

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ADRIANA CRISTINA BARÉA

**Menor Crescimento do Tumor de Walker-256 *In Vivo*
Decorrente da Administração de ArtinM é
Acompanhado de Modulação do Sistema Imune**

CURITIBA

2010

ADRIANA CRISTINA BARÉA

**Menor Crescimento do Tumor de Walker-256 *In Vivo*
Decorrente da Administração de ArtinM é
Acompanhado de Modulação do Sistema Imune**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Novais Moreno

CURITIBA

2010

À Deus que me proporcionou tanta saúde, tantas alegrias e ensinamentos que carregarei pelo resto de minha vida.

À minha família que sempre esteve ao meu lado e que sempre me deu amor e força para continuar. Aos meus pais, irmãos e sobrinho que iluminou minha vida, e que agora é minha razão de viver.

Ao meu marido que nunca deixou de me incentivar e de me amar de um jeito especial, e que nunca deixou de acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me deram a vida. À minha mãe **Rose** que me carregou em seu ventre por 9 meses e depois me deu todo amor, carinho e cuidados necessários para eu me tornar uma pessoa feliz. Ao meu pai **João** que sempre me apoiou desde criança nos primeiros passos até já adulta quando nunca me negou nada e sempre me deu lições de caráter.

Aos meus irmãos **Andréa** e **Rafael** que sempre me ajudaram quando precisei e que sempre me deram amizade e carinho sem questionar e sem nunca esperar nada em troca.

À minha irmã Andréa e seu marido Alessandro que me deram o maior e mais precioso presente da minha vida: meu sobrinho e afilhado **Matheus** que iluminou a minha vida e que até ele nascer não sabia que poderia existir um amor tão grande e tão verdadeiro. Tanta pureza numa pessoinha tão pequena e especial, mas já tão esperta e querida, nos mostra que o mundo ainda tem uma esperança de melhorar para sempre.

Ao meu marido **Marcos** que sempre me deu apoio e força quando já achava que já não os tinha mais. Sempre me incentivou dizendo que tudo era possível, pois eu era uma pessoa especial. Além do mais, foi sempre um companheiro para todas as horas, até mesmo para coisas pequenas, mas que são as mais importantes na vida.

À minha orientadora, **Andréa Novais Moreno**, que esteve sempre presente quando precisei, e que sempre me explicou tudo pacientemente

quantas vezes fossem necessárias. Ela me fez acreditar que a pesquisa é possível mesmo sem dinheiro, e que basta ter vontade para conseguir as coisas. Também me fez admirá-la cada vez mais através de sua competência, inteligência, vontade e amor pelo que faz. Além de tudo, foi uma amiga nas horas difíceis da minha vida profissional e pessoal.

Às minhas amigas irmãs de coração Fernanda, Thais, Carolina e Raquel que sempre me fizeram rir quando precisei e que me apoiaram e me descontraíram nas horas de descanso, mesmo de longe.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e à Secretaria da Pós-Graduação por todo o apoio e suporte.

À CAPES pela bolsa cedida.

Ao laboratório de Patologia, Ana Paula Camargo Martins, Marina Luise Viola de Azevedo e Dra. Lúcia de Noronha por todo auxílio técnico com as lâminas e com a imunohistoquímica e por todo o material cedido.

À Dra. Maria Cristina Roque Barreira da USP de Ribeirão Preto que sempre nos auxiliou com sua sabedoria e material cedido. Também à equipe do seu laboratório na USP por ter sempre apoiado e ajudado com material e conhecimento necessários.

Ao Dr. Luiz Cláudio Fernandes da UFPR por nos ceder as células da linhagem do Carcinoma de Walker-256.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG – *Bacille Calmette-Guerin*

bFGF – *basic fibroblast growth factor* (fator de crescimento básico de fibroblasto)

CD4+ - molécula expressa por T CD4

CD8+ - molécula expressa por T CD8

CD14+ - molécula expressa por macrófagos

CD57+ - molécula expressa por NK

Células NK – células *Natural Killer*

ConA – concanavalina A

CRD – domínio de reconhecimento de carboidrato

CTLs – *cytotoxic T lymphocytes* (linfócitos T citotóxicos)

DAB – diaminobenzidina

DNA – ácido desoxirribonucléico

ECM – *extracellular matrix* (matriz extracelular)

EpCs – *epithelial cells* (células epiteliais)

GlcNac – N-acetil-glucosamina

GNA – Lectina de *Galanthus nivalis*

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IFN-γ – interferon-gama

IL – interleucina

LDMC – citotoxicidade mediada por monócitos dependente de lectina

LPS – lipopolissacarídeo

MHC – *Major Histocompatibility Complex* (complexo de histocompatibilidade principal)

NO – óxido nítrico

O₂⁻ – ânion superóxido

PBMC – *peripheral blood mononuclear cells* (células mononucleadas periféricas)

PBS – tampão salina fosfato

PHA – fitohemaglutinina

PWM – Mitógeno *Pokeweed*

RIP – proteínas inativadoras de ribossoma

RNA – ácido ribonucleico

SBA – lectina de feijão de soja

SD – *standard deviation* (desvio padrão)

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TCD4⁺ - linfócitos TCD4

TCD8⁺ - linfócitos TCD8

TGF-β – *beta transforming growth factor* (fator de crescimento transformante beta)

Th1 – células T *helper* 1

Th2 – células T *helper* 2

TNF-α – fator de necrose tumoral

TNP – trinitrofenil

VEGF – *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

WGA – lectina do gérmen de trigo

RESUMO

ArtinM é uma lectina purificada de *Artocarpus integrifolia* indutora da migração de neutrófilos por haptotaxia e ativação de macrófagos com conseqüente liberação de IL-12. O presente estudo avaliou o efeito imunomodulatório de ArtinM frente ao crescimento do carcinoma de Walker em dois protocolos: precoce e tardio. Ratos Wistar foram injetados intraperitonealmente com ArtinM (50 µg/ml) ou PBS (controle), 24 horas (precoce) ou 7 dias (tardio) após a implantação tumoral, e eutanasiados 7, 14 e 21 dias (precoce) ou 14 e 21 dias após o tratamento (tardio). O sangue dos animais foi coletado para análise de secreção de TNF- α e IFN- γ e os tumores foram medidos e processados para coloração com Hematoxilina-Eosina para análise geral da morfologia, e para imunohistoquímica para marcação com CD57, CD14, CD4 e CD8. Os resultados revelam que ArtinM induz redução da massa tumoral e aumento sérico de TNF- α e IFN- γ . Modificações na morfologia tumoral foram observadas nos tumores de animais tratados tais como áreas típicas de necrose, inibição da neoangiogênese e indução da migração de células inflamatórias. A migração dos tipos celulares avaliados foi aproximadamente 1,5 vezes maior no protocolo tardio quando comparado com o protocolo precoce, e quando comparado com animais controle foi aproximadamente 2 vezes maior para células expressando CD14, 10 vezes maior para CD57, 4 vezes maior para CD4 e 15 vezes maior para CD8. Os resultados indicam que a atividade imunomodulatória de ArtinM promove uma inibição do crescimento tumoral, provavelmente pela ativação de respostas imunes importantes contra células tumorais.

ABSTRACT

ArtinM is a lectin purified from *Artocarpus integrifolia* that triggers enhanced immune responses such as induction of neutrophil migration by haptotaxis and macrophage activation with consequent IL-12 release. Thus, this study evaluated the antitumor effect of ArtinM in two protocols: premature and delayed. Wistar Rats were injected intraperitoneally with one high dose of ArtinM (50 µg/ml), or with PBS (control), 24 hours (premature) or 7 days (delayed) after tumor implantation. The animals were euthanized 7, 14 and 21 days after the treatment (premature), and 14 and 21 days (delayed). The animals had their blood collected for cytokine release analysis (TNF-α and IFN-γ), and the tumors were measured and processed for Hematoxylin-Eosin staining to evaluate tumor morphology, and for immunohistochemistry for presence of CD57 (NK cells), CD14 (macrophages), CD4 (TCD4 lymphocytes) and CD8 (TCD8 lymphocytes). The results showed that ArtinM induced a tumor mass reduction and an increase of serum TNF-α and IFN-γ. ArtinM also induced changes in tumor morphology, presenting necrosis areas, inhibited neoangiogenesis and induced migration of all inflammatory cells into the tumor mass. The migration of all inflammatory cells was approximately 1.5 times higher in the delayed protocol, when compared to the premature protocol, and when compared to the control animals it was approximately 2 times higher for CD14+, 10 times higher for CD57+, 4 times higher for CD4+ and 15 times higher for CD8+. These results indicate that the immunomodulatory activity of ArtinM promotes a tumor growth inhibition, probably by activating important immune responses against tumor cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. O Câncer.....	01
1.1.1. Contextualização e definição.....	01
1.1.2. Neoangiogênese tumoral.....	03
1.1.3. Caquexia.....	05
1.1.4. Respostas antitumorais do sistema imune.....	05
1.1.5. Carcinoma de Walker-256.....	15
1.2. Lectinas.....	16
1.2.1. Considerações gerais e definição.....	16
1.2.2. Aplicações.....	18
1.2.3. Lectinas vegetais e suas atividades biológicas.....	22
1.2.3.1 Lectinas vegetais ArtinM e jacalina.....	30
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivos Gerais.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
3. ARTIGO.....	37
4. CONCLUSÃO.....	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer

1.1.1. Contextualização e definição

Dentre as doenças mais fatais no mundo, o câncer está em segundo lugar, ficando atrás de doenças cardiovasculares. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres e o de próstata entre os homens; porém o mais freqüente em âmbito mundial, sem diferença entre os sexos, é o de pulmão. Por isso a importância de se estudar a fundo as causas desta doença, a biologia das células tumorais, os mecanismos pelos quais estas células conseguem se estabelecer, sobreviver e se multiplicar e como o sistema imune age contra estas células.

O câncer, também chamado de neoplasia ou tumor maligno, é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de células aberrantes, originadas de uma única célula anormal, que podem ser restritas a um só tecido (*in situ*) ou podem migrar para outros tecidos (invasivo), caracterizando a metástase. A morte causada por esta doença se deve majoritariamente à disseminação de células tumorais a diferentes locais através de uma série de cascatas metastáticas (FIDLER, 1991; LIOTTA *et al.*, 1991).

Não se conhece as causas concretas das ocorrências de câncer, mas sabe-se que fatores genéticos e ambientais são importantes na causa da maioria dos cânceres, pois é uma doença multifatorial (LICHTENSTEIN *et al.*, 2000).

Células normais se transformam em células cancerosas quando os proto-oncogenes (ex.: *k-ras*), responsáveis pela regulação da proliferação de células normais, sofrem alguma mutação genética e se convertem em oncogenes, que ocasionam uma proliferação excessiva de células indiferenciadas formando uma massa tumoral. Além disso, genes de antiproliferação ou supressores (ex.: *pten* e *p53*) podem sofrer mutações não sendo, portanto, mais capazes de exercer sua função apropriadamente, ou seja, parar a proliferação celular indevida. Essas mutações genéticas podem ser herdadas e/ou podem ocorrer através de substâncias químicas (ex.: benzeno, tabaco e/ou nitrosaminas), agentes físicos (ex.: radiação gama e/ou ultravioleta), e agentes biológicos (ex.: alguns tipos de vírus).

Modificações em glicoconjugados de superfície celular ocorrem ao longo do desenvolvimento normal dos organismos, entretanto, alterações na forma de apresentação dos mesmos podem determinar uma anormalidade. Durante o processo de transformação maligna, várias destas moléculas são expressas de forma anômala, podendo ser consideradas como moléculas associadas ao tumor. Essas alterações qualitativas e quantitativas no padrão de glicosilação vêm sendo chamadas de glicosilação aberrante de tumores (RAZ & LOTAN, 1987; HAKOMORI, 1989), e são essenciais para a invasão tumoral, adesão celular e metástase (BROCKHAUSEN, 2003). Estes padrões de glicosilação foram originalmente identificados através de anticorpos monoclonais contra antígenos carboidrato-dependentes ou com o uso de lectinas vegetais. Esta constatação tem gerado um interesse cada vez maior em se procurar lectinas

que sejam capazes de reconhecer e ligar-se seletivamente a glicoconjugados de tumores.

O estabelecimento e a disseminação de um tumor são processos complexos que dependem das interações entre as células tumorais e o microambiente, por isso a biologia tumoral de cada tipo de tumor difere. Segundo HAKOMORI e colaboradores (2002), essas interações ocorrem através de glicosinapses, que são interações entre glicoproteínas de membrana e moléculas da superfície celular. Estas glicoproteínas estão organizadas em microdomínios onde estão localizados receptores de adesão, receptores para fatores de crescimento e transdutores de sinais, facilitando desta maneira a adesão de células tumorais ao epitélio, sua invasão aos tecidos e conseqüentemente um posterior crescimento da massa tumoral e formação de novos vasos (neoangiogênese).

1.1.2. Neoangiogênese tumoral

Assim que esta massa tumoral começa a crescer gradativamente, há a necessidade das células de se nutrirem, o que ocorre com a formação de novos vasos que levam nutrientes e oxigênio para sustentar as células cancerosas. Este fenômeno é chamado de neoangiogênese e sem ele os tumores não crescem mais que 2-3 mm³ (FOLKMAN & SHING, 1992). É um processo central no desenvolvimento de tecidos patológicos (BUSSOLINO *et al.*, 1996; FOLKMAN *et al.*, 2001) e essencial para o crescimento e progressão de tumores, e por isso o estudo da sua inibição consta na linha de frente de

pesquisas relacionadas à terapêutica antitumoral (PARANGI *et al.*, 1996; revisto por HLATKY *et al.*, 2002; PANIGRAHI *et al.*, 2002.). A integração de fatores de crescimento, moléculas de adesão, matriz extracelular, proteases e células acessórias é um processo fundamental para a formação de novos vasos (revisto por BUSSOLINO *et al.*, 1996; revisto por FOLKMAN *et al.*, 2001). Esse mecanismo envolve uma seqüência de eventos geneticamente regulados e coordenados que compreendem mobilização do endotélio numa direção controlada, proliferação celular, canalização de um botão sólido e produção de estroma peri-endotelial (AUSPRUNK & FOLKMAN, 1977). No processo de neovascularização, as células endoteliais são suscetíveis a mudar seu programa genético, quando estimuladas por moléculas angiogênicas produzidas pelo tumor, passando a produzir enzimas proteolíticas, migrar, proliferar e se diferenciar em novos vasos.

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um fator com potencial angiogênico para tumores por ser um potente agente mitogênico e vasodilatador para células endoteliais (THOMAS, 1996). A secreção deste fator de crescimento por células de melanoma pode ser inibida com imunoterapia com duas citocinas antitumorais importantes: IFN- γ e IL-12. Neste estudo, pacientes que tiveram um decréscimo nos níveis de VEGF demonstraram ter uma sobrevida mais longa, sem progressão da doença, do que os pacientes que não responderam à imunoterapia com uma menor secreção de VEGF (RAIG *et al.*, 2008).

1.1.3. Caquexia

Outro fator de grande importância e relevância quando se trata do assunto câncer é a síndrome causada por esta doença; a caquexia. Os mecanismos implicados nesta síndrome são anormalidades metabólicas e a ativação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α (fator de necrose tumoral) (TISDALE, 2002; LAVIANO *et al.*, 2000; ROFE *et al.*, 1994; OPARA *et al.*, 1995; SONTI *et al.*, 1996). A caquexia é manifestada por perda de tecidos adiposo e muscular esquelético e está associada com baixos níveis do fator de crescimento 1 tipo insulina (“insulin-like”), resistência à insulina, imunossupressão e ativação de uma resposta imune de fase aguda (CHAMBERLAIN, 2004). Ainda, como relatado por TISDALE (2001), também são sintomas a fraqueza, anorexia, anemia, perda de peso, intenso catabolismo periférico com depleção de carboidratos, lipídeos e reserva de proteínas. A caquexia se estabelece, pois para que haja crescimento tumoral deve haver gasto de energia, a qual é proveniente do hospedeiro debilitando o organismo e diminuindo a qualidade de vida dos pacientes (NEGUS & BALKWILI, 1996). Mais de 80% dos pacientes com câncer em fase terminal desenvolvem a caquexia, o que pode ser a causa direta de morte em alguns casos (MALTONI *et al.*, 1999).

1.1.4. Respostas antitumorais do sistema imune

O sistema imunológico é responsável pela homeostasia e defesa do corpo humano contra enfermidades. É constituído por um sistema de células

distribuídas numa rede complexa de órgãos linfóides e estão relacionados com o crescimento, o desenvolvimento e a distribuição das células especializadas na defesa do corpo contra os ataques de “invasores”. As principais células do sistema imunológico envolvidas no combate às células tumorais são os linfócitos T, os mastócitos, os macrófagos e as células *Natural Killer* (NK) (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

A resposta antitumoral se dá, principalmente, através da primeira linha de defesa contra invasores: imunidade inata (HICKS *et al.*, 2006; SCHANTZ *et al.*, 1987). Esta linha de defesa não necessita de prévia exposição a agentes invasores (memória) para ser capaz de, posteriormente, ativar seus mecanismos de defesa, que ocorrem através de macrófagos, células NK (BARLOZZARI *et al.*, 1985; ANDREESSEN *et al.*, 1990) e neutrófilos. Essas células, quando recrutadas através de estímulos químicos (citocinas) ou quando reconhecem um organismo estranho (através de receptores de superfície), são ativadas e destroem os agentes invasores através da fagocitose (macrófagos e neutrófilos) ou através da liberação de grânulos líticos (células NK), que lisam o alvo diretamente.

MANTOVANI e colaboradores (1992) e ALEXANDROFF e colaboradores (1999) demonstraram que macrófagos ativados são freqüentemente encontrados no local de regressão de um tumor, portanto, possuem poder de destruição direta de células neoplásicas. Enquanto que as células NK possuem o poder de destruição de células neoplásicas de maneira inespecífica, através da liberação de vários estímulos químicos (citocinas) (ISHIGAMI *et al.*, 2000; GENNARI *et al.*, 2001).

Após a fagocitose, outra resposta citotóxica importante é através da liberação de produtos tóxicos pelos macrófagos ativados, os quais têm tanto sua capacidade microbicida como citotóxica aumentadas (ROITT, 1995). ZIVKOVIC (2005) observou ainda que neutrófilos, através da liberação destes produtos, exercem efeito antitumoral contra o carcinoma de Walker, linhagem utilizada neste estudo. Estes produtos são, principalmente, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o óxido nítrico (NO), e são gerados pela respiração oxidativa (JANEWAY *et al.*, 2002).

O NO é uma molécula biológica potente que está envolvida em várias atividades como vaso-dilatação, neurotransmissão, metabolismo do ferro e defesa imune (NATHAN, 1992) e também atividades pró ou antitumorais. O efeito da produção de NO por macrófagos e outras células tem sido avaliado em vários tipos de câncer (KITO *et al.*, 2003; HAJTO *et al.*, 1998; TMOSHENKO *et al.*, 2001; XIE & HUANG, 2003), já que esta molécula pode ser um carcinógeno potente podendo causar danos ao DNA (TAMIR & TANNENBAUM, 1996; AMBS *et al.*, 1997). Por outro lado, de forma a avaliar a participação do NO na resposta de IL-2, conhecida por apresentar propriedades antitumorais, YIM e colaboradores (1995) administraram IL-2 subcutaneamente em camundongos portadores de câncer de pele Meth A ascítico e os resultados demonstraram que a produção de nitrito por macrófagos era inversamente proporcional a proliferação de células tumorais *in vitro* confirmando a destruição destas células por NO. A superprodução de NO endógeno é autocitotóxica através da indução

da apoptose (XIE & FIDLER, 1998), e por isso suprime o crescimento tumoral e a metástase (AMBS *et al.*, 1998).

Além disso, o NO sinaliza uma variedade de informações entre células, incluindo sinais para relaxamento vascular, citotoxicidade e angiogênese (revisado por JOHN & HIBBS, 2002). A produção de NO associado ao tumor, que se origina do tumor ou de células nele infiltradas, pode alterar o suprimento de sangue à massa tumoral através da mudança na formação vascular, influenciando assim a neoangiogênese e conseqüentemente a progressão tumoral (FUKUMURA & JAIN, 1998; AMBS *et al.*, 1998).

Intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico são liberados por macrófagos ativados (DING *et al.*, 1988; PARKINS *et al.*, 1998; NATHAN & SHILOH, 2000; BOGDAN, 2001) que desempenham um papel de extrema importância na defesa do organismo contra células tumorais (MANTOVANI *et al.*, 1992; ALEXANDROFF *et al.*, 1999) por também liberarem citocinas moduladoras da resposta imune, além do fato de que macrófagos são capazes de agir diretamente contra células tumorais (SOLOSKI, 2001). Macrófagos ativados foram encontrados infiltrados especificamente no carcinoma de Walker como visto por MORIOKA (1992) e segundo NISHIMURA e colaboradores (1999), as células de padrão Th1 (citotóxicas) respondem às células tumorais produzindo citocinas, as quais recrutam outras células como T CD8+ e células NK para dentro da massa tumoral, possibilitando assim uma resposta efetiva contra o tumor.

Citocinas são proteínas sinalizadoras intercelulares que regulam respostas inflamatórias sistêmicas ou locais, além de atuarem na cicatrização de feridas e outros processos biológicos importantes (WILLIAMS, JURKOVICH & MAIER, 1993). As citocinas não só podem induzir a atividade citotóxica específica para tumor, como podem também afetar diretamente mediadores inflamatórios e angiogênicos envolvidos no desenvolvimento tumoral (DREDGE *et al.*, 2002).

Macrófagos secretam citocinas inflamatórias capazes de ativar linfócitos T e células NK (LI, 2001), inclusive IL-12 e IL-18, vistos como potentes fatores antitumorais quando em conjunto (LAWERYS *et al.*, 2000; LEITE-DE-MORAES *et al.*, 1999; HYODO *et al.*, 1999; BEXEVANIS *et al.*, 2003; KITO *et al.*, 2003). KITO e colaboradores (2003) também demonstraram a citotoxicidade de macrófagos estimulados com IL-12 e IL-18, *in vitro*, associada ao aumento da produção de IFN- γ e NO. IFN- γ é importante por inibir o crescimento tumoral e a metástase através da ativação de células NK e linfócitos T (OGAWA *et al.*, 1998; LASEK *et al.*, 1997). As células NK, quando ativadas, têm sua citotoxicidade aumentada, induzindo a liberação de diversas citocinas, como IL-2, IL-12, IL-15 e IFN- γ (WALDMANN *et al.*, 2001; BIRON *et al.*, 1999).

A IL-12, produzida por macrófagos ativados e outras células apresentadoras de antígeno, liga-se a receptores de células T e NK, promovendo um padrão de resposta imune do tipo Th1 (citotóxico). Citocinas derivadas de células Th1 (IFN- γ e IL-2), por sua vez, induzem a ativação de macrófagos para produção de NO. A IL-2 estimula, ainda, a expansão clonal e

diferenciação de linfócitos T CD8, enquanto a ação do IFN- γ (produzido por linfócitos T ativados e células NK) envolve imunomodulação e/ou ativação de macrófagos (McKNIGHT *et al.*, 1994; ABBAS *et al.*, 2003), células NK e linfócitos T, inibindo a metástase (LASEK *et al.*, 1997; MARKOVIC & MURASKO, 1991). Camundongos desenvolvidos com máxima resposta inflamatória aguda são resistentes ao aparecimento de neoplasias pelo fato de que há seleção de genes responsáveis pelo controle da atividade de células NK, e também produção de citocinas importantes na ativação celular e no combate a células tumorais, como IL-12, TNF- α e IFN- γ (CASTOLDI *et al.*, 2006).

O IFN- γ é uma citocina liberada por quase todas as células TCD8, por algumas células TCD4 e por células NK. A maioria das células responde ao IFN- γ através do aumento da expressão de MHC de classe 1, o que leva à ativação celular (JANEWAY *et al.*, 2002). O IFN- γ também envolve a modulação da resposta imune e/ou ativa células inflamatórias importantes como macrófagos (McKNIGHT *et al.*, 1994; ABBAS *et al.*, 2003), linfócitos T e células NK, o que conseqüentemente inibe a metástase tumoral, sendo que estas últimas foram as células efectoras a inibirem a metástase de melanoma segundo MARKOVIC & MURASKO (1991). Em estudos anteriores foi observado que IFN- γ , quando em conjunto com BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) promoveu uma potente atividade antitumoral através da indução da migração de células inflamatórias, quando no infiltrado ou nos tecidos adjacentes foi encontrado um acúmulo de células inflamatórias nos animais tratados com essa combinação de IFN- γ com BCG, e não em animais controle (WANG, 2008). IFN- γ , em combinação com TNF- α , foi

visto por exercer atividade antitumoral (WATANABE, 1988; LASEK, 1995) por causar necrose do tumor e a destruição de vasos, levando à morte de células tumorais (WATERSON & BOWER, 2004).

TNF- α é uma citocina que é produzida por macrófagos e outras células mononucleares, que induz necrose de células tumorais (COTRAN *et al.*, 1994) e previne infecções locais de caírem na circulação, o que levaria ao choque séptico e à morte (STITES *et al.*, 2000). TNF- α é chamado de Fator de Necrose Tumoral, pois causou necrose em vários tumores murinos *in vivo* (COTRAN *et al.*, 1994). Esta citocina é importante por mediar doenças agudas e crônicas e porque ativa macrófagos/monócitos, células NK, neutrófilos e linfócitos, com conseqüente liberação de citocinas (WATERSON & BOWER, 2004), além de que já foi utilizada para controlar o crescimento tumoral (WATANABE, 1994).

Estudos anteriores comprovaram que lectinas como a do *Viscum album* induzem a secreção de TNF- α em baixas quantidades, levando a um efeito antitumoral satisfatório. Porém, altos níveis desta citocina podem ter efeito contrário e podem levar a uma caquexia séria, ou até mesmo ao choque séptico quando liberada sistemicamente, o que leva à morte (STITES *et al.*, 2000). Além disso, esta citocina em níveis altos pode induzir a metástase e a angiogênese, atuando como um fator pró-tumoral e não antitumoral (WATERSTON & BOWER, 2004). Entretanto, TNF- α foi o primeiro agente descrito para tratamento de câncer através da melhora do potencial de penetração de drogas no tumor e destrói vasos tumorais, agindo desta forma como um agente antitumoral (LEJEUNE & RÜEGG, 2006).

A citocina IL-12 pode ser considerada chave quando se fala de células tumorais, pois leva a um padrão Th1 de resposta celular promovendo a lise celular direta (citotóxico), além de inibir a angiogênese tumoral (MORINI *et al.*, 2004) e ativar células T e NK (LI, 2001), importantes na resposta imune celular (PEAKMAN & VERGANI, 1999). Também foi observado o efeito antitumoral (in vitro e in vivo) de IL-12 através do aumento da queratinização e apoptose no tecido tumoral, levando a sua regressão (DUDA *et al.*, 2000) e por aumentar a citotoxicidade e o número de células NK em tumores como neuroblastomas, leucemias e linfomas (LEE *et al.*, 1998). Dessa forma, alguns autores sugerem fortemente seu uso potencial em imunoterapia para o câncer (LEE *et al.*, 1998; MAZZOLINI *et al.*, 2003).

WIGGINTON e colaboradores (1996), ao testarem a influência da IL-12 na produção de NO por macrófagos peritoneais, verificaram que a administração da citocina induzia aumento progressivo da produção de NO, mediante exposição à LPS ou IL-2. Tanto em animais saudáveis como em portadores de tumores o tratamento de macrófagos peritoneais residentes só com IL-12 ou com IL-12 em associação a vários estímulos falhava em induzir a produção de NO, indicando que os efeitos da IL-12 ocorriam por mecanismos indiretos e não somente procedente de macrófagos. Ao suspender, por longo prazo, a administração de IL-12 a animais portadores de tumor, a produção de NO foi suprimida, voltando a subir após o reinício do tratamento e retardando o crescimento do tumor. A administração conjunta de IL-2 e IL-12 em pulsos semanais aumentou o *priming* de macrófagos para a produção de NO e, ao mesmo tempo, retardou o

crescimento do tumor. Estes dados revelam a existência de um mecanismo indireto para a IL-12 desencadear a produção de NO, além de demonstrar a importância do NO na regulação do crescimento tumoral.

Macrófagos ativados podem lisar células tumorais também através da liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de IL-1, que ativa linfócitos (DREDGE *et al.*, 2002). TNF- α é importante por ativar células T e rejeitar células tumorais (BAXEVANIS *et al.*, 2000; TANIGAWA *et al.*, 2000). Além disso, macrófagos ativados também secretam IL-6, que ativa linfócitos, IL-8, que recruta neutrófilos e células T, e IL-12 que ativa células NK (JANEWAY *et al.*, 2002). A ativação de células NK potencializa a resposta imune do tipo Th1, pois secretam citocinas como IFN- γ (controle de infecções), que por sua vez recrutam células citotóxicas, como células TCD8 e células NK para dentro da massa tumoral (DREDGE *et al.*, 2002). Deste modo, as células NK possuem o poder de destruição de células neoplásicas de uma maneira inespecífica (ISHIGAMI *et al.*, 2000; SMYTH *et al.*, 2002).

TSUNG e colaboradores (1997) demonstraram que células Th1 são as mediadoras da resposta antitumoral induzida por IL-12, sendo o macrófago a célula efetora e o NO produzido por macrófagos ativados, a molécula efetora. Após tratamento com IL-12 observaram completa regressão de tumores, redução que não se manteve em presença de um inibidor da óxido nítrico-sintase. A análise da resposta por células T associadas ao tumor revelou que a IL-12 induzia a produção de IFN- γ por linfócitos Th1, suprimindo a produção local de citocinas Th2. Segundo MORINI e colaboradores (2004) a terapia

gênica com o plasmídeo de IL-12 inibe a angiogênese tumoral, e sabe-se que a neoangiogênese é essencial para o estabelecimento e crescimento tumoral (FOLKMAN & SHING, 1992). Experimentos realizados por outros autores também demonstraram que a IL-12 interfere na formação de vasos em presença ou ausência de células NK ou CTL (linfócito T citotóxico), por inibir a expressão de bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico) ou VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (DIAS *et al.*, 1995; PEAKMAN & VERGANI, 1999; YAO *et al.*, 1999; DUDA *et al.*, 2000).

Além da imunidade inata, a qual é a mais importante e a primeira no combate contra células tumorais, a imunidade adaptativa também exerce um papel importante quando o assunto é câncer. A atividade antitumoral também envolve a sensibilização de linfócitos TCD4 e TCD8 a partir de antígenos específicos do tumor (HUNG *et al.*, 1998). A imunidade adaptativa é ativada quando a resposta imune inata não é capaz de eliminar uma nova infecção, ou quando o organismo infeccioso consegue romper a linha inicial de defesa (resposta inata). A imunidade adaptativa está baseada na seleção clonal de um repertório de linfócitos portadores de diferentes receptores antígeno-específicos que permitem ao sistema imune reconhecer qualquer antígeno estranho. Essas células efetoras antígeno-específicas irão interagir com o patógeno e com células de memória que podem prevenir uma re-infecção ocasionada por um mesmo microrganismo (ZEEV *et al.*, 2006).

Estudos mostram que as células TCD4 do tipo Th1 induzem a infiltração de linfócitos dentro da massa tumoral levando à erradicação do tumor, além de

gerar antígenos específicos (memória) para o tumor, e essa resposta foi abolida na presença de anticorpos anti-CD4+, anti-CD8+ e anti-IFN- γ (NISHIMURA *et al.*, 1999). Células TCD4, quando estimuladas com IL-12, são capazes de transmitir sinais regulatórios que sensibilizam linfócitos TCD8 levando à apoptose e consequente morte tumoral (HUNG *et al.*, 1998). Células TCD8 têm um papel importante na resposta antitumoral, o que foi evidenciado quando camundongos depletados dessas células, mas não de TCD4, não foram capazes de erradicar o tumor permanentemente. Também foi observado que IL-12 induz regressão tumoral e que esta atividade antitumoral é mediada por linfócitos TCD8, o que foi provado com o uso de camundongos depletados de linfócitos TCD4 e TCD8 (BRUNDA *et al.*, 1993). A galectina-9, uma lectina animal que se liga à β -galactosídeo, promoveu um efeito antitumoral através da indução de um aumento do número de células TCD8 que produziram IFN- γ , porém induziu também a apoptose de células TCD4 (NAGAHARA *et al.*, 2008), assim como células Th1 (KASHIO *et al.*, 2003).

1.1.5. Carcinoma de Walker-256

Vários tipos tumorais são utilizados experimentalmente, como por exemplo, o carcinoma 256 de Walker, que surgiu espontaneamente na glândula mamária de ratos fêmeas albinos prenhes em 1928, e recebeu esse nome em homenagem ao professor George Walker, que iniciou o seu estudo (EARLE, 1935). Segundo a observação de DORNELAS e colaboradores (2006), o estudo histológico de bexigas de 5 animais sacrificados mostrou um carcinossarcoma

encapsulado constituído basicamente de dois padrões celulares: células poligonais e células fusiformes com hipercromasia, polimorfismo nuclear e mitoses atípicas. Vinte (20) animais que foram destinados ao estudo da sobrevida evoluíram clinicamente com hematúria, diminuição da movimentação e perda progressiva de peso, interrompendo a ingestão de alimentos e água, evoluindo para o óbito rapidamente entre 24 e 48 horas. Este carcinoma foi utilizado neste estudo por ser encapsulado e extremamente agressivo quando comparado com outros, como o Sarcoma-180, o qual já foi utilizado experimentalmente para testes com a lectina vegetal ArtinM (LÔR, 2004), objeto de estudo deste trabalho.

1.2. Lectinas

1.2.1. Considerações gerais e definição

STILLMARK (1888) foi o primeiro a descrever uma lectina quando, estudando extratos de sementes de mamona (*Ricinus communis*), observou sua propriedade de aglutinar células vermelhas do sangue. Desde então várias outras lectinas vegetais, animais e de microorganismos foram descritas, sempre com a mesma propriedade: se ligar a carboidratos específicos. Por esta propriedade, as lectinas têm sido usadas como importantes ferramentas para estudos em imunologia, isolamento, caracterização, adesão e glicosilação aberrante em vários tumores, além de possuírem atividade antitumoral.

Devido à habilidade das aglutininas de plantas distinguirem eritrócitos dos diferentes grupos sanguíneos, Boyd e Shapleigh, em 1954 (citado por RUDIGER

& GABIUS, 2001), propuseram o termo “lectina” (do latim *legere*, escolher), para todas as proteínas que reconhecem glicanas de forma específica, que não correspondam à imunoglobulina ou que tenham atividade enzimática dirigida a carboidratos (BARONDES, 1988). O conceito clássico diz que “Lectinas são todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidrato e que se ligam especificamente a açúcares, de maneira reversível” (International Lectin Meeting, 2002). As lectinas, que possuem distribuição ubíqua na natureza, reconhecem e se ligam a glicanas localizadas na superfície celular, modificando deste modo a fisiologia da membrana causando fenômenos como migração, aglutinação, adesão, mitose e muitas outras respostas bioquímicas (SHARON & LIS, 1989).

Glicanas correspondem aos resíduos de carboidratos (mono e oligossacarídeos) presentes nestes glicoconjugados que, por sua grande heterogeneidade estrutural, podem codificar um vasto repertório de informação biológica (revisto por OPDENAKKER *et al.*, 1993). A decodificação desta informação contida em açúcares é feita pelas lectinas que reconhecem e ligam carboidratos de forma específica, análoga às interações antígeno-anticorpo ou receptor-ligante. Portanto, glicanas funcionam como alvo de reconhecimento para lectinas e desta interação proteína-carboidrato resulta uma variedade de funções biológicas, tais como: fertilização, embriogênese e adesão, diferenciação, controle do crescimento e migração celular, imunomodulação, recirculação de linfócitos, indução mitogênica e muitos outros (revisto por SHARON & LIS, 1989; revisto por GABIUS, 2001). Observa-se, entretanto, que

estes mesmos processos podem ser fatores determinantes da capacidade invasora das células, transformação maligna, crescimento tumoral e metástase (revisto por SHARON & LIS, 1993; revisto por GORELIK *et al.*, 2001). A era moderna da lectinologia começou em 1972, com Sharon e sua equipe (revisto por BIES *et al.*, 2004) que, além de caracterizar extensivamente a aglutinina da soja (SBA) como glicoproteína ligante de oligomanosídeos presentes em glicoproteínas animais (LOTAN *et al.*, 1974; DORLAND *et al.*, 1981), também introduziu o uso da lectina no estudo de células normais e malignas, assim como na investigação de células para transplante de medula óssea (REISNER *et al.*, 1978; REISNER *et al.*, 1979; revisto por SHARON & LIS, 2002). Desde então, centenas de lectinas têm sido isoladas de plantas, animais e microrganismos. O isolamento da primeira lectina de um mamífero foi em 1974, tratando-se de um receptor de asialoproteína hepático, com especificidade para galactose (STOCKER *et al.*, 1974). No ano seguinte Teichberg, da equipe de Sharon, descobriu o primeiro membro da família das galectinas (revisto por SHARON, 1998). Desde então, a possibilidade crescente de potenciais aplicações das lectinas aliada ao aperfeiçoamento tecnológico abriram portas para uma nova e promissora área da ciência – a Glicobiologia.

1.2.2. Aplicações

As lectinas foram inicialmente reconhecidas por sua capacidade de aglutinar células tendo sido, historicamente, utilizadas para a identificação dos grupos sanguíneos, por exibir preferências específicas por carboidratos na

superfície de eritrócitos, dentro do sistema ABO (revisto por SHARON & LIS, 2004). Lectinas têm sido usadas para a detecção e fracionamento de populações celulares (REISNER *et al.*, 1980), assim como para caracterização de células e tecidos através de estudos histoquímicos e imunocitoquímicos (DAMJANOV, 1987). Induzem ativação de células efectoras do sistema imune, desencadeando efeitos biológicos, tais como, adesão (BARONDES, 1984; SHARON & LIS, 1989), migração, proliferação, liberação de mediadores químicos por células do sistema imune (revisto por WIMER, 1997), regulação do crescimento celular (WELLS, 1991) e indução da morte celular programada (apoptose) (PERILLO *et al.*, 1995). Lectinas são capazes de promover a morte de vários tipos de células normais e malignas, por indução de necrose ou apoptose celular. (KROEMER *et al.*, 1998; NUMATA, *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2000).

Podem ser utilizadas como marcadores tumorais por se encontrarem na superfície de células malignas de vários tipos tumorais (LOTAN & RAZ, 1988a). Os tumores que mais metastizam são aqueles que possuem maior quantidade de glicoconjugados em sua superfície, pois facilitam a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, a transformação de fenótipo e o aumento da diferenciação celular. Por formarem conjugados tóxicos quando em altas concentrações, algumas lectinas podem ser usadas para induzir morte celular, selecionando linhagens celulares mutantes com glicosilação alterada (KERBEL *et al.*, 1982; INAI *et al.*, 1987).

Algumas lectinas animais já foram vistas como indutoras de atividade antitumoral e fazem parte de um importante grupo de moléculas que participam da imunidade inata e adaptativa. Atuam na primeira linha de defesa do organismo por terem atividades de aglutininas, opsoninas, moléculas de adesão, mediadoras de fagocitose, ativadoras do sistema complemento e indutoras de ativação (transdução de sinal) de células efetoras da resposta imune, promovendo eventos, tais como, adesão e migração celular, secreção de mediadores e ativação do *burst* respiratório (KALTNER & STIERSTORFER, 1998; revisto por KILPATRICK, 2002; MORENO *et al.*, 2005).

As lectinas animais podem ser classificadas de acordo com a homologia das sequências de aminoácidos do(s) seu(s) domínio(s) de reconhecimento de carboidrato – CRD(s), distinguindo-se cinco classes principais ou famílias (revisto por GABIUS, 1997):

1. **lectinas do tipo-C:** dependentes de cálcio, com CRD conservado e especificidade de reconhecimento de carboidratos variável (manose, galactose, fucose, tetrassacarídeo da heparina);
2. **lectinas do tipo I:** com CRD com domínios semelhantes ao de imunoglobulina e especificidade de reconhecimento a carboidratos variável (ácidos siálicos, Siglecs e outros);
3. **lectinas do tipo S ou Galectinas:** com CRD conservado e especificidade de reconhecimento para β -galactosídeos;
4. **pentraxinas:** subunidade com arranjo pentamérico e ligação variável a carboidratos (galactose, monossacarídeos fosforilados e sulfatados e outros);

5. **lectinas do tipo P:** motivo repetitivo único, com dependência de cálcio variável, reconhece glicoproteínas contendo manose-6-fosfato.

Células tumorais e tecidos malignos podem conter lectinas que são similares em especificidade e tamanho molecular às lectinas encontradas em células e tecidos normais. As mesmas propriedades de reconhecimento, adesão, proliferação, diferenciação e migração celular, têm associado as lectinas endógenas em processos de transformação tumoral e metástase (RAZ *et al.*, 1987; LOTAN & RAZ, 1988a; LOTAN & RAZ, 1988b; revisto por LAHM *et al.*, 2004). LOTAN e RAZ (1988b) observaram que lectinas encontram-se na superfície de células malignas de vários tipos tumorais, em níveis variáveis, havendo um aumento da sua expressão na transformação maligna.

A galectina-3, que além de ser expressa em quantidades elevadas em vários tipos de células neoplásicas (ZONSTANTINOV *et al.*, 1996; BRESALIER *et al.*, 1997), tem efeito anti-apoptótico, afeta interações célula-célula/ célula-matriz extracelular e promove neovascularização tumoral (revisto por TAKENAKA *et al.*, 2004), facilitando, portanto, a tumorigênese. Entretanto, CALIFICE e colaboradores (2004) demonstraram que, em tumor de próstata humano, a galectina-3 pode tanto desempenhar ação pró quanto antitumoral, em termos de progressão e angiogênese, conforme sua localização nuclear ou citoplásmica. Ainda em relação as galectinas, UEDA e colaboradores (2004) demonstraram que a expressão ectópica de galectina-7 em linhagem celular de carcinoma de cólon tornava as células mais sensíveis a estímulos apoptóticos,

com redução na formação ou lentificação do crescimento dos tumores e supressão da angiogênese.

Galectina-1 e galectina-9 também estão relacionadas a efeitos antitumorais por indução de apoptose em células de humanos e murinos (PERILLO *et al.*, 1995; PERILLO *et al.*, 1998). A galectina-9 tem o poder de induzir um aumento do número de células TCD8+ TIM-3+ que produzem IFN- γ , porém esta lectina animal também tem um efeito negativo que seria o de induzir a apoptose em células TCD4+ TIM-3+ (NAGAHARA *et al.*, 2008). As lectinas do tipo-C influenciam diretamente a sobrevivência de células tumorais por afetar a adesão celular ao endotélio ou à matriz extracelular e a vascularização tumoral (neoangiogênese), processos essenciais para o estabelecimento de tumores (GORELIK *et al.*, 2001).

1.2.3. Lectinas vegetais e suas atividades biológicas

A maioria das lectinas vegetais é proveniente de sementes. Lectinas de plantas são consideradas um grupo heterogêneo de proteínas, quando comparadas em termos de propriedades bioquímicas e físico-químicas, estrutura molecular, especificidade de ligação a carboidratos e atividades biológicas. Apesar destas várias diferenças, através da análise da literatura científica com relação à sua ocorrência, estrutura molecular, seqüência de aminoácidos, estrutura tridimensional, biossíntese, especificidades de ligação e evolução molecular, as lectinas foram agrupadas em sete famílias distintas, estrutura e evolutivamente relacionadas (VAN DAMME *et al.*, 1998):

1. **Lectinas de leguminosas:** família de lectinas vegetais mais bem estudada, composta de mais de 100 diferentes lectinas, provenientes de 70 diferentes espécies e pertencentes a diferentes grupos taxonômicos. A grande maioria foi isolada de sementes. Inclui nesta família lectinas como concanavalina-A (ConA), fitohemaglutinina (PHA), lectina de feijão de soja (SBA), *Lens culinaris*, *Vicia faba*, *Canavalia ensiformes*, *Canavalia brasiliensis*, *Dolichos biflorus* *Griffonia simplifolia* e muitas outras.

2. **Lectinas ligantes de quitina:** por definição, esta família compreende todas as proteínas que possuem um domínio de heveína, termo que se refere a uma pequena proteína de 43 aminoácidos, proveniente do látex, extraído da árvore da borracha (*Hevea brasiliensis*). A primeira lectina deste grupo a ser isolada e caracterizada foi a aglutinina do gérmen de trigo (WGA). Foram depois extraídas do látex da seringueira (*Euphorbiaceae*), de sementes de *Amaranthus caudatus* (*Amaranthaceae*), de folhas e frutos de *Sambucus nigra* (*Caprifoliaceae*), sendo também abundantes nas famílias *Gramineae* (gérmen de várias sementes) e *Solanaceae*, (batata, tomate, tamarindo e outras). Encontram-se ainda, como proteínas minoritárias, nas famílias *Phytolaccaceae* (raízes e folhas de ervas daninhas – “pokeweed”), *Urticaceae* (sementes e rizomas de *Urtica dioica* – aglutinina da urtiga), *Papaveraceae* (sementes de *Chelidonium majus*) e *Viscaceae* (tecidos verdes do visco).

3. **Proteínas inativadoras de ribossoma (RIP) tipo 2 e lectinas relacionadas:** estas proteínas subdividem-se em RIP tipo 1, que consistem de um polipeptídeo único, com atividade catalítica para RNA ribossômico, e as RIP

tipo 2 que, além desta unidade (cadeia A) com atividade enzimática, contém uma cadeia B, que abriga dois ou mais sítios de ligação a carboidrato, possuindo, portanto, atividade de lectina. Ambas inibem a síntese protéica em sistemas livres de células. Enquanto as RIP tipo 1 não podem entrar nas células, as RIP tipo 2 podem ser endocitadas ao ligarem-se a receptores de glicanas da superfície celular e inativarem ribossomas, resultando em morte celular. As RIP tipo 2 (lectinas) apresentam um grau variável de citotoxicidade, não tóxicas a extremamente tóxicas. Fazem parte deste grupo a ricina e a abrina, que estão ligadas à história da descoberta das lectinas. RIPs tipo 2 genuínas têm sido encontradas em sementes e outros tecidos de plantas, pertencentes às famílias *Euphorbiaceae* (*Ricinus communis* e *Croton sp.*), *Leguminosae* (*Abrus precatorius*), *Viscaceae* (*Viscum album* e *Phoradendum californicum*), *Passifloraceae* (*Adenia digitata* e *A. volkensis*), *Ranunculaceae* (*Eranthis hyemalis*), *Lauraceae* (*Cinnamomum canphora*) *Sambucaceae* (*Sambucus sp.*), *Cucurbitaceae* (*Momordica charantia*) e *Iridaceae* (*Iris sp.*).

4. Lectinas de monocotiledôneas (“monocot”) ligantes de manose: esta é uma superfamília de lectinas que se liga de forma específica a manose e tem sido exclusivamente encontrada em plantas do subgrupo das monocotiledônias. Todas elas são compostas de subunidades com seqüência e estrutura tridimensionais que não se relacionam evolutiva ou estruturalmente a outras lectinas ligantes de manose. É uma família relativamente nova de lectinas, cujo primeiro componente, isolado em 1987 de *Galanthus nivalis* (GNA), despertou atenção, sobretudo, por suas propriedades anti-retrovirais. Foram isoladas de

seis diferentes famílias de monocotiledôneas: *Alliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Araceae*, *Bromeliaceae*, *Liliaceae* e *Orquidaceae*. Têm sido encontradas na maioria dos tecidos vegetais, tais como, folhas, flores, bulbos, tubérculos, rizomas, raízes e néctar, mas não em sementes (com exceção para *Clivia miniata*). São compostas por protômeros com dois domínios de ligação a açúcar que podem formar dímeros ou tetrâmeros.

5. Lectinas relacionadas a jacalina: jacalina é o nome dado para a lectina majoritária extraída de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*). O termo “lectinas relacionadas a jacalina” é usado, coletivamente, para todas as lectinas que com ela se relacionam evolutiva e estruturalmente. A família da jacalina compreende dois subgrupos. O primeiro é o subgrupo *Moraceae*, com especificidade para GlcNAc (N-acetil-glucosamina), e o segundo é o *Convolvulaceae*, com especificidade para manose/maltose. Lectinas do subgrupo *Moraceae*, ao qual pertencem as lectinas derivadas de *Maclura pomifera* e *Artocarpus*, são tipicamente encontradas em sementes, enquanto as do subgrupo *Convolvulaceae*, *Calystegia sepium* (Calsepa) e *Convolvulus arvensis* (Conarva), ocorrem em tecidos de estocagem subterrâneos. Os dois subgrupos apresentam estruturas moleculares diferentes.

6. Lectinas amarantinas: o termo “amarantina” refere-se originalmente à lectina de sementes de *Amaranthus caudatus*, sendo hoje usado, coletivamente, para as lectinas de sementes das várias espécies de *Amaranthus* (*A. caudatus*, *A. spinosus*, *A. leucorpus* e *A. cruentus*), específicas para GalNAc. As amarantinas são proteínas homodiméricas, não glicosiladas.

7. **Lectinas do floema de *Cucurbitaceae*:** pequena família de aglutininas ligantes de quitina, derivadas do floema das espécies *Cucurbitaceae*. Não são relacionadas com outras lectinas cucurbitáceas (como, por exemplo, a RIP tipo 2 *Trichosanthes kirilowii*), nem têm domínios de heveína (como outras ligantes de quitina). Primeiramente foi identificada em *Cucurbita maxima* (abóbora), tendo sido posteriormente isolada do floema (também chamado de proteína PP2) de outras espécies de *Cucurbita*, *Citrulus*, *Cucumis*, *Sechium*, *Luffa*, e *Coccinea*.

8. **Outras lectinas:** várias lectinas não podem ser classificadas por não terem aparente similaridade estrutural com as famílias de lectinas acima descritas ou por não haver informações disponíveis sobre o seu sequenciamento que possam estabelecer relações evolutivas.

As lectinas vegetais possuem funções aplicadas nas próprias plantas que são controversas, parecendo estar relacionadas à proteção contra agentes patogênicos. Lectinas tóxicas, como ricina e PHA, são protetoras contra predadores. As lectinas de *Galanthus nivalis*, de *Griffonia simplicifolia* e PHA têm atividade inseticida e as lectinas ligantes de GlcNAc estão relacionadas à proteção contra fungos. As lectinas de leguminosas possuem a capacidade de associação simbiótica com bactérias do solo, do gênero *Rhizobium*, fixadoras de nitrogênio possuem também a função de armazenamento de proteínas e podem ligar-se a enzimas, alterando o seu estado de ativação. Embora as plantas contenham grandes quantidades de lectinas, estas, em geral, não apresentam receptores para as suas próprias lectinas (revisto por PEUMANS & VAN

DAMME, 1995; KIJNE *et al.*, 1997; revisto por RUDIGER & GABIUS, 2001; revisto por SHARON & LIS, 2004).

Lectinas vegetais, ao promover reconhecimento específico de carboidratos expressos de forma anormal na superfície célula animal, podem induzir migração e expansão clonal de células efectoras do sistema imune, gerar ou aumentar a citotoxicidade de células da imunidade inata e adaptativa e, ainda, interferir nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular (OGAWARA *et al.*, 1985; CHATWALL *et al.*, 1996; DONG *et al.*, 1996).

Lectinas vegetais também têm a capacidade de aumentar os mecanismos de defesa do sistema imune induzindo resposta imunomodulatória com produção de IL-2 por linfócitos T (MODY *et al.*, 1995). Algumas das lectinas vegetais já descritas induzem inúmeras respostas, de relevante importância, no sistema imune. NOWELL (1960) observou que a lectina PHA induz resposta mitogênica em linfócitos humanos, bem como as lectinas Con-A, a lectina de lentilha, a lectina de “lima bean”, a “pokeweed mitogen” (PWM), a lectina de *Ulex europeus*, a de *Vicia faba* (favina) (revisto por BROWN & HUNT, 1978). A Con-A injetada em camundongos pode induzir de maneira indireta a ativação de células da imunidade inata, incluindo as células NK (MYIAGI *et al.*, 2004). As células NK são de grande importância no combate a células tumorais por serem citotóxicas, e através da ativação destas células, e da secreção de IFN- γ , a cianobactéria *Spirulina*, quando administrada oralmente, promoveu uma atividade antitumoral em uma linhagem do melanoma B-16 (AKAO *et al.*, 2009).

Uma lectina de grande relevância sob aspectos imunológicos é a lectina do visco (*Viscum album*), ligante de galactose, que possui atividade antitumoral (ELSÄSSER-BEILE *et al.*, 2001; BEUTH *et al.*, 1991; LAVASTRE *et al.*, 2005; HOLSTOG *et al.*, 1988; VAN HUYEN *et al.*, 2006) e que, quando em baixas concentrações, potencializa o efeito citotóxico de drogas para o tratamento do câncer (BANTEL *et al.*, 1999). Esta atividade ocorre devido a efeitos imunomodulatórios como a ativação das células NK (HAJTO *et al.*, 1998; MUELLER *et al.*, 1990a; MUELLER *et al.*, 1990b; VAN HUYEN *et al.*, 2006), estimulação de secreção de citocinas como o TNF- α e IL-12 (VAN HUYEN *et al.*, 2006); assim como a indução de apoptose de células leucêmicas (LAVASTRE *et al.*, 2005), o aumento da atividade de monócitos/macrófagos (VAN HUYEN *et al.*, 2006; KUTTAN *et al.*, 1990; KUTTAN *et al.*, 1992) e do número de células T antígenos específicas (BEUTH *et al.*, 1991; VAN HUYEN *et al.*, 2006).

Devido a alguns destes efeitos imunomodulatórios, a lectina recombinante do visco possui efeito inibitório no desenvolvimento de tumores, promove agregação de células do sangue na seguinte ordem: neutrófilos, células mononucleares e eritrócitos (TIMOSHENKO *et al.*, 1995). Outra lectina com poder antitumoral é a do extrato do caule da planta *Acanthopanax senticosus*, a qual induziu apoptose em células de câncer de estômago humano (HIBASAMI *et al.*, 2000).

Algumas lectinas vegetais possuem atividade de aglutinação e citotoxicidade que aumentam frente a células leucêmicas nas quais existam ligantes específicos para as mesmas, como a lectina do gérmen de trigo (WGA).

Em alta concentração, esta lectina mostrou-se altamente citotóxica e promoveu intensa aglutinação de células leucêmicas. OGAWARA e colaboradores (1985) demonstraram que a lectina WGA induz morte de células tumorais por aumentar a citotoxicidade de monócitos, ao que se denominou LDMC – citotoxicidade mediada por monócitos dependente de lectina.

FIK e colaboradores (2001) descreveram o efeito inibitório da lectina purificada de celidônia (*Chelidonium majus*) frente ao crescimento de fibroblastos normais e células tumorais *in vitro*. Notou-se ainda que a aglutinina da soja (SBA) também apresenta a propriedade de aglutinar, preferencialmente, células malignas, indicando que alterações de glicanas da superfície celular poderiam estar associadas ao câncer (AUB *et al.*, 1965; BEVAN & COHN, 1975). Uma lectina ligante de manose, assim como ArtinM, é a lectina extraída de *Parkia glandulosa* e *Parkia roxburghii*, que também têm efeito antitumoral, sendo que a primeira estimula resposta mitogênica em linfócitos (KAUR *et al.*, 2005).

Já foi visto que extratos de plantas podem controlar o crescimento tumoral (metástase) através da ativação de células NK e macrófagos (YOON *et al.*, 1998; SAIKI, 2000), como por exemplo o extrato aquoso de *Acanthopanax senticosus*, que também induziu a liberação de IL-12, TNF- α , IFN- γ por macrófagos (YOON *et al.*, 1998). A lectina da banana Del Monte, ligante de frutose e glucosamina, induz a liberação de citocinas como IFN- γ a qual promove supressão tumoral, além de induzir a secreção de TNF- α (CHEUNG *et al.*, 2009). Muitas outras lectinas vegetais possuem propriedades antitumorais

(OGAWARA *et al.*, 1985; CHAI *et al.*, 1992; KIM *et al.*, 1993; MITCHEL *et al.*, 1999; ANDRADE *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2000; REMMELINK *et al.*, 1999), como por exemplo a pectina cítrica (NANGIA MAKKER *et al.*, 2002; PIENTA *et al.*, 1995), a lectina vegetal ArtinM através da indução da necrose das células tumorais do Sarcoma-180 (LÔR, 2004) e a lectina extraída de *Abrus abrin* que induziu uma diminuição do crescimento tumoral através da indução da apoptose; e desta maneira inibiu o crescimento do linfoma de Dalton sem danificar células saudáveis (BHUTIA *et al.*, 2008). A lectina extraída de *Polygonatum odoratum*, ligante de manose, também induziu apoptose de células tumorais de fibrosarcoma L929 (LIU *et al.*, 2009).

Outra possibilidade de utilização de lectinas vegetais em farmacoterapia seria a de funcionar como veículos de fármacos dirigidos a alvos contendo epítomos de carboidratos altamente específicos, ou ainda, como dispositivos de bloqueio anti-adesão em processos infecciosos (RUDIGER *et al.*, 2000; BIES *et al.*, 2004).

1.2.3.1. Lectinas vegetais ArtinM e jacalina

ArtinM, como recentemente nomeada (PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2008), KM⁺ ou artocarpina como chamada antigamente, é uma lectina vegetal, ligante de D-manose, extraída de sementes de *Artocarpus integrifolia* (jaca) (SANTOS DE OLIVEIRA *et al.*, 1994), que desencadeia vários fenômenos de importância imunológica, quando ligada a sua glicana específica. É uma proteína não glicosilada, homotetramérica, com um único sítio de ligação a açúcar por

subunidade e massa molecular aparente de 54 kDa, migrando em SDS-PAGE como um peptídeo de 13 kDa (ROSA *et al.*, 1999). Atua de maneira dependente da ligação com glicanas que possuem D-manose acessível na superfície de células ou da matriz extracelular (MISQUITH *et al.*, 1994). Pertence à família da jacalina, com a qual apresenta 52% de homologia na seqüência de aminoácidos (ROSA *et al.*, 1999), indicando uma origem evolutiva em comum. Compartilha, entretanto, características das duas subfamílias deste grupo. Da mesma forma que a subfamília *Moraceae*, ArtinM apresenta estrutura homotetramérica e é extraída de sementes. Assemelha-se à subfamília *Convolvulaceae*, particularmente no que se refere à sua especificidade de ligação à D-manose. Enquanto o grupo *Moraceae* caracteriza-se pela ligação de GalNAc, as lectinas *Convolvulaceae*, ligam manose/maltose (VAN DAMME *et al.*, 1998). Em algumas regiões, apresenta similaridade de seqüência com a Calsepa (*Calystegia sepium*), pertencente a subfamília *Convolvulaceae* (ROSA *et al.*, 1999).

ArtinM é a lectina minoritária do extrato bruto de sementes de *Artocarpus integrifolia*, correspondendo a 0,5 a 1% do total de proteína extraída, sendo a jacalina a majoritária (SANTOS DE OLIVEIRA *et al.*, 1994). O extrato bruto foi inicialmente avaliado quanto a sua capacidade de aglutinar hemácias de diferentes espécies animais (MOREIRA & AINOUS, 1978; BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981), o que sugeriu a presença de lectina(s) nesse extrato. A purificação da jacalina e sua utilização em ensaios biológicos trouxeram a sugestão de que, dentre as atividades desencadeadas pelo extrato bruto de *Artocarpus integrifolia*

(BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981; ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985), pelo menos uma – a atividade mitogênica sobre monócitos do sangue periférico humano – não parecia ser atribuível à jacalina (ROQUE-BARREIRA *et al.*, 1986). A sugestão era baseada no fato de que jacalina purificada não reproduzia a resposta proliferativa desencadeada pelo extrato bruto. A existência de uma segunda lectina no extrato de *Artocarpus integrifolia* foi demonstrada por MIRANDA-SANTOS e colaboradores (1991) e por SANTOS-DE-OLIVEIRA e colaboradores (1994), que evidenciaram, respectivamente, suas atividades mitogênica e indutora de migração de neutrófilos.

Ambas as lectinas, jacalina e ArtinM, induzem a produção de citocinas. A jacalina estimula a síntese de altos níveis de TGF- β , IL-3/GM-CSF e IL-6, não tendo qualquer efeito sobre a secreção de IFN- γ , IL-2 ou IL-4 por células esplênicas de camundongos (BLASCO e DELGADO, 1993). Estudos sobre a ação adjuvante da jacalina na resposta imune humoral contra *Trypanosoma cruzi* foram feitos por ALBUQUERQUE e colaboradores (1999). Os autores relataram que a jacalina é capaz de estimular resposta humoral tanto para o hapteno TNP (trinitrofenil) como para *T. cruzi*, e que a ação protetora dos anticorpos específicos para *T. cruzi* depende do número de parasitas usados no protocolo de imunização.

Uma das primeiras atividades descritas para ArtinM foi a de induzir neutrófilos por haptotaxia. A migração de neutrófilos por haptotaxia foi possibilitada pela interação de ArtinM com componentes glicosilados presentes no endotélio e no tecido perivascular (GANIKO *et al.*, 1998; GANIKO *et al.*, 2001). A injeção de ArtinM radioiodinado na pele de ratos demonstrou haver ligação seletiva

da lectina a componentes do endotélio de pequenos vasos e do tecido conjuntivo frouxo perivascular. A detecção de ligação associou-se à observação de neutrófilos transmigando através do endotélio ou infiltrando o tecido perivascular (GANIKO *et al.*, 1998).

Para identificar glicoligantes de ArtinM, avaliações foram feitas em tecido pulmonar de rato. Observou-se marcação pela lectina biotinizada de vasos, alvéolos e tecido conjuntivo. Através de microscopia eletrônica, os ligantes de ArtinM foram localizados na superfície luminal e no citoplasma de células endoteliais, na superfície de células epiteliais alveolares, na membrana basal e no tecido conjuntivo intersticial. Tais interações foram invariavelmente inibidas por D-manose ou peroxidase, demonstrando serem dependentes dos CRDs de ArtinM. Ensaio histoquímico de dupla-marcação em tecido pulmonar mostraram que a ligação de ArtinM co-localiza-se com a marcação de anticorpos anti-laminina na membrana basal, na ECM e nas regiões de junção de vaso com alvéolo. Esse conjunto de resultados indica que a interação da lectina ArtinM com laminina viabiliza o estabelecimento e a manutenção de um gradiente de moléculas de ArtinM, que é necessário para induzir o movimento direcionado de neutrófilos (GANIKO *et al.*, 2005).

Outra atividade descrita para esta lectina foi a de desgranular mastócitos, com conseqüente aumento na migração de neutrófilos devido ao extravasamento do conteúdo granular dos mastócitos, além de aumento da liberação de citocinas (MORENO *et al.*, 2003). A desgranulação de mastócitos pode resultar em liberação acentuada de histamina, que causa vasodilatação, o

que facilita a migração de células inflamatórias para o tecido. Além disso, SOUZA (1998) descreveu a capacidade de ArtinM de induzir a ativação de macrófagos e a secreção de citocinas, incluindo a IL-12, a qual exerce importante papel no combate a tumores, pois direciona um padrão de resposta imune Th1 (citotóxico). Esta propriedade foi avaliada em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major* que, após serem inoculados com ArtinM, modificaram seu padrão de secreção de citocinas de Th2 para Th1, conferindo proteção contra infecção por esse parasita (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001).

ArtinM também foi descrita por ter efeito inibitório no crescimento e estabelecimento do Sarcoma-180. Nesse estudo, houve um aumento da área de necrose e diminuição da proliferação das células tumorais de animais tratados com ArtinM, quando comparado com animais que não receberam tratamento, nos quais houve crescimento gradativo do tumor e aumento de matriz extracelular (LÔR, 2004; BARÉA, 2004). Não se sabe ao certo o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) este efeito antitumoral ocorre, porém sabe-se que esta lectina libera IL-12, que por sua vez aumenta a citotoxicidade de células NK, além de promover o aumento do número dessas células em tumores como neuroblastomas, leucemias e linfomas (LEE *et al.*, 1998), podendo deste modo promover um efeito antitumoral.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

A utilização de lectinas vegetais em estudos na área da Imunologia, incluindo doenças como o câncer, tem sido cada vez mais estudada devido às variadas ações induzidas por estas proteínas. ArtinM possui a capacidade de promover ativação de macrófagos e indução da liberação de IL-12 e esta capacidade tem sido determinante no uso da lectina como adjuvante em doenças parasitárias como a Leishmaniose. Por isso, neste trabalho o objetivo foi avaliar o efeito antitumoral da lectina vegetal ArtinM contra células do Carcinoma de Walker-256.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antitumoral da lectina ArtinM *in vivo*, após injeção de uma única alta dose da lectina, em dois protocolos (precoce e tardio)
- Identificar o padrão de necrose induzido pela lectina ArtinM.
- Observar a capacidade da lectina ArtinM em desencadear resposta anti-angiogênica durante o crescimento da massa tumoral.
- Caracterizar o infiltrado de células inflamatórias como macrófagos, células NK, linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+ no interior da massa tumoral de animais tratados ou não com ArtinM.

- Identificar o padrão das citocinas TNF- α e IFN- γ secretadas utilizando o soro dos animais tratados ou não com ArtinM.

3. ARTIGO

Diminished Growth of the Walker-256 Carcinoma Resulting from the Administration of ArtinM is Accompanied by Immunity Modulation

Short title: Antitumor Activity of the Lectin ArtinM on Walker-256 Carcinoma

Authors: Adriana Cristina Baréa¹, Jean Jacques Servan Schreiber¹, Gabriel Fugii¹, Michelle Simone Herdoíza Baran¹; Marciele Elisa Pereira¹; Maria Cristina Roque-Barreira², Andréa Novais Moreno^{1*}.

Affiliations: ¹Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brasil. ²Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

**Corresponding author:*

Correspondence to: Andréa Novais Moreno.

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brasil. Telephone/Fax: (55) (41) 3271 2285

E-mail: andrea.moreno@pucpr.br

Keywords: Lectin ArtinM, *Artocarpus integrifolia*, Walker-256 Tumor, Immunomodulatory activity; Innate and Adaptive Immunity, Antitumor activity.

International Journal of Immunopathology and Pharmacology

ABSTRACT

ArtinM is a D-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* that induces protective effect against infections to Th1-mediated immune response through macrophages activation with IL-12 p40 release. Therefore, the present study evaluated the lectin antitumor activity through the evaluation of the tumor size in two different protocols: premature and delayed. The animals were injected intraperitoneally with ArtinM (50 µg/ml) or PBS (control animals) 24 hours (premature treatment) or 7 days (delayed treatment) after tumor implantation. The animals were euthanized 7, 14 and 21 days after the treatment in the premature group, and 14 and 21 days in the delayed group. The animals had their blood collected for cytokine release analysis (TNF- α and IFN- γ) and the tumors were measured and processed for Hematoxylin-Eosin staining to evaluate tumor morphology. The tumors were also processed for immunohistochemistry for CD57, CD14, CD4 and CD8. The results showed that ArtinM induces 1.5 time decrease in tumor growth for the premature group and 3.0 times for the delayed group, with a significant increase of necrosis areas and a decrease of neoangiogenesis areas, when compared with the control group. The lectin also induced an increase of CD57, CD14, CD4 and CD8 cells in the tumor mass as well as an IFN- γ release in both groups, and an inhibition of the TNF- α release in both groups compared to the control. Together, these results indicate that the immunomodulatory activity of ArtinM could promote an inhibition of tumor growth, probably through the intense immune response activation against tumor cells.

1. INTRODUCTION

Cancer is a term used for diseases in which abnormal cells divide without control being able to invade other tissues [1,2], and is also characterized by erroneous expression of most glycoconjugate molecules on the tumor cells surface that diverge from those of non-transformed progenitor cells. These quantitative and qualitative modifications on the glycoconjugates, which have been called aberrant glycosylation [3,4], are essential for tumor invasion, adhesion and metastasis [5]. These glycosylation patterns were first identified through the use of monoclonal antibodies against carbohydrate-dependent antigens and also through the use of plant lectins.

Lectins are a diverse group of proteins or glycoproteins that specifically bind to cell surface carbohydrates inducing various biological effects including blood cell aggregation, NK cells and T lymphocyte activation. They also induce cytokine release [6], increase of monocytes and macrophage activities [7-9], necrosis or apoptosis on tumor cells [10-12] and inhibition of neoangiogenesis [13].

The minority lectin extracted from *Artocarpus integrifolia* seeds, recently named ArtinM [14], binds specifically to D-mannose and triggers many biological mechanisms, such as neutrophil haptotactic migration [15] and mast cell degranulation with cytokines release [16]. Moreover, ArtinM induces IL-12 p40 *in vivo* and has a protective Th1 response in Balb/c mice against *L. major* infection [17]. Although ArtinM induced IFN- γ production, the combination of the lectin with *Leishmania amazonensis* antigen did not lead to lesion reduction. However, ArtinM induced dendritic cells (BMDC) maturation by enhancing the expression of MHC II, CD80 and CD86. These observations indicate the modulatory role of plant lectin ArtinM in leishmaniosis vaccination which may be

related to their action on the initial innate response [18]. ArtinM was described as a potential immunotherapeutic molecule on the severity of *P. brasiliensis* infection by induced higher levels of nitric oxide, IL-12, interferon- γ , and tumor necrosis factor- α . [19]. Although, the authors observed similar levels of IL-10 in the lung homogenates of the ArtinM-treated compared to non-treated mice [19].

In the present study, we investigated the immune mechanisms activated against tumor cells, including induction of necrosis, inhibition of neoangiogenesis, immune cell migration and cytokine release induced by ArtinM.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Purification of ArtinM

The lectin ArtinM was purified by affinity chromatography as previously described by Santos-de-Oliveira *et al.* [20]. The lectin purity was analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* [21].

2.2 Rats and Tumor cells

Male adult Wistar rats (150–200 g), obtained from the PUCPR, were maintained under a 12 h light/12 h dark cycle (lights on at 06:00 h), and controlled temperature conditions (23–18°C), receiving water and food *ad libitum*. The present study was approved by the Ethics Committee of PUCPR (Doc. Number: 189). Walker carcinoma

cells were harvested from ascitic peritoneal fluids of adult male Wistar rats in which the cells were maintained by serial passage every 5-6 days.

2.3 Volume of the tumor mass

For the evaluation of the antitumor activity, two groups of animals received a 0.2ml subcutaneous injection of Walker tumor cells (5×10^6 cells/ml) in the left inter-scapular region. Following, the animals received the intraperitoneal (IP) injection of ArtinM (50 μ g/ml) or only PBS (control group) after 24 h in the premature protocol and after 7 days in the delayed protocol. The animals (5 from each group and period of time analyzed) were euthanized with ketamine (Ketalar® Laboratories Parke & Davis) and xilazin (Xilazina®) 7, 14 and 21 days after the tumor implantation for premature protocol and 14 and 21 days for delayed protocol. The tumors were removed, weighed and measured. During laparotomy, the largest (a) and the smallest (b) superficial diameters of the tumor were measured on the surface of the Walker Carcinoma. The volume from the extirpated tumor and tumor weight between controls and experimental animals was calculated according to the formula $V = a \times b^2 / 2$ [22]. After the measurements, the tumors were fixed in 10% formalin for 24 h and processed by routine histological techniques. The blood of the animals was collected before the euthanasia for determination of serum cytokines.

2.4 Analysis of tumor morphology for necrosis and neoangiogenesis

Fixed tissues obtained from the tumors were paraffin embedded, sectioned, and stained with Hematoxylin-Eosin for analysis of necrosis areas and for the neoangiogenesis

analysis the count of the number of blood vessels was done in 10 different sections from tumors.

2.5 Characterization of inflammatory cells in the tumor mass by Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, the sections were incubated with anti-CD57, anti-CD14, anti-CD4 and anti-CD8 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Immunoglobulin conjugated to peroxidase-labeled dextran polymer (Envision+/Peroxidase, DakoCytomation®) was used as secondary antibody, and liquid DAB (DakoCytomation®) was used for visualization. The control sections were incubated without the primary antibody. The image capture was made with microscope Olympus BX 50 and for morphometric analysis 10 images of 3 tumors of each group were used on the Image-Pro Plus software (Media Cybernetics).

2.6 Cytokine Quantification (TNF- α and IFN- γ)

The serum TNF- α and IFN- γ content was measured using ELISA development kit for Rat TNF- α and Rat IFN- γ (PeproTech Inc.,) according to the manufacturer's instructions.

2.7 Statistical Analysis

All results are reported as means \pm Standard Deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare means between treatment groups. Student's t-test was

used to determine if the treatment animals was significantly different when compared to the untreated animals. P values of 0.05 or less were regarded as statistically significance.

3. RESULTS

3.1 ArtinM induces an antitumor activity against Walker-256 tumor cells evidenced by tumor volume diminishment

In order to investigate if the lectin ArtinM could exert an antitumor activity, we evaluated the lectin ability to induce the tumor mass size reduction after the treatment. We observed that the lectin ArtinM is, indeed, efficient against tumor cells growth in both protocols assayed (Figures 1A and 1B), especially in the delayed group (Figure 1B). In the premature protocol, the control animals treated only with PBS had the tumor mass 1.5 times larger than the animals that were treated with ArtinM (Figure 1A), although the tumor mass continued growing gradually in the three periods of time. In the delayed protocol the tumor reduction was even superior (3 times smaller than the size of control animals) and, more interestingly, the gradual increase did not happen (Figure 1B). There was no loss of animals in any of the assays or in any of the groups.

3.2 ArtinM promotes tumor tissue damage (necrosis) and decreased neoangiogenesis evidenced by morphological analysis

Morphological analysis of tumors obtained from animals that received premature protocol shows that after 7 days of the treatment with PBS tumor cells begin to organize in the middle of the extracellular matrix (Figure 2A), a characteristic that persists

throughout the evaluation of the other periods (14 and 21 days), showing the progression and establishment of tumor cells (Figures 2B and C, respectively). We can also observe the increase of the number of blood vessels inside the tumor mass during tumor progression. On the contrary, in the tumors of animals treated with ArtinM there was a reduction of the tissue organization, with the less compact cell mass after 7 days of treatment (Figure 2D). After 14 days of treatment, we can observe that ArtinM induced a highly toxic environment, since the tumor has larger areas of necrosis, characterized by anuclear cells, with severe degeneration of the extracellular matrix (Figure 2E). The tumor progression (21 days after treatment) was similar to 14 days after the treatment. Tumors from animals treated with PBS were characterized by the tumor organization in the extracellular matrix (Figure 2C), and this analysis was completely reversed in tumors from animals treated with ArtinM, which showed necrotic areas and degenerated extracellular matrix (Figure 4E).

In the delayed protocol, we observed that in animals euthanized 14 and 21 days after receiving treatment with PBS (Figures 3A and B, respectively), the tumor was richly vascularized and the cells are displayed in a high degree of organization in the extracellular matrix. On the other hand, in the tumors of animals treated with ArtinM in the same period, 14 and 21 days (Figures 3C and D, respectively) we can clearly observe a poorly vascularized and disorganized tissue with areas of necrosis and loss of integrity of the components of the extracellular matrix.

In the angiogenesis assay we can observe the gradual increase of new blood vessels in tumors obtained from control animals (treated with PBS) in both protocols premature and delayed (Figures 4A and B, respectively). As expected by the morphologic

analysis, the tumors obtained from animals treated with ArtinM had lower numbers of blood vessels, mainly in the delayed protocol (Figure 4B).

3.3 ArtinM induces immune cells migration into the tumor mass as evidenced by immunohistochemistry assays

In the analysis of the immunolabeling for CD14+, we observed a positive labeling in the tumor mass in both premature and delayed protocols (Figures 5A and B, respectively), which showed gradual increase of macrophages in the tumor, and when compared with the control animals, the cells number was over 2 times higher.

The analysis of the immunolabeling for CD57+ showed a positive labeling in both premature and delayed protocols (Figures 6A and B, respectively), being that the cells number induced by ArtinM was around 10 times higher, when compared to the control animals. Although the number of NK cells gradually and significantly decreases during the periods of time in premature protocol (Figure 6A), the number of NK cells in delayed was interestingly maintained in both periods of time, and showing that ArtinM was able to maintain the activation of the immune system stable when injected 7 days after tumor implantation.

In the analysis of the immunolabeling for CD4+, we also observed a positive labeling in the tumor mass in both premature and delayed protocols (Figures 7A and B, respectively). The results showed that while the number of lymphocytes CD4+ decreases, in the control animals in both protocols, the cells number in the animals treated with ArtinM was drastically and gradually increase, 3 to 4 times when compared to the control animals.

The analysis of the immunolabeling for CD8⁺ showed a positive labeling in the tumor mass in both premature and delayed protocols (Figures 8A and B, respectively). Although the results of the immunolabeling were all quite similar, in the assay for lymphocytes TCD8⁺ the results were even more outstanding, since the cells number in animals treated with ArtinM was 10 to 20 times higher than in the control animals (Figures 8A and B, respectively).

3.4 ArtinM induces a decrease in the release of TNF- α as evidenced by ELISA assays

Comparing the cytokine quantification of TNF- α in both premature and delayed protocols (Figures 9A and B, respectively), we observe that the animals treated with the lectin had lower levels of TNF- α in the serum when compared to the PBS treatment and higher levels when compared to the control animals, which did not bear a tumor mass.

3.5 ArtinM induces an increase in the release of IFN- γ as evidenced by ELISA assays

The results for the IFN- γ quantification showed that the lectin ArtinM induced an IFN- γ release in both premature and delayed protocols (Figures 10A and B, respectively). The level of this cytokine is 1.5 higher in the serum of animals treated with the lectin when compared with observed in animals treated with PBS. However the level of IFN- γ in negative control animals was much lower than both the control and treated animals, suggesting the fact that the presence of a tumor naturally induces immune responses, with consequent release of IFN- γ .

4. DISCUSSION

In this study, the biological effects of the mannose-binding plant lectin ArtinM were tested on Walker-256 carcinoma cells to evaluate the ability of the immunomodulatory activity, already described for the lectin, in inducing antitumor activity. Our results showed the high ability of ArtinM in promoting an antitumor activity observed by tumor growth decrease mainly 7 days after the tumor inoculation, suggesting that the lectin activity is most effective when the tumor is already established. This activity was accompanied by the observation of intense areas of necrosis, in which we observed many anucleate cells and degenerate extracellular matrix.

Some lectins have already been described as potent antitumor activity inducers, either through direct binding to tumor cells or systemically through the activation of immune responses. *Abrus abrin*, which is a plant lectin that binds specifically to galactosis, was shown to induce both *in vivo* [23] and *in vitro* [24] antitumor properties through the induction of tumor cell apoptosis. In the *in vivo* assay the lectin promoted an inhibition of the growth of different tumor cell lines, including Dalton's lymphoma, without damaging healthy cells [23], while in the *in vitro* assay the lectin induced the production of cytokines like IL-2, IFN-gamma and TNF-alpha indicating a Th1 type of immune response, an increase in percentage of T and B cell and NK cells activation [24].

In another study, the antitumor effect of the lectin extracted from *Abrus abrin* was provided through the diffusion of the protein into the cell membrane, after its binding to its specific carbohydrate located on the tumor cell surface, and consecutive binding to the mitochondria, promoting cellular apoptosis [25]. A mannose-binding lectin purified from *Polygonatum odoratum* also exerts antitumor activity through cell apoptosis through both

death-receptor and mitochondrial apoptotic pathways [26], as well as *Parkia glandulosa* and *Parkia roxburghii* which also induce antitumor activity and bind to mannose [27].

In this study it was observed that ArtinM, which was already shown to be an IL-12 inducer [17], inhibited neoangiogenesis in the tumor mass. It is known that IL-12 is an important cytokine for directly affecting inflammatory and angiogenic factors involved in tumor growth [28]. Gene therapy with IL-12 can inhibit tumor angiogenesis preventing sarcoma growth [29], since without angiogenesis the tumor mass cannot grow more than 2-3 mm³ [30]. IL-12 is also important for increasing NK cells cytotoxicity and for promoting the increase of the number of these cells inside tumors [31], leading to a Th1 immune response [32]. Importantly, NK cells produce IFN- γ [33], which induces macrophage activation with an increase in tumor antigen presentation and phagocytosis [34].

The mechanism of antitumor-induced activity of ArtinM is not completely understood, since we can't dismiss the lectin direct antitumor activity, ability already described for many plant lectins. However, in the present study, we can suggest that the immunomodulatory abilities of this lectin seem to be all closely associated with the antitumor activity, since intense cellular infiltrate and the increase of the pro-inflammatory cytokines, like IFN- γ and TNF- α were observed. We found that ArtinM promotes an increase of the migration of important immune cells (macrophages, NK cells, TCD4+ and TCD8+ lymphocytes) into the tumor tissue. Tumors obtained from ArtinM treated-animals showed 2 times the cell concentration and a gradual increase of CD14+ cells, while CD57+ cells was around 10 times higher, when compared to the control animals. We also observed that the tumors obtained from ArtinM treated-animals

had the TCD4⁺ and TCD8⁺ cell number drastically and gradually increased, 3 to 4 times and was 10 to 20 times higher, consecutively, when compared to the control animals. Previous studies have shown that Th1 immune response induces a significant lymphocyte infiltration into the tumor tissue eradicating the tumor via cell immunity and this response was abolished in the presence of anti-CD4, anti-CD8 or anti-IFN- γ antibodies [35].

Antitumor activity also involves both TCD4⁺ and TCD8⁺ sensibilization to tumor-associated antigens. TCD4⁺ cells, when stimulated by IL-12 are able to transmit regulatory signals to promote TCD8⁺ lymphocytes activation, leading to apoptosis and tumor death [36]. The important antitumor activity role of TCD8⁺ cells was evidenced by the fact that mice that were depleted of TCD8⁺ cells, but not of TCD4⁺, were not able to permanently eradicate the tumor. Our results showed a TCD8⁺ increase in the tumor obtained from ArtinM treated-animals about 10 to 20 times compared to the control group. It was also observed that IL-12 induces tumor regression and that this antitumor activity is mediated by TCD8⁺ lymphocytes, what was proved with the use of mice depleted of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes [37].

It is not known whether the lectin-carbohydrate binding occurs directly onto tumor cells surface or systemically, however it is known that ArtinM induces important biological activities such as neutrophil haptotatic migration [15], mast cell degranulation with consequent release of cytokines [16], macrophage activation, also with consequent release of IL-12 p40 [17] and neutrophil activation [38], which can all act in favor of an antitumor activity. The observation that mice infected with *Leishmania major*, with a characteristic Th2 immune response and consequently susceptible to the infection, restored their specific immunity after administration with ArtinM, which induced the

release of IL-12 (Th1 immune response), turning the mice resistant to the infection [17], leads us to think that the antitumor activity of ArtinM promoted in this study has to do with systemic activation. This inversion of immune response, from Th2 to Th1, which is the key to several studies, also promoted protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection through IL-12 production, dependent on TLR2 [19].

Interleukin 12 (IL-12) is a heterodimeric cytokine with many functions including induction of IFN- γ by NK cells and generation of Th1 cells producing IFN- γ [39]. A lot of lectins exert an *in vitro* antitumor effect, such as the *Viscum album* lectin, which promotes mitogenesis of tumor-bearing mice lymphocytes, which suppress tumor cells [40], and the lectin of *Agaricus bisporus* which is a potent *in vitro* inhibitor of colon tumor cells proliferation without being cytotoxic to healthy cells [41].

The lectin of mistletoe (*Viscum album*), which binds to galactosis, was described to promote an inhibition of the bladder tumors development in rats [42]. This lectin also induces NK cells activation, cytokines secretion, such as TNF- α , as well as an increase of the monocytes/macrophages activity and an increase of T cells number [42,43]. In other studies, the lectin of mistletoe induced an antitumor activity against melanoma B16 cells, probably by the induction of IL-12 secretion [7], which promotes macrophages activation. Due to all these apoptotic and immunomodulatory effects of this lectin, its extract has been currently used as complementary medication in cancer patients [44].

In vitro antitumor activity has also been previously described for other plant lectins, such as the WGA, which was shown to augment monocytes/macrophages cytotoxicity with consequent tumor cell death [45], and to promote intense agglutination of leukemic cells [46]. The direct cytotoxicity towards tumor cells, observed from

activated macrophages by tumor-associated antigens, can be beneficial to induce IL-12 secretion and to increase T lymphocytes reaction [47,48]. The negative effect is that tumor cells are able to release inhibitory cytokines, which induce lower macrophage infiltration into the tumor mass [49], and the few macrophages present in the tumor tissue can inhibit T and NK cells response [50, 51].

Oral administration of the cyanobacterium *Spirulina platensis* with BCG, promotes NK cell activation, as well as an increase of IFN- γ in the serum of tumor-bearing mice, leading to a reduction of tumor growth (B16 melanoma cell line) [52]. Together, IFN- γ and BCG, were seen to provide an antitumor activity through the induction of a large number of inflammatory cells inside or surrounding the tumor tissues [53], and when together with TNF- α it exerts an antitumor activity [54,55], leading to tumor necrosis, vasculature destruction and consequently the tumor cells' apoptosis [56].

ArtinM promotes an increase of the release of IFN- γ and an inhibition of the release of TNF- α when compared to the control animals. Studies have shown that high levels of TNF- α can have an inverse effect promoting tumor metastasis and angiogenesis [56]. However, between pros and cons, the role of TNF- α appears to be dual due to high secretion of this cytokine during an inflammatory process. TNF- α was the first agent described for cancer treatments that enhances the drugs diffusion into the tumor and destroys angiogenic veins selectively acting as an anti-tumor factor [57]. Lectins as *Viscum album* [42] and Gal-9 [58] induced low concentrations of TNF- α secretion as one of the antitumor effects. However, high levels of this cytokine lead to serious cachexia or even to septic shock when released systemically, leading to death [59]. The ability of the lectin to inducing secretion of the IL-12 [17], IFN- γ and TNF- α (observed in this study),

combined with increase in the inflammatory cells found into the tumor mass, suggests that the ArtinM immunomodulatory effect promoted a Th1 immune response crucial for lectin antitumor activity. Moreover, maintaining the levels of IL-10 in animals treated with ArtinM during the vaccination against *P. brasiliensis* [19] suggests a control in modulating pro-inflammatory action of the lectin. Another fructose binding-lectin, DBL (Del Monte Banana Lectin), also induces the release of cytokines like IFN- γ and it also induces the TNF- α release as antitumor factors [60].

In summary, our study demonstrated that the lectin ArtinM induces significant antitumor activity, especially when injected seven days after tumor implantation, with tumor volume decrease and the inhibition of neoangiogenesis. This activity is certainly the result of immune cells migration and activation, promoted by ArtinM, such as macrophages, NK cells, TCD4+ and TCD8+ lymphocytes, into the tumor tissue. In addition, ArtinM induces IFN- γ release, a cytokine known to induce a Th1 immune response, and a decrease of the release of TNF- α , which can be damaging when in high levels. Therefore, these results indicate that ArtinM is a potent immunomodulatory agent to promote tumor growth failure through tumor cell necrosis, neoangiogenesis inhibition, extracellular matrix degeneration, inflammatory cells migration and cytokine production.

Acknowledgements

We are very grateful to the financial support received from CAPES. The authors thank the technical assistance of Mrs. Sandra Maria Oliveira Thomaz (FMRP-USP) for the ArtinM isolation and purification and Mr. Luiz Cláudio Fernandes (UFPR) for donating

the Walker-256 Tumor lineage. We are also thankful to the Pathology Laboratory (PUCPR) for all the assistance provided.

REFERENCES

1. Fidler IJ. Cancer metastasis. *British Medical Bulletin* 1991;**47**:157-77.
2. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;**64**:327-36.
3. Raz A, Meromski L, Zuibel L, Lotan R. Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer* 1987;**39**:353-60.
4. Hakomori S. Aberrant glycosilation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res* 1989;**52**:257-331.
5. Brockhausen I. Glycodynamics of mucin biosynthesis in gastrointestinal tumor cells. *Adv Exp Med Biol* 2003;**535**:163-88.
6. Mody R, Joshi S, Chaney W. Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995;**33**:1-10.
7. Van Huyen, J-PD, Delignat S, Bayry J, Kazatchkine MD, Bruneval P, Nicoletti A, Kaveri SV. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Letters* 2006;**243**:32-37.
8. Kuttan G, Vasudevan DM, Kuttan R. Effect of a preparation from *Viscum album* on a tumor development in vitro and in mice. *J Ethnopharmacology* 1990;**18**:24-30.

9. Kuttan G, Kuttan R. Immunological mechanism of action of the tumor reducing peptide from mistle extract "NSC 524978# cellular proliferation. *Cancer Letters* 1992;**55**:12-29.
10. Kroemer G, Dallaporta B, Rersche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998;**60**:619-42.
11. Numata C. Apoptotic cell death induced by physarumin (hemmagglutinin from myxomycete, *Physarum polycephalum*). *Biol Pharm Bull* 1998;**21**:214-18.
12. Wang H, Ng TB, Ooi VE, Liu WK. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;**32**:365-72.
13. Gorelik E, Galili U, Raz A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2001;**20**:245-77.
14. Pereira-da-Silva G, Roque-Barreira MC, Els Van Damme JM. *Immunology Letters Issues* 2008;**119**:114-15.
15. Ganiko L, Martins AR, Espreafico EM, Roque-Barreira MC. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. *Glycoconj J* 1998;**15**:527-30.
16. Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, Roque-Barreira MC. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. *International Archives of Allergy and Immunology* 2003;**132**:221-30.
17. Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira MC, Silva JS. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major*

- antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology* 2001;**11**:1035-42.
18. Teixeira CR, Cavassani KA, Gomes RB, Teixeira MJ, Roque-Barreira MC, Cavada BS, da Silva JS, Barral A, Barral-Netto M. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine* 2006 Apr 5;**24**(15):3001-8.
19. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, Vendruscolo PE, Martinez R, Goldman MH, Panunto-Castelo A, Roque-Barreira MC. Therapeutic Administration of KM_ Lectin Protects Mice Against *Paracoccidioides brasiliensis* Infection via Interleukin-12 Production in a Toll-Like Receptor 2-Dependent Mechanism. *The American Journal of Pathology* 2008;**173**:2.
20. Santos-de-Oliveira R, Dias-Baruffi M, Thomaz SMO, Beltramini LM, Roque-Barreira MC. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol* 1994;**153**(4):1798-1807.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;**193**(1):265-75.
22. Carlsson G, Gullberg B, Hafström L. Estimation of liver tumor volume using different formulas - An experimental study in rats. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **105**(1): 20-23, 1983.
23. Bhutia SK, Mallick SK, Maiti S, Maiti TK. Antitumor and proapoptotic effect of *Abrus* agglutinin derived peptide in Dalton's lymphoma tumor model. *Chemico-Biological Interactions* 2008;**174**:11-18.

24. Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK. *In vitro* immunostimulatory properties of *Abrus* lectins derived peptides in tumor bearing mice. *Phytomedicine* Aug 2009;**16**(8):776-82.
25. Bhutia SK, Mallick SK, Maiti S, Mishra D, Maiti TK. *Abrus abrin* derived peptides induce apoptosis by targeting mitochondria in HeLa cells. *Cell Biology International* July 2009;**33**:720-27.
26. Liu B, Zhang B, Min M, Bian H, Chen L, Liu Q, Bao J. Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;**1790**:840–44.
27. Kaur N, Singh J, Kamboj SS, Agrewala JN, Kaur M. Two novel lectins from *Parkia glandulosa* and *Parkia roxburghii*: isolation, physicochemical characterization, mitogenicity and anti-proliferative activity. *Protein Pept Lett* 2005;**12**(6):585-95.
28. Dredge K, Marriott JB, Todryk SM, Dalglish AG. Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2002;**51**:521-31.
29. Morini M, Albini A, Lorusso G, Moelling K, Lu B, Cilli M, Ferrini S, Noonan DM. Prevention of angiogenesis by naked DNA IL-12 gene transfer: angioprevention by immunogene therapy. *Gene Ther* 2004;**11**(3):284-91.
30. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Bio Chem* 1992;10931-4.
31. Lee SM, Suen YJ, Knoppel E, Cair, MJ. The regulation and biological activity of interleukin 12. *Leuk Lymphoma* 1998;**29**(5-6):427-38.

32. Zitvogel L, Terme M, Borg C, Trinchieri G. Dendritic cell-NK cell cross talk: regulation and physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;**298**:157-74.
33. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, Vandeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechser M, Goodsaid F, Caligiuri MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999;**162**:4511-20.
34. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;**75**:163-89.
35. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, Sato T, Habu S, Tashiro H, Sato M, Ohta A. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication *in vivo*. *J Exp Med* 1999;**190**:617-27.
36. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowensterin C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 1998;**188**(12):2357-68.
37. Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK. Antitumor and antimetastatic activity of Interleukin-12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993;**178**,1223-30.
38. Toledo KA, Scwartz C, Oliveira AF, Conrado MC, Bernardes ES, Fernandes LC, Roque-Barreira MC, Pereira-da-Silva G, Moreno AN. Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. *Immunol Lett* Mar 2009;**123**(1):14-20.

39. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunomodulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994;**84**:4008-16.
40. Zarkovic N, Vukovic T, Loncaric I, Miletic M, Zarkovic K, Borovic S, Cipak A, Sabolovic S, Konitzer M, Mang S. *An overview on anticancer activities of the Viscum album extract Isorel*. *Cancer Biother Radiopharm* Feb 2001;**16**(1):55-62.
41. Parslew R, Jones KT, Rhodes JM, Sharpe GR. The antiproliferative effect of lectin from the edible mushroom (*Agaricus bisporus*) on human keratinocytes: preliminary studies on its use in psoriasis. *Br J Dermatol* Jan 1999;**140**(1):56-60.
42. Beuth J, Ko HL, Pulverer G. Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the β -galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c mice for two experimental mode systems. *In Vivo* 1991;**5**:29-32.
43. Timoshenko AV, Cherenkevich SN, Gabius HJ. *Viscum album* agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. *Biomed Pharmacother* 1995;**49**(3):153-8.
44. Hajto T, Hostanska K, Saller R. Mistletoe therapy from the pharmacologic perspective. *Forsch Komplementarmed* Aug 1999;**6**(4):186-94. Review.
45. Ogawara M. Induction of human monocyte-mediated tumor cell killing by a plant lectin, wheat germ agglutinin. *Jpn J Cancer Res* 1985;**76**(11):1107-14.
46. Remmelink M, Darro F, Decaestecker C, De Decker R, Bovin NV, Gebhart M, Kaltener H, Gabius H-J, Kiss R, Salmon I, Ganguy A. *In vitro* influence of lectins

- and neoglycoconjugates on the growth of three human sarcoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;**125**:275-85.
47. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumor associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002;**196**:254-65.
48. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:23-35.
49. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 1998;**64**:275-90.
50. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;**25**:677-86.
51. Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004;**4**(1):71-8.
52. Akao Y, Ebihara T, Masuda H, Saeki Y, Akazawa T, Hazeki K, Hazeki O, Matsumoto M, Seyal T. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Sci* 2009;**100**(8):1494–1501.
53. Wang M, Xie Z, Shi M, Lu H, Yu M, Hu M, Lu F, Ma Y, Shen B, Guo N. A new strategy to induce effective antitumour response *in vitro* and *in vivo*. *Scand J Immunol* 2008;**68**:287-96.

54. Watanabe N, Niitsu Y, Yamauchi N, Umeno H, Sone H, Neda H, Urushizaki I. Antitumor synergism between recombinant human tumor necrosis factor and recombinant human interferon- γ . *J Biol Response Mod* 1988;**7**:24-31.
55. Lasek W, Wankowicz A, Kuc K, Feleszko W, Golab J, Giermasz A, Wiktor-Jedrzejczak W, Jakobisiak M. Potentiation of antitumor effects of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma by macrophage-colony-stimulating factor in a MmB16 melanoma model in mice. *Cancer Immunol Immunother* 1995;**40**(5):315-21.
56. Waterston A, Bower M. TNF and cancer: good or bad? *Cancer Therapy* 2004;**2**:131-48.
57. Lejeune FJ, Rüegg C. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. *Bull Cancer* 2006;**93**(8):90-100.
58. Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, Chandwaskar, Karman J, Su EW, Hirashima M, Bruce JN, Kane LP, Kuchroo VK, Hafler DA. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 2007;**318**:1141–43.
59. Tisdale, MJ. Cancer Cachexia. *Langenbecks Arch Surg* 2004;**389**(4):299-305.
60. Cheung AH, Wong JH, Ng TB. *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. *Phytomedicine* 2009;**16**:594–600.

FIGURES AND LEGENDS

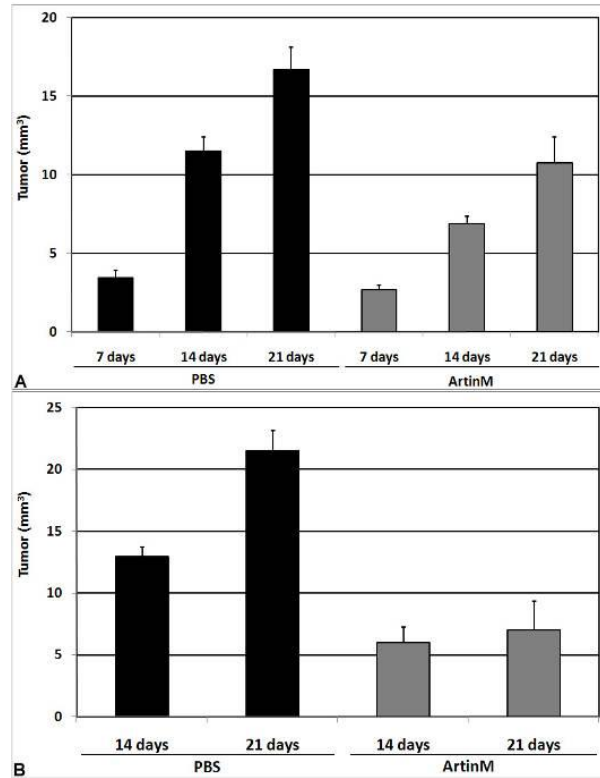


Figure 1 – ArtinM induces an antitumor activity against Walker-256 tumor cells evidenced by tumor mass diminishment. Analysis of the inhibitory effect, induced by the lectin ArtinM, on the growth of the tumor mass obtained from rats after 7, 14 and 21 days for premature group (A) or 14 and 21 days for delayed group (B) of the IP injection of ArtinM (50µg/ml) or of PBS (control group) carried through 24 hours after tumor inoculation. This analysis was based on the comparison with the tumor growth of the control group in two independent experiments ($p < 0.05$).

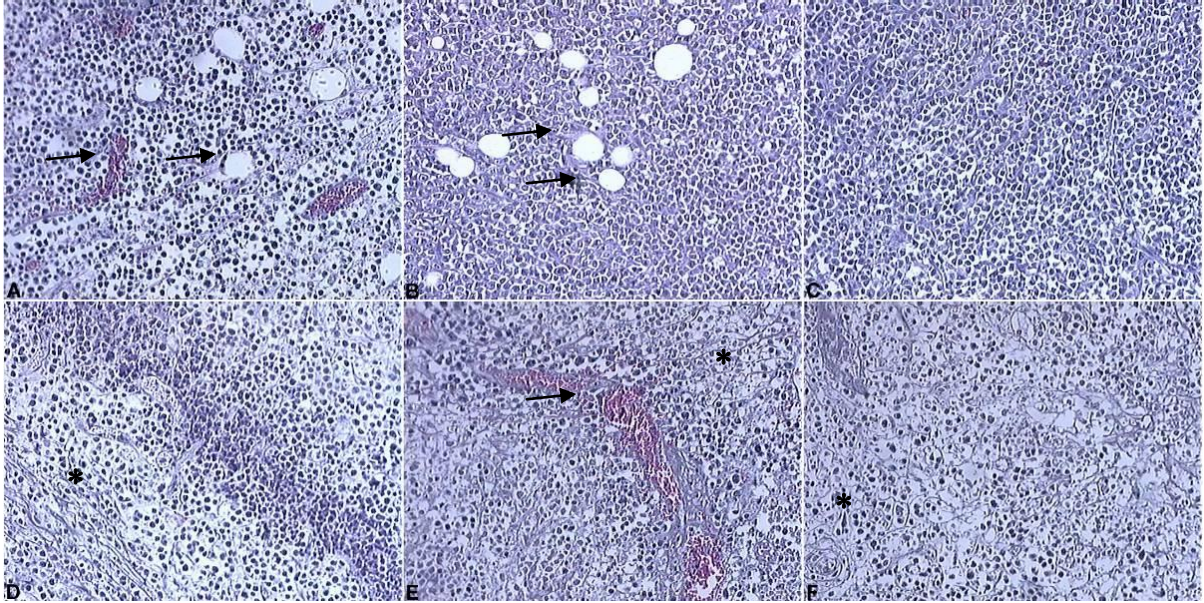


Figure 2 - Photomicrograph for necrosis evaluation of tumors obtained from Premature Protocol. In A, B and C we observe the tumors obtained following PBS treatment after 7, 14 and 21days, respectively. In D, E and F we observe the tumors obtained from animals treatment with ArtinM after 7, 14 and 21days, respectively. There are areas of necrosis characterized by cells with no nucleus (anucleate - *). We can also observe the poor vascularization (arrows), as observed in tumors obtained from control animals. Magnitude 20x.

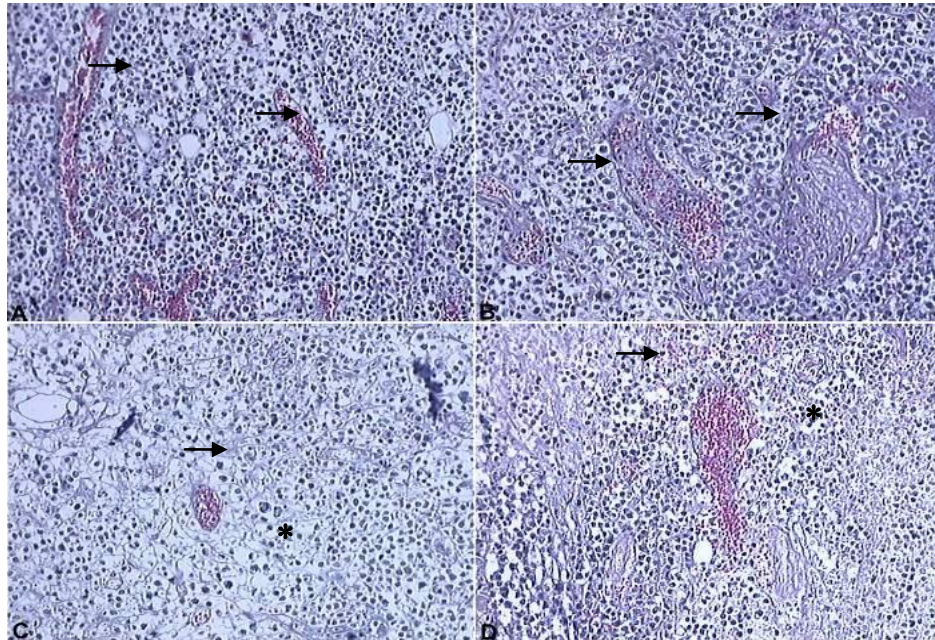


Figure 3 - Photomicrograph for necrosis evaluation of tumors obtained from Delayed Protocol. In A and B we observe the tumors obtained following PBS treatment after 14 and 21days, respectively. In C and D we observe the tumors obtained from animals treatment with ArtinM after 14 and 21days, respectively. There are areas of necrosis characterized by cells with no nucleus (anucleate - *). We can also observe the poor vascularization (arrows), as observed in tumors obtained from control animals. Magnitude 20x.

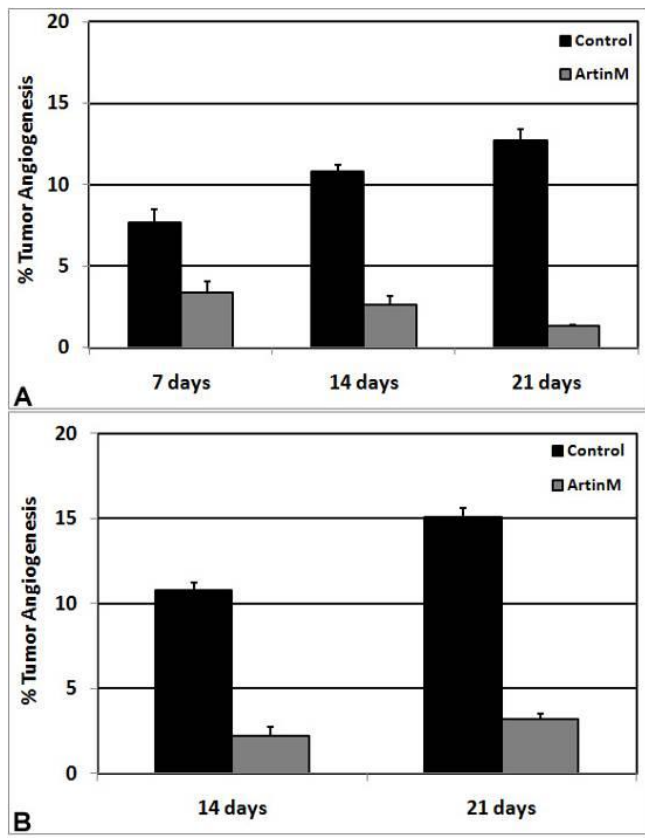


Figure 4 – Quantification of tumor neoangiogenesis by the count of blood vessels.

The count was done in 10 different sections from tumors and there is a gradual increase of new blood vessels in tumors obtained from control animals (treated with PBS) in both Premature (A) and Delayed (B) Protocols. Results are expressed as means \pm SD for 2 independent experiments ($p < 0.05$).

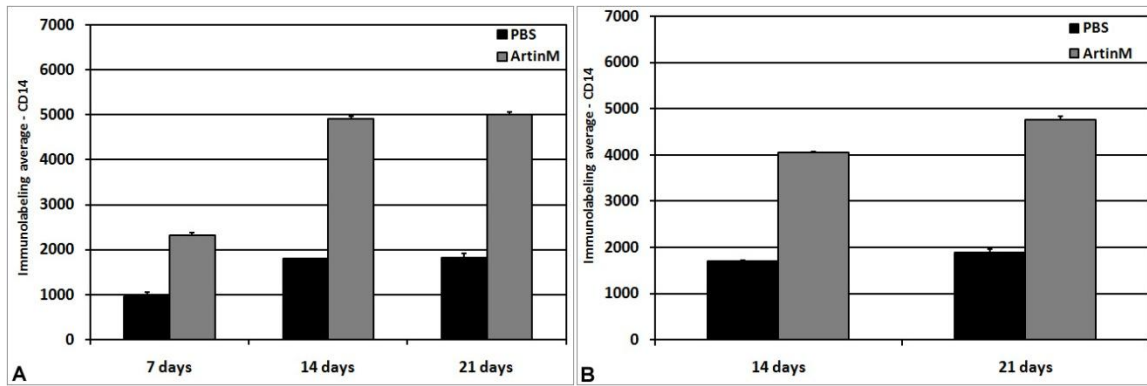


Figure 5 – Animals treated with ArtinM present increase of number of the CD14+ cells into the tumor mass in both Premature (A) and Delayed (b) Protocols. The tissues were observed and the image capture was made with optical microscope (Olympus BX-50) after immunohistochemistry. For morphometric analysis of the positive cells was used the Image-Pro Plus (Media Cybernetics) software ($p < 0.05$).

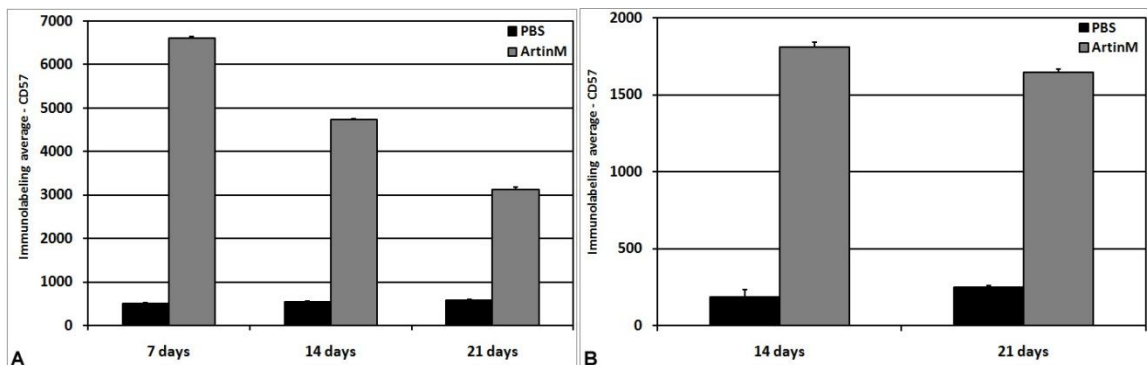


Figure 6 – Animals treated with ArtinM present increase of number of the NK cells (CD57+) into the tumor mass in both Premature (A) and Delayed (b) Protocols. The tissues were observed and the image capture was made with optical microscope (Olympus BX-50) after immunohistochemistry. For morphometric analysis of the positive cells was used the Image-Pro Plus (Media Cybernetics) software ($p < 0.05$).

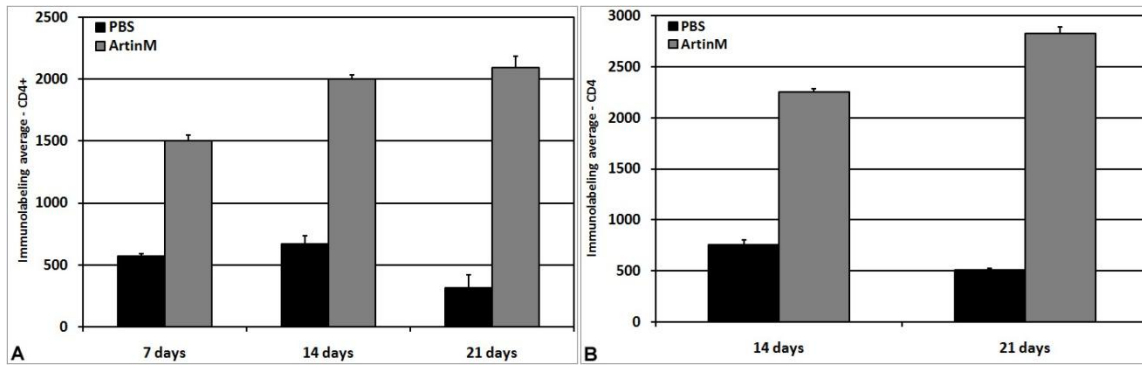


Figure 7 – Animals treated with ArtinM present increase of number of the TCD4+ cells into the tumor mass in both Premature (A) and Delayed (b) Protocols. The tissues were observed and the image capture was made with optical microscope (Olympus BX-50) after immunohistochemistry. For morphometric analysis of the positive cells was used the Image-Pro Plus (Media Cybernetics) software ($p < 0.05$).

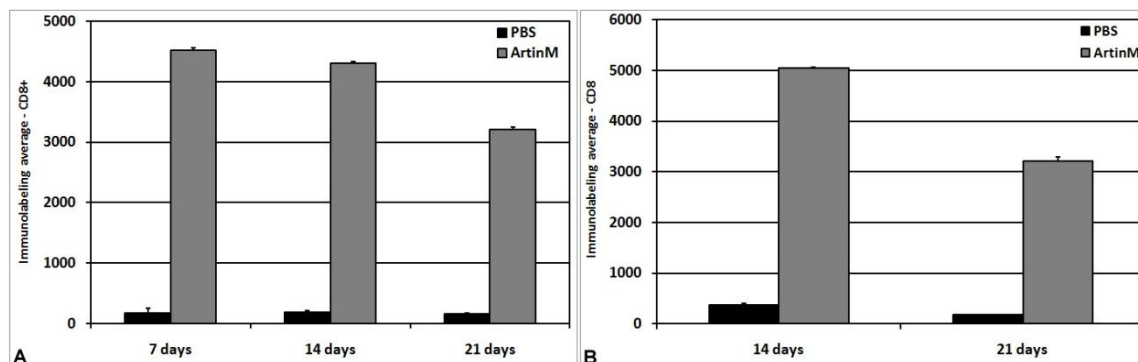


Figure 8 – Animals treated with ArtinM present increase of number of the TCD8+ cells into the tumor mass in both Premature (A) and Delayed (B) Protocols. The tissues were observed and the image capture was made with optical microscope (Olympus BX-50) after immunohistochemistry. For morphometric analysis of the positive cells was used the Image-Pro Plus (Media Cybernetics) software ($p < 0.05$).

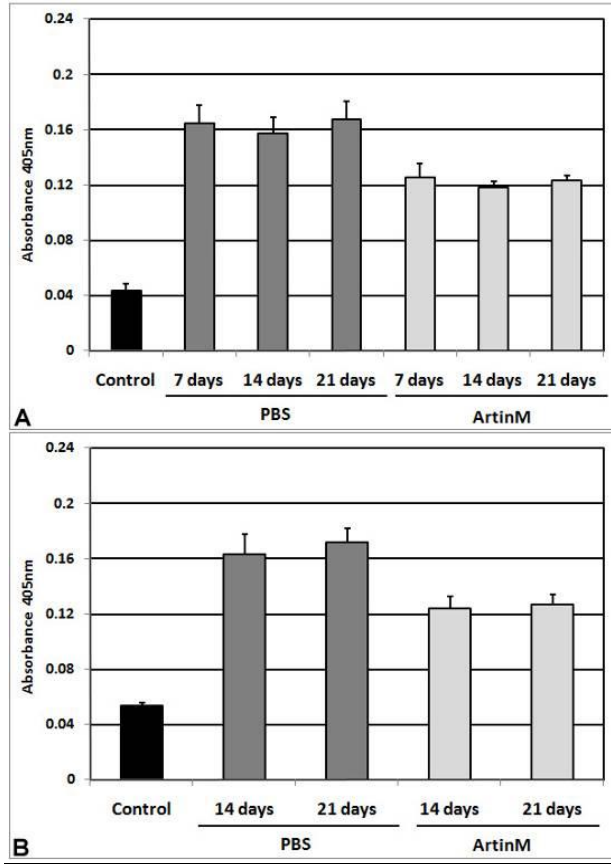


Figure 9 – ArtinM induces an increase in the animal serum TNF- α levels in both Premature (A) and Delayed Protocols (B). Results are expressed as means \pm SD for 2 independent experiments ($p < 0.05$).

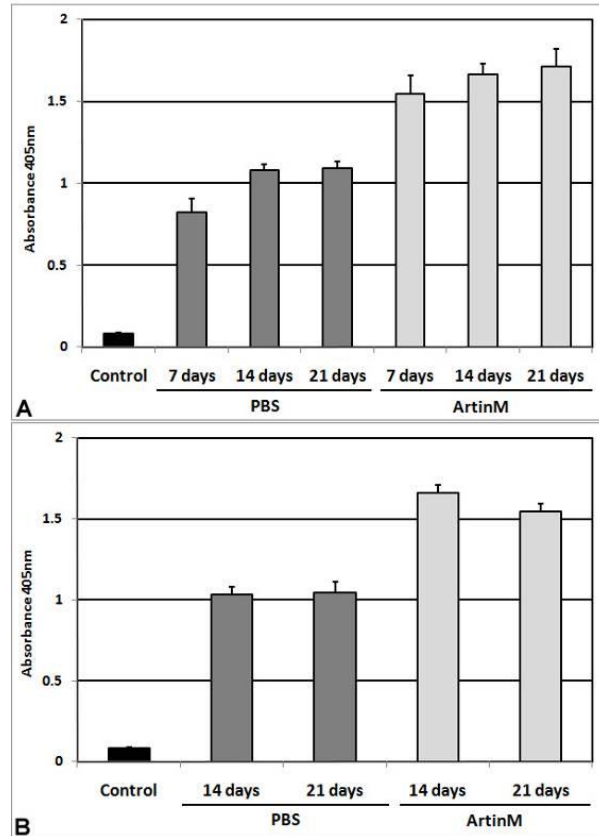


Figure 10 – ArtinM induces an increase in the animal serum IFN- γ levels in both Premature (A) and Delayed Protocols (B). Results are expressed as means \pm SD for 2 independent experiments ($p < 0.05$).

4. CONCLUSÃO

A lectina vegetal ArtinM exerce atividade antitumoral contra células do Carcinoma de Walker-256, tanto com o tratamento precoce quanto com o tratamento tardio, o que foi evidenciado pela diminuição da massa tumoral em animais tratados com a lectina. Esse efeito antitumoral, que foi mais acentuado no tratamento tardio, provavelmente é devido a alguns mecanismos ativados pela lectina como:

1- Indução da necrose no tecido tumoral.

2 - Inibição da neoangiogênese na massa tumoral.

3 - Indução da migração de células inflamatórias como macrófagos, células NK, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ para o interior da massa tumoral.

4 - Indução da liberação das citocinas IFN- γ e TNF- α .

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; POBER, J.S. Mecanismos efetores da imunidade mediada por células. **Imunologia Celular e Molecular**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p. 291-308.

AKAO, A.; EBIHARA, T.; MASUDA, H.; SAEKI, Y.; AKAZAWA, T.; HAZEKI, K.; HAZEKI, O.; MATSUMOTO, M.; SEYA, T. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. **Cancer Sci**, vol.100, no.8:1494–1501, 2009.

ALBUQUERQUE, D.A.; MARTINS, G.A.; CAMPOS-NETO, A.; SILVA, J.S. The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Tripanosoma cruzi*. **Immunol. Letters**, 68: 375-381, 1999.

ALEXANDROFF, A.B.; ROBINS, R.A.; MURRAY, A.; JAMES, K. Tumour immunology: false hopes – new horizons? **Immunol. Today**, 19:247, 1999.

AMBS, S.; HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. **FASEB J.**, Bethesda, v.11, n.6, p.443-448, 1997.

AMBS, S.; MERRIAM, W.G.; OGUNFUSIKA, M.O.; BENNETT, W.P.; ISHIBE, N.; HUSSAIN, S.P.; TZENG, E.E.; GELLER, D.A.; BILLIAR, T.R.; HARRIS, C.C. p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. **Nat. Med.**, 4: 1371–1376, 1998.

ANDRADE, C.A.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.S.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Int. J. Pharm.** V.278, n.2, 435-445, 2004.

ANDREESEN, R., SCHEIBENBOGEN, C., BRUGGER, W., KRAUSE, S., MEERPOHL, H.G., LESER, H.G., ENGLER, H., LOHR, G.W. Adoptive transfer

of tumor cytotoxic macrophages generated in vitro from circulating monocytes: a new approach to cancer immunotherapy. **Cancer Research**, 50:7450–7456, 1990.

AUB, J.C.; SANFORD, B.H.; COTE, M.N. Studies of reactivity of tumours and normal cells to a wheat germen agglutinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.54, p.396-399, 1965.

AUSPRUNK, D. D. H; FOLKMAN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvasc. Res.**, New York NY, v.14, p.53-65, 1977.

BANTEL, H.; ENGELS, I.H.; VOELTER, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; WESSELBORG, S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer Research**, 59: 2083-90, 1999.

BARÉA, A.C. **Efeito Biológico da Lectina Vegetal KM⁺ frente às células do Sarcoma-180**. Curitiba, 2004. Monografia em Biologia – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

BARLOZZARI, T.; LEONHARDT, J.; WILTROUT, R.H.; HERBERMAN, R.B.; REYNOLDS, C.W. Direct evidence for the role of LGL in the reduction of experimental metastasis. **Journal of Immunology**, 134: 2783–2789, 1985.

BARONDES, S.H. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. **Science**, 223(4642):1259-64, 1984.

BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, v.13, p.480-482, 1988.

BEUTH, J.; KO, H. L.; PULVERER, G.; Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the β -galactoside-specific lectin from

mistletoe on tumor colonization in BALB/c mice for two experimental mode systems. **In Vivo**, 5: 29-32, 1991.

BEVAN, M. J; COHN, M. Cytotoxic effects of antigen- and mitogen-induced T cells on various targets. **J. Immunol.** ,Baltimore v.114, p.559-565, 1975.

BEXEVANIS, C.N.; VOUTSAS, I.F.; TSITSILONIS, O.E.; TSIATAS, M.L.; GRITZAPIS, A.D.; PAPAMICHAIL, M. Compromised anti-tumor responses in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. **European Journal of Immunology**, 30:1957–1966, 2000.

BEXEVANIS, C.N.; GRITZAPIS, A.D.; PAPAMICHAEL, M. In Vivo antitumor activity of NKT cells activated by the combination of IL-12 and IL-18. **The Journal of Immunology**, 171: 2953-2959, 2003.

BHUTIA, S.K.; MALLICK, S.K.; MAITI, S.; MAITI, T.K. Antitumor and proapoptotic effect of *Abrus* agglutinin derived peptide in Dalton's lymphoma tumor model. **Chemico-Biological Interactions**, 174: 11–18, 2008.

BIES, C; LEHR, C.M; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v.56, n.4, p.425-435, 2004.

BIRON, C.A.; NGUYEN, K.B.; PIEN, G.C.; COUSENS, L.P.; SALAZAR-MATHER, T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annu. Rev. Immunol.**, 7:189 –220, 1999.

BLASCO, E.; BARRA, A.; NICOLAS, M.; LECRON, J-C; WIJDENES, J.; PREUD'HOME, J-L. Proliferative response of human CD4+ lymphocytes stimulated by the lectin jacalin. **Eur. J. Immunol.**, 25: 2010-2018, 1995.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, v.2, n.10, p.907-916, 2001.

BRESALIER, R.S.; YAN, P.S.; BYRD, J.C.; LOTAN, R.; RAZ, A. Expression of endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potencial of tumors in central nervous system. **Cancer**, New York NY, v.80, n.4, p.776-787, 1997.

BROCKHAUSEN, I. Glycodynamics of mucin biosynthesis in gastrointestinal tumor cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, Ontario, 535: 163-88, 2003.

BROWN, J.C. & HUNT, R.C. Lectins. **Int. Ver. Citol.**, 52: 277-349, 1978.

BRUNDA, M.J.; LUISTRO, L.; WARRIER, R.R.; WRIGHT, R.B.; HUBBARD, R.; MURPHY, M.; WOLF, S.F.; GATELY, M.K. Antitumor and antimetastatic activity of Interleukin-12 against murine tumors. **J. Exp. Med.**, 178:1223-30, 1993.

BUNN-MORENO, M.M; CAMPOS-NETO, A. Lectin (s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **J. Immunol.** Baltimore v.127, n.2, p.427-429, 1981.

BUSSOLINO, F. ALBINI, A.; CAMUSSI, G.; PRESTA, M.; VIGLIETTO, G.; ZICHE, M.; PERSICO, G. Role of soluble mediators in angiogenesis. **Eur. J. Cancer.**, Oxford, v.32A, n.14, p.2401-2412, 1996.

CALIFICE, S. CASTRONOVO, V.; BRACKE, M.; VAN DEN BRULE, F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene.**, London, v.23, n.45, p.7527-7536, 2004.

CASTOLDI, L.; GOLIM, M.A.; RIBEIRO FILHO, O.G.; ROMAGNOLI, G.G.; IBANEZ, O.C.M.; KANENO, R. Enhanced natural killer activity and production of pro-inflammatory cytokines in mice selected for high acute inflammatory response (AIRmax). **Immunology**, 120: 372-79, 2006.

CHAI, J. G.; BANDO, T.; KOBOSHI, S.; OKA, M.; NAGASAWA, H.; NAKAI, S.; MAEDA, K.; HIMENO, K.; SATO, M.; OHKUBO, S. An extract of seeds from *Aeginetia indica* L., a parasitic plant, induces potent antigen-specific antitumor immunity in Meth A-bearing BALB/c mice. **Cancer Immunol. Immunother.**, Berlin, v.35, n.3, p.181-185, 1992.

CHAMBERLAIN, J.S. Cachexia in cancer – zeroing in on myosin. **N. Engl. J. Med.**, 351:2124–2125, 2004.

CHATWAL, S.M.; MOOCHHALA, S.M.; CHAN, S.T.F.; NGOI, S.S. Nitric oxide and cancer. **Med. Hypotheses.**, Harlow, v.46, p.21-24, 1996.

CHEUNG, A.H.; WONG, J.H.; NG, T.B. *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. **Phytomedicine**, 16: 594–600, 2009.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Pathologic Basis of Disease**, 5th edition, 1994.

DAMJANOV, I. Lectin cytochemistry and histochemistry. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 57, n. , p.5-20, 1987.

DELGADO, M. Lectinas de *Artocarpus integrifolia* estimulam padrão diferente de citocinas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, 1993.

DIAS, S.; BOYD, R.; BALKWILL, F. IL-12 regulates VEGF and MMPs in a murine breast cancer model. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 581-586, 1995.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, Baltimore, v.141, p.2407-2414, 1988.

DONG, H.D.; KIMOTO, Y.; TAKAI, S.; TAGUCHI, T. Apoptosis as a mechanism of lectin-dependent monocyte-mediated cytotoxicity. **Immunol. Invest.**, New York NY, v.25, n.1-2, p.65-78, 1996.

DORLAND, L.; VANHALBEEK, H.; VLEIGENTHART, J.F.; LIS, H.; SHARON, N. Primary structure of the carbohydrate chain of soybean agglutinin. A reinvestigation by high resolution ¹H NMR spectroscopy. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.256, n.15, p.7708-7711, 1981

DORNELAS, C.A.; ALMEIDA, P.R.C.; NASCIMENTO, G.L.; LIMA, E.B.; MORAES, M.O. Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma in rats bladder. **Acta Cir. Bras.**, vol.21, no.1, 2006.

DREDGE, K.; MARRIOTT, J.B.; TODRYK, S.M.; DALGLEISH, A.G. Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. **Cancer Immunol. Immunother.**, London, 51: 521-531, 2002.

DUDA, G.D.; SUNAMURA, M.; LOZONSSHI, L.; KODAMA, T.; EGAWA, S.; MATSUMOTO, G.; SHIMAMURA, H.; TAKEDA, K.; MATSUNO, S. Direct *in vitro* and *in vivo* analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. **Cancer Res.** V.60, p.1111-1116, 2000.

EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256 *in vivo* and *in vitro*. **Am. J. Cancer.** 8: 566-612, 1935.

ELSÄSSER-BEILE, U.; RUHNAU, T.; FREUDENBERG, N.; WETTERAUER, U.; MENGES, U. Antitumoral effect of recombinant mistletoe lectin on chemically induced urinary bladder carcinogenesis in a rat model. **American Cancer Society**, 91: 998-1004, 2001.

FIDLER, I.J. Cancer metastasis. **British Medical Bulletin**, 47: 157-177, 1991.

FIK, E.; WOLUN-CHOLEWA, M.; KISTOWSKA, M.; WARCHOL, J. B.; GOZDZICKA-JOZEFIAK, A.; Effect of lectin from *Chelidonium majus* on normal and cancer cell in culture. **Folia Histochem. Cytobiol.**, 39(2): 215-216, 2001.

FOLKMAN, J.; SHING, Y.; Angiogenesis. **J. Bio. Chem.**, 10931-10934, 1992.

FOLKMAN, J.; BROWDER, T.; PALMBLAD, J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v.86, n.1, p.23-33, 2001.

FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. **Cancer Metastasis Rev.**, 17: 77–89, 1998.

GABIUS, H.J. Animal lectins. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.243, p.543-576, 1997.

GABIUS, H.J. Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins. **Anat. Histol. Embriol.**, Berlin, v.30, n.1, p.3-31, 2001.

GANIKO, L.; MARTINS, A.R.; ESPREAFICO, E.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM⁺. **Glycoconj. J.**, London, v.15, n.5, p.527-530, 1998.

GANIKO, L. Interação da lectina KM⁺ com componentes da matriz extracelular na haptotaxia de neutrófilos. **Tese de Doutorado**. Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, São Paulo, 2001.

GANIKO, L.; MARTINS, A. R.; FREYMULLER, E.; MORTARA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Lectin KM⁺-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1721, p.152-63, 2005.

GENNARI R.; RENNE G.; TRAVAINI L.; BASSI F.; ZURRIDA S. Sentinel node biopsy in male breast cancer: future standard treatment? **Eur. J. Surg.**, 167(6): 4612, 2001.

GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, Boston, v.20, n.3-4, p.245-277, 2001.

HAJTO, T.; HOSTANKA, K.; FISHER, J.; SALLER, R. Effects of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of IL-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo. **Natural Immunity**, Basel , v.16, n.34-46, 1998.

HAKOMORI, S. Aberrant glycosilation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. **Adv. Cancer Res.**, 52:257-331, 1989.

HAKOMORI S.; HANDA K. Glycosphingolipid-dependent cross-talk between glycosynapses interfacing tumor cells with their host cells: essential basis to define tumor malignancy (Minireview). **FEBS Letters**. 531, p. 88-92, 2002.

HIBASAMI, H., FUJIKAWA, T., TAKEDA, H., NISHIBE, S., SATOH, T., FUJISAWA, T., NAKASHIMA, K. Induction of apoptosis by *Acanthopanax senticosus* HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATO III cells. **Oncology Reports**, 7: 1213–1216, 2000.

HICKS, A.M.; RIEDLINGER, G.; WILLINGHAM, M.C.; ALEXANDER-MILLER, M.A.; VON-KAP-HERR, C.; PETTENATI, M.J.; SANDERS, A.M.; WEIR, H.M.; DU, W.; KIM, J.; SIMPSON, A.J.; OLD, L.J.; CUI, Z. Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**; 103(20): 7753-8, 2006.

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P.; FOLKMAN, J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v.94, n.12, p.883-893, 2002

HOLTSKOG, R.; SANDVIG, K.; OLSNES, S. Characterization of a toxic lectin in Iscador, a mistletoe preparation with alleged cancerostatic properties. **Oncology**, 34: 061-068, 1988.

HUNG, K.; HAYASHI, R.; LAFOND-WALKER, A.; LOWENSTERIN, C.; PARDOLL, D.; LEVITSKY, H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. **J. Exp. Med.**, New York NY, v.188, n.12, p.2357-2368, 1998.

HYODO, Y.; MATSUI, K.; HAYASHI, N.; TSUTSUI, H.; KASHIWAMURA, S.; YAMAUCHI, H.; HIROISHI, K.; TAKEDA, K.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; KAYAGAKI, N.; KURIMOTO, M.; OKAMURA, H.; HADA, T.; YAGITA, H.; AKIRA, S.; NAKANISHI, K.; HIGASHINO, K. IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. **J. Immunol.**, 1;162(3):1662-8, 1999.

INAI, K.; KOU, F.; NAMBU, S.; TOKUOKA, S. An altered lectin binding to mucus glycoprotein in goblet cells of human tracheobronchial epithelium among former mustard-gas workers **Acta. Pathol. Jpn.**, v.37, n.4, p.537-548, 1987.

ISHIGAMI, S.; NATSUGOE, S.; TOKUDA, K.; *et al.* Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. **Cancer Lett.**, 159(1):103-8, 2000.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**, capítulo 14. Editora Artmed, 5ª edição; 2002.

JOHN, B.; HIBBS, J. R. Infection and Nitric Oxide. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.185, S9-S17, 2002.

KALTNER, H.; STIERSTORFER, B. Animal lectins as cell adhesion molecules. **Acta. Anat.**, v.161, p.162-179, 1998.

KASHIO, Y.; NAKAMURA, K.; ABEDIN, M.J.; SEKI, M.; NISHI, N.; YOSHIDA, N.; NAKAMURA, T.; HIRASHIMA, M. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. **J. Immunol.**, 170:3631–36, 2003.

KAUR, N.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.S.; AGREWALA, J.N.; KAUR, M. Two novel lectins from *Parkia glandulosa* and *Parkia roxburghii*: isolation, physicochemical characterization, mitogenicity and anti-proliferative activity. **Protein Pept. Lett.**, 12(6): 585-95, 2005.

KERBEL, R.S.; DENNIS, J.W.; LARGARDE, A.E.; FROST, P. Tumor progression in metastasis: na experimental approach using lectin resistant tumor variants. **Cancer Metastasis Rev.**, Boston, v.1, n.2, p.99-140, 1982.

KIJNE, J.W.; BAUCHROWITZ, M.A.; DIAZ, C.L. Root lectins and rhizobia. **Plant. Physiol.**, Lancaster , v.115, p.869-873, 1997.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.1572, n.2-3, p.187-197, 2002.

KIM, M.; RAO, M.V.; TWEARDY, M.; PRAKASH, U.; GALILI, U.; GORELIK, E. Lectin- induced apoptosis of tumour cells. **Glycobiology**, Oxford, v.3, p.447-453, 1993.

KITO, T.; KURODA, E.; YOKOTA, A.; YAMASHITA, U. Cytotoxicity in glioma cells due to interleukin-12 and interleukin-18-stimulated macrophages mediated by interferon-gamma-regulated nitric oxide. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v.98, n.2, p.385-392, 2003.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RERSCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v.60, p.619-642, 1998.

KUTTAN, G.; VASUDEVAN, D.M.; KUTTAN, R. Effect of a preparation from *Viscum album* on a tumor development *in vitro* and in mice. **J. Ethnopharmacology**, 18: 24-30, 1990.

KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Immunological mechanism of action of the tumor reducing peptide from mistle extract "NSC 524978# cellular proliferation. **Cancer Letters**, 55: 012-029, 1992.

LAHM, H.; ANDRÉ, S.; HOEFLICH, A.; KALTNER, H.; SORDAT, B.; WOLF, E.; GABIUS, H.J. Tumor galectinology: insights into the complex network as a family of endogenous lectins. **Glycoconj. J.**, London , v.20 , p.227-238, 2004.

LASEK, W.; WANKOWICZ, A.; KUC, K.; FELESZKO, W.; GOLAB, J.; GIEMASZ, A.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W.; JAKOBISIAK, M. Potentiation of antitumor effects of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma by macrophage-colony-stimulating factor in a MmB16 melanoma model in mice. **Cancer Immunol. Immunother.**, 40(5): 315-21, 1995.

LASEK, W.; FELESZKO, W.; GOLAB, J.; STOKLOSA, T.; MARCZAK, M.; DABROWSKA, A.; MALEJCZYK, M.; JAKOBISIAK, M. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in mice. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 45: 100–108, 1997.

LAUWERYS, B.R.; GAROT, N; RENAULD J-C.; HOUSSIAN, F.A. Cytokine production and killer activity of NK/T cells derived with IL-12, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. **J. Immunol.**, 165: 1847, 2000.

LAVASTRE, V.; CHIASSON, S.; CAVALLI, H.; GIRARD, D. *Viscum album* agglutinin-I (VAA) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: laminin B1 is a novel target of VAA-I. **Leukemia Research**, 29: 1443-1453, 2005.

LAVIANO, A.; GLEASON, J.R.; MEGUID, M.M.; et al. Effects of intra-VMN mianserin and IL-1ra on meal number in anorectic tumor-bearing rats. **J. Investig. Med.**, 48:40–48, 2000.

LEE, S.M.; SUEN, Y. J.; KNOPPEL, E.; CAIRO, M.J. The regulation and biological activity of interleukin 12. **Leuk. Lymphoma**, Chur, v.29, n.5-6, p.427-438, 1998.

LEITE DE MORAES, M.C.; HAMEG, A.; ARNOULD, A.; MACHAVOINE, F.; KOEZUKA, Y.; SCHMIDT, E.; HERBELIN, A.; DY, M. A distinct IL18-induced pathway to fully activate NKT lymphocytes independently from TCR engagement. **J. Immunol.**, 163: 5871, 1999.

LEJEUNE, F.J.; RÜEGG, C. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. **Bull Cancer**, 93(8): 90-100, 2006.

LI, S. IL-12-Based therapy of malignancies. **Drugs Today**, Arkansas – USA, 37 (9): 629-637, 2001.

LICHTENSTEIN, P.; HOLM, N.V.; VERKASALO, P.K.; ILIADOU, A.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M.; PUKKALA, E.; SKYTTHE, A.; HEMMINKI, K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. **N. Engl. J. Med.**, 343: 78–85, 2000.

LIOTTA, L.A.; STEEG, P.S.; STETLER-STEVENSON, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, 64: 327-336, 1991.

LIU, B.; ZHANG, B.; MIN, M.; BIAN, H.; CHEN, L.; LIU, Q.; BAO, J. Induction of apoptosis by Polygonatum odoratum lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1790:840–44, 2009.

LÔR, A. **Avaliação dos efeitos da Lectina vegetal KM⁺ sobre o Sarcoma-180: Indução de Necrose e Inibição da Proliferação Celular.** Curitiba, 2004. Monografia em biologia – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

LOTAN, R.; SIEGELMAN, H.W.; LIS, H.; SHARON, N. Subunit structure of soybean agglutinin. **J. Biol. Chem.** Baltimore ,v.249, n.4, p.1219-1224, 1974.

LOTAN, R.; RAZ, A. Endogenous lectins as mediators of tumor cell adhesion. **J. Cell Biochem.**, v. 37, n. 1, p. 107-17, 1988a.

LOTAN, R.; RAZ, A. Lectins in cancer cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 551, p.385-96, 1988b.

MALTONI, M.; NANNI, O.; PIROVANO, M.; et al. Successful validation of the palliative prognostic score in terminally ill cancer patients. **J. Pain Symptom Manage**, 17:240–247, 1999.

MANTOVANI, A.; BOTTAZZI, B.; COLATTA, F.; SOZANNI, S.; RUCO, L. The origin and function of tumor associated macrophages. **Immunol. Today**, 13: 265, 1992.

MARKOVIC, S.N., MURASKO, D.M.. Role of natural killer and T-cells in interferon induced inhibition of spontaneous metastases of the B16F10L murine melanoma. **Cancer Research**, 51, 1124–1128, 1991.

MAZZOLINI, G.; PRIETO, J.; MELERO, I. Gene therapy of câncer with interleukin 12. **Curr. Pharm. Des.**, 9(24): 1981-1991, 2003.

McNIGHT, A. J. Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. **J. Immunol.**, Baltimore, v.152, n.5, p.2172-2179, 1994

MIRANDA-SANTOS, I.K.; MENGEL, J.O.; BUNN-MORENO, M.M.; CAMPOS-NETO, A. Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia*

is mediated by a lectin distinct from jacalin. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v.140, n.2, p.197-203, 1991.

MISQUITH S.; RANI P.G.; SUROLIA A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.48, p.30393-303401, 1994.

MITCHELL, B.S.; SCHUMACHER, U. The use of lectin *Helix pomatia* agglutinin (HPA) as a prognostic indicator and as a tool in cancer research. **Histol. Histopathol.**, Murcia, v.14, n.1, p.217-226, 1999.

MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, New York, v.33, p.1-10, 1995.

MOREIRA, R.A. & AINOZ, I.L. Isolectins from jackfruit (*artocarpus integrifolia*) seeds. **Plant Physiol.**, 61 (suppl. 118): 650, 1978.

MORENO, A.N.; JAMUR, M.C.; OLIVER, C.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, Basel, v.132, n.3, p.221-230, 2003.

MORENO, A. N.; JAMUR, M.C.; OLIVER, C.; ROQUE-BARREIRA, M.C. The macrophage-derived lectin, MNCF, activates neutrophil migration through a pertussis toxin-sensitive pathway. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v.53, n.6, p.715-723, 2005.

MORINI, M.; ALBINI, A.; LORUSSO, G.; *et al.* Prevention of angiogenesis by naked DNA IL-12 gene transfer: angioprevention by immunogene therapy. **Gene Ther.**, 11(3): 284-91, 2004.

MORIOKA, T.; BABA, T.; BLACK, K.L.; STREIT, W.J. Inflammatory cell infiltrates vary in experimental primary and metastatic brain tumors. **Neurosurgery**, 30 (6): 891-6, 1992.

MUELLER, E.A.; ANDERER, F.A. *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon g inducer. **Cancer Immunol. Immunother.**, 21: 110-116,1990a.

MUELLER, E.A.; ANDERER, F.A. Chemical specificity of effector cell/tumor cell bridging by a *Viscum album* rhamnogalacturonan enhancing cytotoxicity of human NK cells. **Immunopharmacology**, 08: 58-66, 1990b.

MYIAGI, T.; TAKEHARA, T.; TATSUMI, T.; SUZUKI, T.; JINUSHI, M.; KANAZAWA, Y.; HIRAMATSU, N.; KANTO, T.; TSUJI, S.; HORI, M.; HAYASHI, N. Concanavalin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver. **Hepatology**, vol.40, No.5: 1190-1196, 2004.

NAGAHARA, K.; ARIKAWA, T.; OOMIZU, S.; KONTANI, K.; NOBUMOTO, A.; TATENO, H.; WATANABE, K.; NIKI, T.; KATOH, S.; MIYAKE, M.; NAGAHATA, S.I.; HIRABAYASHI, J.; KUCHROO, V.K.; YAMAUCHI, A.; HIRASHIMA, M. Galectin-9 Increases Tim-3+ Dendritic Cells and CD8 + T Cells and Enhances Antitumor Immunity via Galectin-9-Tim-3 Interactions. **J. Immunol.**, 181: 7660-69, 2008.

NANGIA-MAKKER, P.; HAGAN, V.; HONJO, Y.; BACCARINI, S.; TAIT, L.; BRESALIER, R.; RAZ, A. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. **J. National Inst.**, 94 (24): 1854-1862, 2002.

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

NATHAN, C.; SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v.97, n.16, p.8841-8848, 2000.

NEGUS, R.P.M.; BALKWILI, F.R. Cytokines in tumor growth, migration and metastasis. **World J. Urol.**, 14:157-165, 1996.

NISHIMURA, T.; IWAKABE, K.; SEKIMOTO, M.; *et al.* Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication *in vivo*. **J. Exp. Med.**, 190:617, 1999.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of in cultures the normal human leukocytes. **Cancer Research**, 20: 462, 1960.

NUMATA, C. Apoptotic cell death induced by physarumin (hemmagglutinin from myxomycete, Physarum polycephalum. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.21, n.3, p.214-218, 1998

OGAWA, M.; YU, W.G.; UMEHARA, K.; IWASAKI, M.; WIJESURIYA, R.; TSUJIMURA, T.; KUBO, T.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T. Multiple roles of interferon-gamma in the mediation of interleukin 12-induced tumor regression. **Cancer Research**, 58: 2426–2432, 1998.

OGAWARA, M. Induction of human monocyte-mediated tumor cell killing by a plant lectin, wheat germ agglutinin. **Jpn. J. Cancer Res.**, Amsterdam, v.76, n.11, p.1107-1114, 1985.

OPARA, E.I.; LAVIANO, A.; MEGUID, M.M.; YANG, Z.J. Correlation between food intake and CSF IL-1 alpha in anorectic tumor bearing rats. **Neuroreport**, 6: 750–752, 1995.

OPDENAKKER, G.; RUDD, P.M.; PONTING, C.P.; DWEK, R.A.. Concepts and principles of glycobiology. **FASEB J.**, Bethesda, v.7, p.1330-7, 1993.

PANIGRAHI, D.; INGER, S.; BUTTERFIELD, C.E.; CHEN, E. J.; KILROY, S.; FLETCHER, C.; DOLKMAN, J.; KAIPAINEN, A. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. **J. Clin. Invest.**, New York, v.110, n.7, p. 923-932, 2002.

PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, J. S. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, Oxford, v.11, n. 12 , p.1035-1042, 2001.

PARANGI, S.; O'REILLY, M.; CHRISTOFORI, G.; HOLMGREN, L. GROSFELD, J. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v.93, n.5, p.2002-2007, 1996.

PARKINS, C.S. ; HOLDER, A.L. ; DENNIS, M.F. ; STRATFORD, M.R ; CHAPLIN, D.J. Involvement of oxygen free radicals in ischaemia-reperfusion injury to murine tumours: role of nitric oxide. **Free Radic Res.**, Yverdon, v.28, n.3, p.271-281, 1998.

PEAKMAN, M.; VERGANI, V. **Imunologia Básica e Clínica**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 326p.

PEREIRA-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; ELS VAN DAMME, J.M. **Immunology Letters Issues**, 119:114-15, 2008.

PERILLO, N.L.; PACE, K.E.; SEILHAMER, J.J.; BAUM, L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, London, v.378, p.736-739, 1995.

PERILLO, N.L.; MARCUS, M.E.; BAUM, L.G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation and cell death. **J. Mol. Med.**, Heidelberg, v.76, p.402-412, 1998.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, Lancaster, V.109, p.347-352, 1995.

PIENTA, K.J.; NAIK, H.; AKHTAR, A.; TAMAZAKI, K.; REPLOGLE, T.S.; LEHR, J.; DONAT, T.L.; TAIT, L.; HOGAN, V.; RAZ, A. Inhibition of spontaneous

metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. **J. National Cancer Inst.**, 87 (5): 331-2, 1995.

RAIG, E.T.; JONES, N.B.; VARKER, K.A.; BENNIGER, K.; GO, M.R.; BIBER, J.L.; LESINSKI, G.B.; CARSON, W.E. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, 28: 553-62, 2008.

RAZ, A.; MEROMSKI, L.; ZUIBEL, L.; LOTAN, R. transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. **Int. J. Cancer**, New York, v.39, n.3, p.353-60, 1987.

REISNER, Y.; ITZICOVITCH, L.; MESHORER, A.; SHARON, N. Hemopoietic stem cell transplantation using mouse bone marrow and spleen cells fractionated by lectins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v.75, n.6, p.2933-2936, 1978.

REISNER, Y.; BINIAMINOV, L.; ROSENTHAL, E.; SHARON, N.; RAMOT, B. Interaction of peanut agglutinin with normal human lymphocytes and with leukemic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v.76, n.1, p.447-451, 1979.

REISNER, Y.; PAHWA, S.; CHIAO, J. W.; SHARON, N.; EVANS, R. L.; GOOD, R. A. Separation of antibody helper and antibody suppressor human T cells by using soybean agglutinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v.77, n.11, p.6778-6782, 1980.

REMMELINK, M.; DARRO, F.; DECAESTECKER, C.; DE DECKER, R.; BOVIN, N.V.; GEBHART, M.; KALTENER, H.; GABIUS, H-J.; KISS, R.; SALMON, I.; GANGUY, A. In vitro influence of lectins and neoglycoconjugates on the growth of three human sarcoma cell lines. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 125: 275-285, 1999.

ROFE, A.M.; BOURGEOIS, C.S.; COYLE, P.; et al. Altered insulin response to glucose in weight-losing cancer patients. **Anticancer Res.**, 14:647–650, 1994.

ROITT, Ivan M. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1995.

ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: na IgA-binding lectin. **J. Immunol.**, Baltimore, v.134, p.1740-1743, 1985.

ROQUE-BARREIRA, M.C.; PRAZ, F; HALBWACHS-MECARELLI, L; GREENE, L.J.; CAMPOS-NETO, A. IgA-affinity and characterization of the lectin jacalin. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.19, p.149-57, 1986.

ROSA, J.C.; DE OLIVEIRA, P.S.; GARRAT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. **Protein Sci.**, New York , v.8, n.1, p.13-24, 1999.

RUDIGER, H.; RUDIGER, H. F.; SIEBERT, H. C.; SIEBERT, H.C.; SOLIS, D.; JIMENEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C. W.; DIAZ-MARINO, T.; GABIUS, H.J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Curr. Med. Chem.**, Schiphol , v.7, n.4, p.389-416, 2000.

RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry functions and applications. **Glycoconj. J.**, London , v.18, p.589-613, 2001.

SAIKI, I. A. Kampo medicine “*Juzen-taiho-to*”-prevention of malignant progression and metastasis of tumor cells and the mechanism of action. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 23: 677–688, 2000.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.O.; BELTRAMINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. A neutrophil migration-inducing

lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J. Immunol.**, Baltimore, v.153, n.4, p.1798-1807, 1994.

SCHANTZ, S.P.; BROWN, B.W.; LIRA, E.; TAYLOR, S.L.; BEDDINGFIELD, N. Evidence for the role of natural immunity in the control of metastatic spread of head and neck cancer. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 25: 141–148, 1987.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, 246(4927): 227-34, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, 268(1):82-9, 1993. Erratum in: **Sci. Am.**, 268(3):12, 1993.

SHARON, N. Lectins: from obscurity to limelight. **Protein Sci.**, New York, v.7, p.2042-2048, 1998.

SHARON, N.; LIS, H. How proteins bound carbohydrates: lessons from legume lectins. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.50, p.6586-6591, 2002.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, Oxford, v.14, n.11, p.53R-62R, 2004.

SMYTH, M.J.; HAYAKAWA, Y.; TAKEDA, K.; YAGITA, H. New aspects of natural killer- cell surveillance and therapy of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, 2: 850–861, 2002.

SOLOSKI, M.J. Recognition of tumor cells by the innate immune system. **Curr. Opin. Immunol.**, 13: 154, 2001.

SONTI, G.; ILYIN, S.E.; PLATA-SALAMAN, C.R. Anorexia induced by cytokine interactions at pathophysiological concentrations. **AM. J. Physiol.**, 270: R1394–R1402, 1996.

SOUZA, M.A. Lectina KM⁺ de *Artocarpus integrifolia* induz produção de interleucina-12 e proteção contra a infecção por *Leishmania major*. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, São Paulo, 1998.

STILLMARK, H. "*Über Rizin, ein giftiges Ferment aus dem Sumen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen*". **Inaug. Diss.**, Dorpat., 1888.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLOW, T.G. **Imunologia Médica**, 9th edition. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 689p.

STOCKER, R. J.; MORELL, A.G.; SCHEINBERG, I.H. Mammalian hepatic lectin. **Science**, Washington, v.186, n., p.365-366, 1974.

TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; RAZ, A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconj. J.**, London, v.19, n.7-9, p. 543-9, 2004.

TAMIR, S., AND TANNENBAUM, S. R. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. **Biochim. Biophys. Acta**, 1288: F31–F36, 1996.

TANIGAWA, K.; CRAIG, R.A.; STOOLMAN, L.M.; CHANG, A.E. Effects of tumor necrosis factor-alpha on the in vitro maturation of tumor-reactive effector T cells. **Journal of Immunotherapy**, 23: 528–535, 2000.

THOMAS, K. A. Vascular endothelia growth factor, a potent and selective angiogenic agent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.271, p.603-606, 1996.

TIMOSHENKO, A.V.; CHERENKEVICH, S.N.; GABIUS, H.J. Viscum album agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. **Biomed. Pharmacother.**, 49(3): 153-8, 1995.

TIMOSHENKO, A.V.; LAN, Y.; GABIUS, H. J.; LALA, P.K. Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin or their combination. effects on tumour growth, capillary leakage and nitric oxide (NO) production. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v.37, n.15, p.1910-1920, 2001.

- TISDALE, M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, 17(5): 438-42, 2001.
- TISDALE, M.J. Cachexia in cancer patients. **Nat. Rev. Cancer**, 2: 862–871, 2002.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunomodulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. **Blood**, v.84, p.4008-4016, 1994.
- TSUNG, K.; MEKO, J.B.; PEPLINSKI, G.R.; TSUNG, Y.L.; NORTON, J.A. IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. **J. Immunol.**, Baltimore , v.158, n.7, p.3359-3365, 1997.
- UEDA, S.; KUWABARA, I.; LIU, F. T. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. **Cancer Res.**, Baltimore , v.64, n.16, p.5672-5676, 2004.
- VAN DAME, E.J.M.; PEWMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, n. 6. P. 575-692, 1998.
- VAN HUYEN, J-P.D.; DELIGNAT, S.; BAYRY, J.; KAZATCHKINE, M.D.; BRUNEVAL, P.; NICOLETTI, A.; KAVERI, S.V. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. **Cancer Letters**, 243:32-37, 2006.
- WALDMANN, T.A.; DUBOIS, S.; TAGAYA, Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. **Immunity**, 14:105–110, 2001.
- WANG, H.; NG, T. B.; OOI, V. E.; LIU, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, Exeter, v.32, n.3, p.365-372, 2000.

WANG, M.; XIE, Z.; SHI, M.; LU, H.; YU, M.; HU, M.; LU, F.; MA, Y.; SHEN, B.; GUO, N. A new strategy to induce effective antitumour response *in vitro* and *in vivo*. **Scand. J. Immunol.**, 68: 287-96, 2008.

WATANABE, N.; NIITSU, Y.; YAMAUCHI, N.; UMENO, H.; SONE, H.; NEDA, H.; URUSHIZAKI, I. Antitumor synergism between recombinant human tumor necrosis factor and recombinant human interferon- γ . **J. Biol. Response Mod.**, 7: 24-31, 1988.

WATANABE, N.; YAMAUCHI, N.; MAEDA, M.; NEDA, H.; TSUJI, Y.; OKAMOTO, T.; TSUJI, N.; AKIYAMA, S.; SASAKI, H.; NIITSU, Y. Recombinant human tumor necrosis factor causes regression in patients with advanced malignancies. **Oncology**, 51: 360-5, 1994.

WATERSTON, A.; BOWER, M. TNF and cancer: good or bad? **Cancer Therapy**, 2: 131-48, 2004.

WELLS, V.; MALLUCCI, L. Identification of an autocrine negative growth factor: mouse beta-galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator. **Cell**, 64(1): 91-7, 1991.

WIGGINTON, J.M.; KUHNS, D.B.; BACK, T.C.; BRUNDA, M.J.; WILTROUT, R.H.; COX, G.W. Interleukin 12 primes macrophages for nitric oxide production *in vivo* and restores depressed nitric oxide production by macrophages from tumor-bearing mice: implications for the antitumor activity of interleukin 12 and/or interleukin 2. **Cancer Res.**, v.56, n.5, p.1131-1136, 1996.

WILLIAMS, J.G.; JURKOVICH, G.J.; MAIER, R.V. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. **J. Surg. Res.**, 54(1): 79-93, 1993.

WIMER, B.M. Therapeutic immunostimulating effects of plant mitogens exemplified by the L4 isolectin of PHA. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v.12, n.3, p.195-212, 1997a.

YAO, L.; SGADAR, C.; FURAKE, K. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by Interleukin-12. **Blood**, v.93, p.1612-21, 1999.

YIM, C.Y.; MCGREGOR, J.R.; KWON, O.D.; BASTIAN, N.R.; REES, M.; MORI, M.; HIBS, J.B. JR.; SAMLOWSKI, W.E. Nitric oxide synthesis contributes to IL-2-induced antitumor responses against intraperitoneal Meth A tumor. **J. Immunol.**, Baltimore, v.155, n.9, p.4382-4390, 1995.

YOON, T.J., YOO, Y.C., KANG, T.B., BAEK, Y.J., HUH, C.S., SONG, S.K., LEE, K.H., AZUMA, I., KIM, J.B. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. **International Journal of Immunopharmacology**, 20: 163–172, 1998.

XIE, K.; FIDLER, I. J. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. **Cancer Metastasis Rev.**, 17: 55–75, 1998.

XIE, K.; HUANG, S. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.34, p.969-986, 2003b.

ZEEV PANCER, MAX D. COOPER. The evolution of adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, 24:497-518, 2006.

ZIVKOVIC, M.; POLJAK-BLAZI, M.; EGGER, G.; SUNJIC, R.J.; ZARKOVIC, N. Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils. **Biofactors**, 24 (1-4): 305-12, 2005.

ZONSTANTINOV, K.M.; RUBBINS, B.A.; LIU, F.T. Galectin-3, a β -galactoside binding animal lectin, is a marker of anaplastic large cell lymphoma. **Am. J. Pathol.**, New York, v.148, p.25-30, 1996.