. v.72, p.619–625, 1990.

KUTTAN, G., KUTTAN, R. Immunomodulatory activity of a peptide isolated from *Viscum album* extract. **Immunological investigations**, v.21, p. 285–296, 1992.

KVIECINSKI, M.R.; FELIPE, K.B.; SCHOENFELDER, T.; DE LEMOS WIESE, L.P.; ROSSI, M.H.; GONÇALEZ, E.; FELICIO, J.D.; FILHO, D.W.; PEDROSA, R.C. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v.117, n. 1, p.69-75, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LEIPNER J; SALLER R. Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. **Drugs**, v.59, n.4, p.769-780, 2006.

LOEWENTHAL, H.; JAHN, G. Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mause Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und Chemische Einwirkungen. **Ztschr F Krebsforsch**, v.12, p.437-439, 1932.

LOURBAKOS, A.; POTEMPA, J.; TRAVIS, J.; D'ANDREA, M.R.; ANDRADE-GORDON, P.; SANTULLI, R.; MACKIE, E.J.; PIKE, R.N. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. **Infectology and Immunology**, v. 69, p. 5121–5130, 2001.

LUSTER, M.L.; PORTIER, C.; PAIT, D.G.; WHITE, K.L.; GENNINGS, C.; MUNSON, A.E.; ROSENTHAL, G.L. Risk assessment in immunotoxicology . I. Sensitivity and predictability of immune tests. **Fundamental applied toxicology**, v.18, n.2, p.200-210, 1992.

MANDAL, A.; PODDAR, M.K. Long-term caffeine consumption reverses tumor-induced suppression of the innate immune response in adult mice. **Planta Medica**, v.74, n.15, p.1779-1784, 2008.

MANTOVANI, A.; BOTAZZI, B.; COLOTTA, F.; SOZZANI, S.; RUCO, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunology today**, v.13, p.221-239, 1992.

MAXWELL, M.; GALANOPOULOS, T.; NEVILLE-GOLDEN, J.; ANTONIADES, H.N. Effect of the expression of transforming growth factor-*b* 2 in primary human glioblastomas on immunosuppression and loss of immune surveillance. **Journal of Neurosurgery**, v.76, p.799–804, 1992.

MELLO, V. J.; GOMES, M. T.; RODRIGUES, K. C.; LOPES, M. T. P.; SALAS, C. E. Plant proteinases: Their potential as therapeutic drugs In: **Recent progress in medicinal Plants - Drug Development from Molecules**. 1^o ed., Houston, Studium press, LLC, v.11, p. 211-224, 2006.

MELLO, V.J.; GOMES, M.T.; LEMOS, F.O.; DELFINO, J.L.; ANDRADE, S.P.; LOPES, M.T.; SALAS, C.E.; The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**, v.15, p. 237–244. 2008.

METZIG, C.; GRABOWSKA, E; ECKERT, K; MAURER, H.R. Bromelain proteases reduce human platelet aggregation in vitro, adhesion to bovine endothelial cells and thrombus formation in rat vessels in vivo. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 13, p. 7-12, 1999.

MESIANO, S.; FERRARA, N.; JAFFE, R.B. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. Inhibition of ascites formation by immunoneutralization. **The American journal of pathology**, v, 153, p. 1249–1256, 1998.

MOHANAM, S.; JASTI, S.L.; KONDRAGANTI, S.R.; CHANDRASEKAR, N.; LAKKA, S.S.; KIN, Y.; FULLER, G.N.; YUNG, A.W.; KYRITSIS, A.P.; DINH, D.H.; OLIVERO, W.C.; GUJRATI, M.; ALI-OSMAN, F.; RAO, J.S. Down-regulation of cathepsin B expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells. **Oncogene**, V.20, p.3665-3673, 2001.

MORALES, J.R.; VÉLEZ, D.; SUBIZA, J.L. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Experimental Hematology**, v.27, p.1757-1767, 1999.

MOORE, G.E.; GERNER, R.E.; FRANKLIN, H.A. Culture of normal human leukocytes. **The Journal of the American Medical Association**. v.199, p.519-524, 1967.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUNOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; ROJAS, I.; VARGAS, L.; TAE, A.; DEHARO, E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p.139–155. 2000.

MYNOTT, T. L.; LADHAMS, A.; SCARMATO, P.; ENGWERDA, C. R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. **Journal of immunology**, v.163, p.2568–2575, 1999.

NARA, K.; ODAGIRI, H.; FUJII, M.; YAMANAKA, Y.; YOKOYAMA, M.; MORITA, T.; SASAKI, M.; KON, M.; ABO, T. Increased production of tumor necrosis factor and prostaglandin E2 by monocytes in cancer patients and its unique modulation by cancer plasma. **Cancer immunology immunotherapy**, 25:126, 1987.

NAGY, J.A.; MORGAN, E.S.; HERZBERG, K.T.; MEYERS, M.S.; YEO, K.T.; SIOUSSAT, T.M. Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. **Cancer Research**, v.55, p. 360–368, 1995.

NELSON, A. S.; PARHAR, R. S.; SCODRAS, J. M.; LALA, P. K. Characterization of macrophage subsets regulating murine natural killer cell activity. **Journal of leukocyte biology**, v.48, p.382-387, 1990.

OGHISO, Y.; YAMADA, Y.; ANDO, K.; ISHIHARA, H.; SHIBATA, Y. Differential induction of prostaglandin E2 -dependent and -independent immune suppressor cells by tumor-derived GM-CSF and M-CSF. *Journal of leukocyte Biology*, v.53, p.86–92, 1993.

OKUBO, S. Suppression of cell-mediated immunity through immune spleen cells against Ehrlich ascites tumor. **Nagoya journal of medical science**, v.33, n 4, p.329-40, 1971.

OLINESCU, A.; HRISTESCU, S.; MAZILU, E. Natural cell-mediated cytotoxicity in Ehrlich ascites tumor-bearing mice. **Neoplasma**, v.30, n.2, p.147-52. 1983.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K.V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 32, p. 56-67, 2000.

PACZEK, L.; GACIONG, Z.; BARTLOMIEJCZYK, I.; SEBEKOVA, K. BIRKENMEIER, G.; HEIDLAND, A. Protease administration decreases

enhanced transforming growth factor-beta 1 content in isolated glomeruli of diabetic rats. *Drugs under experimental and clinical research*, v.27, n.4, p. 141-149, 2001.

PARHAR, R. S.; LALA, P. K. Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. ***Cellular Immunology***, 93: 265, 1985.

PARHAR, R.S., LALA, P.K. Prostaglandin E2 -mediated inactivation of various killer lineage cells by tumour-bearing host macrophages. ***Journal of leukocyte Biology***, v.44, p.185–190, 1988.

PARKER, A.N.; PRAGNELL, I.B. Inhibitors of haemopoiesis and their potential clinical relevance. ***Blood Reviews***, v.9, n.4, p.226-233, 1995.

PEIJIE, C.; HONGWU, L.; FENGPENG, X.; JIE, R.; JIE, Z. Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. ***Life sciences***, v. 72, p. 2255-2262, 2003.

PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; VILLA, S.; MAROCCHI, A.; MOCARELLI, P. Factors produced by macrophages and tumour cells: Influence on the granulocytic precursor cells (CFU-C) in normal and tumour bearing mice. ***Journal of cancer research and clinical oncology***, v.102, p.235–244, 1982.

PRATHEESHKUMAR, P.; KUTTAN, G. Modulation of immune response by *Vernonia cinerea* L. inhibits the proinflammatory cytokine profile, iNOS, and COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages. ***Immunopharmacology and immunotoxicology***, 10 Apr 6. [Epub ahead of print]

QUEIROZ, M. L.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R.; MULLER, A. H. Adjuvant effect of *Pluchea quitoc* extract on the resistance of tumor-bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. ***Immunopharmacology and immunotoxicology***, v. 23, n. 2, p. 215-28, 2001.

RASOOLA, M.; VARALAKSHMI, P. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An in vivo and in vitro study. **Vascular Pharmacology**, v.44, p. 406–410, 2006.

RIESER, M.J.; GU, Z.M.; FANG, X.P.; ZENG, L.; WOOD, K.V.; MCLAUGHLIN, J.L. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. **Journal of natural products**, v.28, p. 361-376, 2006.

ROOK, A.H.; KEHRL, J.H.; WAKEFIELD, L.M.; ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; BURLINGTON, D.B.; LANE, H.C.; FAUCIA, S. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: Depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness . **Journal of immunology**, v.136, p. 3916–3920, 1986.

ROSEGHINI, R. ; MOREIRA, P.; VALE, V.; PINHEIRO, A.M.; COSTA, J.F. BITTENCOURT, T.; NASCIMENTO, I. SCHAEER, R.; VELOZO, E.; EL-BACHA, R.; MEYER, R.; FREIRE, S. Different effects of arborinine alkaloid obtained from brazilian *Ehretia bahiensis* on spleen and thymus cells stimulated in vitro with different mitogens. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 28, p. 361-376, 2006.

ROUSSELET, N.; MILLS, L.; JEAN, D.; TELLEZ, C.; BAR-ELI, M.; FRADE, R. Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human melanoma cells by anti-cathepsin L single chain variable fragment. **Cancer research**, v.64, n.1, p. 164-151, 2004.

ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **The Biochemical journal**, v.266, p.869–875,1990.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R.G. Ascite neoplásica. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.6, p. 518-523, 2003.

SAARLOOS, M. N.; KHOO, N. K.; LALA, P. K. Effects of cancer immunotherapy with indomethacin and interleukin-2 on murine hemopoietic stem cells. **Cancer Research**, v.52, p.6452, 1992.

SASAGAWA, T.; HLAING, M.; AKAIKE, T. Synergistic induction of apoptosis in murine hepatoma Hepa1–6 cells by IFN-gamma and TNF-alpha. **Biochemical and biophysical research communications**, v.3, n.272, p.674-680, 2000.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MÁRQUES, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunology letters**, v.74, p.104-111, 2000.

SEGURA, J.A.; BARBERO. L.G.; MÁQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Letters**, v.414, p.1-6, 1997.

SENGER, D.R.; PERRUZZI, C.A.; FEDER, J.; DVORAK, H.F. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. **Cancer Research**, v.46, p. 5629–5632, 1986.

STEINKE, J.W.; BORISH, L. Cytokines and chemokines, **The Journal of allergy and clinical immunology**, n.117, v.2, Suppl.- Mini-Primer, p. S441-445, 2006.

SILVA, C.A. Caracterização bioquímica e farmacológica parcial de produtos naturais derivados de Caricaceae com atividade mitogênica. **Dissertação de mestrado**, 1999, ICB-UFMG, 210p. 1999.

SILVA, C.A.; GOMES, M.T.; FERREIRA, R.S.; RODRIGUES, C.K.; VAL, C.G.; LOPES, M.T.; MELLO, V.J.; SALAS, C.E. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. **Planta medica**, v.69, n.10, p. 926-932, 2003.

SLOANE, B.F.; ROZHIN, J.; JOHNSON, K.; TAYLOR, H.; CRISSMAN, J.D.; HONN, K.V. Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic

tumors. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, v.83, n.8, p.2483-2487, 1986.

SODERBERG, L.S.; FLICK, J.T.; BARNETT, J.B. Leukopenia and altered hematopoietic activity in mice exposed to the abused inhalant, isobutyl nitrite. **Experimental hematology**, v.24, p. 848-853, 1996.

SOEDA, M. Studies on anti-tumor immunity. I. Homologous immunity against Ehrlich ascites tumor (acquired type of immunity against tumor). **Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi**, v. 26, n. 12, p.1598-608, 1967.

SUK, K.; KIM, Y.H.; CHANG, I.; KIM, J.Y. CHOI, Y.H., LEE, K.Y. LEE, M.S. IFN alpha sensitizes ME-180 human cervical cancer cells to TNF alpha-induced apoptosis by inhibiting cytoprotective NF-kappaB activation. **FEBS letters**, n. 495, p.66–70, 2001.

TALMADGE, J. E.; KEY, M.; FIDLER, I. J. Macrophage content of metastatic and non-metastatic rodent neoplasmas. **Journal of immunology**, v.126, p.2229-2245, 1981.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K.; PAAVONEN, K. The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovascular research**, v. 65, n.3, p. 550-563, 2005.

TAN, P.H.; LOTA, A.S. Interaction of current cancer treatments and the immune system: implications for breast cancer therapeutics. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v.9, n.15, p.2639-2660, 2008.

TAICHMAN, N.S.; YOUNG, S.; CRUCHLEY, A.T.; TAYLOR, P.; PALEOLOG, E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. **Journal of leukocyte biology**, v.62, p.397-400, 1997.

TAYLOR, A.W. Review of the activation of TGF-beta in immunity. **Journal of leukocyte biology**, v.85, n.1, p. 29-33, 2009.

TEIXEIRA, A.S.; ARAÚJO, F.A.; FERREIRA, M.A.; BARCELOS, L.S.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. **Life Sciences**, v. 78, p.1637–1645, 2006.

TEMPLE, T. T.; KAWABATA, A. E.; MUNSON, A.E.; WHITE, K. L.J. Comparison of ELISA and Plaque-Forming Cell Assays for Measuring the Humoral Immune Response to SRBC in Rats and Mice Treated with Benzo[a]pyrene or Cyclophosphamide. **Fundamental and applied toxicology**, v.21, p.412-419, 1993.

TOI, M.; MATSUMOTO, T.; BANDO, H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. **The lancet oncology**, v.2, n.11 p.667-73, 2001

TORRE-AMIONE, G.; BEAUCHAMP, R.D.; KOEPPEN, H.; PARK, B.H.; SCHREIBER, H.; MOSES, H.L.; ROWLEY, D.A. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type *b* 1 cDNA escapes immune surveillance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.1486–1490, 1990.

TORREZINI, T.; ATHANAZIO, D.A. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: Clinical Implications and Therapeutic Potential. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.54, n.1, p.63-77, 2008.

TULINSKA, J.; SOVCIKOVA, A.; LISKOVA, A.; KUBOVA, J.; HORAKOVA, K. Immunotoxicity of ethy-4-isothiocyanatobutanoate in male Wistar rats. **Toxicology**, v. 145, p. 217-225, 2000.

TYSNES, .BB.; MAURER, H.R.; PORWOL, T.; PROBST, B.; BJERKVIG, R.; HOOVER, F. Bromelain reversibly inhibits invasive properties of glioma cells. **Neoplasia**, v.3, p.469 – 479, 2001.

UENO, H.; HAWRYLOWICZ, C.M.; BANCHEREAU, J. Immunological intervention in human diseases. **Journal of translational medicine**, v. 23, p. 5-59, 2007.

VAN LOVEREN, H.; VERLAAN, A.P.; VOS, J.G. An enzyme-linked immunosorbent assay of anti-sheep red blood cell antibodies of the classes M, G, and A in the rat. **International journal of immunopharmacology**, v.13, n.3. p.689-685, 1991.

VILLALBA, M. I. C.; LEMOS, F. O.; TAGLIATI, C. A.; CASSALI, G. D.; SALAS, C. E.; JOIA DE MELLO, V.; ANADON, A.; MARTINEZ LARRANAGA, M. R.; LOPES, M. T. P. Avaliação toxicológica de fração proteolítica com atividade cicatrizante obtida do látex de *Carica candamarcensis*. **Anais** In: XXXIX Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007, Ribeirão Preto, SP. Anais do XXXIX Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, p. 528-529, 2007.

VALADARES, M. C.; QUEIROZ, M. L. The effect of a Titanocene Dichloride derivative, Ti IV (C₅H₅)₂ NCS₂, on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 29; n. 439, p. 35-42, 2002.

VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C.; PAIK, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor-beta. **Journal of experimental medicine**, v.178, n.2, p.605-613, 1993.

WALD, M.; OLEJAR, T.; SEBKOVÁ, V.; ZADINOVA, M.; BOUBELIK, M.; POUCKOVÁ, P. Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C₅₇Bl₆ mice with syngeneic melanoma B₁₆. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v.47, p. 16-22, 2001.

WALD, M.; ZAVADOVA, E.; POUCKOVA, P.; ZADINOVA, M.; BOUBELIK, M. Polyzyme preparation Wobe-Mugos inhibits growth of solid tumors and

development of experimental metastases in mice. **Life Sciences**, v.62, n.3, p. PL43 – PL48, 1998.

WALKER, T. M.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. Tumor growth alters T cell and macrophage production of and responsiveness to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: partial dysregulation through interleukin-10. **Cellular immunology**, v.154, n.1 p. 342-357, 1994.

WEBB, N.J.A.; MYERS, C.R.; WATSON, C.J.; BOTTOMLEY, M.J.; BRENCHLEY, P. Activated human neutrophils express vascular endothelial growth factor. **Cytokine**, v.10, p. 254- 257, 1998.

WHITE, K.L.; MUSGROVE, D.L.; BROWN, R.D. The sheep erythrocyte T-dependent antibody response (TDAR). **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v.598, p.173-84. 2010.

WOJTOWICZ-PRAGA, S. Reversal of Tumor-Induced Immunosuppression: A New Approach to Cancer Therapy. **Journal of Immunotherapy**. v.20, n.3, p.165-177, 1997.

YASNI, S.; YOSHIIE, K., ODA, H.; SUGANO, M.; IAMIZUMI, K. Dietary Curcuma xanthorrhiza Roxb. increases mitogenic responses of splenic lymphocytes in rats and alters population of the lymphocytes in mice. **Journal of nutritional sciences vitaminology**, v. 39, p. 345-354, 1993.

YE, Q. W.; MOKYR, M. B.; PYLE, J. M.; DRAY, S. Suppression of antitumor immunity by macrophages in spleens of mice bearing a large MOPC-315 tumor. **Cancer immunology, immunotherapy**, v.16, p.142-162, 1984.

YASUHIRA, K. Acquired immunity to Ehrlich ascites tumor in mice after treatment with fresh or sonized tumor cells at various ages. **Acta tuberculosea Japonica**, v.16, n.2, p.78-84, 1966.

YMOORE, S.C.; THEUS, S.A.; BARNETT, J.B.; SODERBERG, L.S. Bone marrow natural suppressor cells inhibit the growth of myeloid progenitor cells

and synthesis of colony-stimulating factors. **Experimental Hematology**, v.20, p.1178-1183, 1992.

YOUNG, M. R.; AQUINO, S.; YOUNG, M. E. Differential induction of hematopoiesis and immune suppressor cells in the bone marrow versus in the spleen by Lewis lung carcinoma variants. **Journal of leukocyte biology**, v.45, p.253-262, 1989.

YOUNG, M. R.; WRIGHT, M. A. Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors: interferon- γ plus tumor necrosis factor- α synergistically reduce immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells, and diminish tumor recurrence and metastasis. **Cancer Research**, v.52, n.22, p.6335-6340, 1992.

YOUNG, M. R.; WRIGHT, M. A.; MATTHEWS, J. P.; MALIK, I.; PRECHEL, M. Suppression on T-cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor- β and nitric oxide. **Journal of immunology**, v.156, p.1916-1921, 1996.

ZANDONAI, R.H. Análise da atividade linfoproliferativa de células esplênicas murinas frente a extratos de seis plantas medicinais da flora catarinense. **Dissertação de mestrado**, 2007, CCS-UNIVALI, 67p. 2007.

ZIAUDIDIN, M.; PHANSAKLAR, N.; PATKI, P.; DIWANAY, S.; PATWARDHAN, B. Studies on the immunomodulatory effect of *Ashwagandha*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n.2, p.69–76, 1996.

ZIAUDIDIN, M.; PHANSAKLAR, N.; PATKI, P.; DIWOKUBO, S. Suppression of cell-mediated immunity through immune spleen cells against Ehrlich ascites tumor. **Nagoya journal of medical science**, v.33, n 4, p.329-40, 1971.

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](#)