

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Álvaro José Celmer

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR
PARA TRIAGEM *IN VITRO* DE COMPOSTOS
COM POTENCIAL ATIVIDADE
IMUNOMODULATÓRIA EM MACRÓFAGOS**

Florianópolis

2010

Álvaro José Celmer

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA TRIAGEM
IN VITRO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE
IMUNOMODULATÓRIA EM MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Saúde

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

Florianópolis

2010

CELMER, Álvaro José

Padronização da técnica de RT-PCR para triagem *in vitro* de compostos com potencial atividade imunomodulatória em macrófagos./ Álvaro José Celmer. Florianópolis, 2010. 83 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

1- Macrófagos. 2- RT-PCR. 3- Ensaio de Dosagem de Óxido Nítrico. 4- Galatos. 5- Polissacarídeos *Agaricus blazei*. 6- Atividade imunomodulatória.

Álvaro José Celmer

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA TRIAGEM
IN VITRO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE
IMUNOMODULATÓRIA EM MACRÓFAGOS**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Saúde, e aprovado em sua forma final pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti - Orientador
MIP/CCB/UFSC

Prof. Dr. Jamil Assreuy
FMC/CCB/UFSC

Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
CIF/CCS/UFSC

Profa. Dra. Elaine G. Rodrigues
DMIP/UNIFESP

À minha mãe Erni e ao meu irmão
Alisson, pelo amor, apoio e incentivo
incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pelas forças necessárias para realizar mais esta etapa em minha vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela infra-estrutura e oportunidade.

Ao prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti, pela oportunidade de realizar este trabalho, confiança, paciência, incentivo nas horas difíceis e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Aguinaldo Roberto Pinto, pela boa convivência ao longo do tempo e pelas sugestões oferecidas.

Ao Laboratório de Protozoologia e ao Laboratório de Virologia Aplicada, pelo uso de equipamentos.

Ao professores Dr. Mário Steindel, Dr. Juliano Bordignon, Dra. Elaine G. Rodrigues e Dr. Hernán Terenzi pelas linhagens celulares cedidas.

À profª. Dra. Margarida de Matos Mendonça e à sua doutoranda Carla Maísa Camelini pelas amostras cedidas dos polissacarídeos de *Agaricus blazei*. Ao doutorando Paulo César Leal e seu orientador prof. Dr. Ricardo José Nunes, e a profª. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, pelas amostras cedidas de galatos.

Ao prof. Dr. Jamil Assreuy pelos conselhos e reagentes para a realização do ensaio de óxido nítrico.

À minha mãe Erni, meu pai José F. Celmer (*in memoriam*), meu irmão Alisson, minha cunhada Aline e a toda a minha família pelo amor, carinho e constante apoio em todos os momentos, e porque não mediram esforços para sempre me proporcionar o melhor possível.

A todos os professores que tive ao longo de minha vida, por ter despertado o desejo de conhecimento.

Aos bons amigos e colegas de laboratório Artur Batisti Neto, Camila Zanluca, Caroline H. Seibert, Douglas Bardini Silveira, Elis Amaral Rosa, Fernando Mafalda, Gisele Pasetti, Jaqueline Flores, João Vicente Alfaya dos Santos, Jonatan Ersching, Larissa Haut, Luan Aires, Mariana Borsa, Patrícia Bräunig, Ricardo de Carli da Silva, Sílvia Lanza, Tiago Gräf e Yuri Tonello pelo ótimo convívio, pela amizade, apoio e pelos bons momentos de lazer e descontração vivenciados.

Aos colegas de moradia, Ênio José Bassi, Jefferson Rotta e Cícero Feldhaus pelo companheirismo, amizade e bons momentos compartilhados.

Sou muito grato a todos os meus amigos, difíceis de citar todos nominalmente, mas que são peças fundamentais na minha vida.

Aos médicos, profissionais de saúde e colaboradores da Fundação Pró-Rim de Joinville-SC, APAR Vida de São José-SC, Hospital São José de Joinville-SC e Hospital Astrogildo de Azevedo de Santa Maria-RS pelo auxílio, atenção, dedicação e carinho ofertados.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para minha vida, o meu agradecimento sincero.

“Enquanto navega pela vida
Não evite tempestades e águas bravias.
Apenas deixe-as passar,
Apenas navegue.
Sempre se lembre:
Mares calmos não fazem bons marinheiros.”

Autor desconhecido

RESUMO

Neste estudo foi padronizada a reação de RT-PCR para a detecção da expressão do mRNA dos marcadores TNF- α , IL-10 e iNOS, importantes no contexto de ativação de macrófagos, para seleção *in vitro* de substâncias naturais ou sintéticas com potencial atividade imunomodulatória sobre macrófagos, visto que estes constituem uma das principais populações de células do sistema imune. Para isso foi selecionada a linhagem murina RAW 264.7, cultivada *in vitro* e que responde a estímulos como o LPS. Para a realização da RT-PCR, o RNA foi extraído das células utilizando o reagente Trizol e posteriormente feito reação de transcrição reversa com 1 μ g de RNA total, em condições padronizadas. Na etapa de amplificação do cDNA, foram testadas a melhor temperatura de anelamento para cada marcador, concentração dos iniciadores específicos e diluição do cDNA. Determinou-se que o melhor tempo necessário para visualizar os produtos de amplificação era de 6 horas para os ensaios de ativação e foram estabelecidas as concentrações de LPS capazes de estimular as células em cultura, quando avaliadas pela RT-PCR e dosagem de óxido nítrico. Verificou-se que a adição prévia de polimixina B (50 μ g/ml) nas amostras é eficiente na inativação de endotoxinas contaminantes. Estabeleceu-se um protocolo para testar a potencial atividade antiinflamatória de compostos químicos, pela adição da substância a ser testada 6 horas após a ativação prévia com LPS, incubação por 18 horas e observação da inibição da expressão dos marcadores. Determinou-se em seguida, a atividade de 15 formulações de polissacarídeos de *Agaricus blazei*, sendo que todos os extratos mostraram atividade, pela RT-PCR, para a concentração de 10 μ g/ml para a citocina TNF- α e nas frações 2, 3, 11 e 12 para a enzima iNOS; enquanto que a dosagem de óxido nítrico realizada em paralelo mostrou-se menos sensível. Também avaliou-se a atividade de 9 galatos sintéticos, e concluiu-se que nenhuma das amostras testadas demonstrava atividade ativadora de macrófagos. Ficou evidenciado neste estudo, portanto, a utilidade de uma técnica *in vitro* para a triagem de substâncias com potencial atividade imunomodulatória sobre macrófagos, que permite vislumbrar a análise de grande número destas substâncias, sem a utilização de animais de laboratório.

Palavras-chave: RT-PCR, macrófagos, galatos, polissacarídeos, *Agaricus blazei*, dosagem de óxido nítrico, atividade imunomodulatória.

ABSTRACT

STANDARDIZATION OF RT-PCR FOR *IN VITRO* SCREENING OF COMPOUNDS WITH POTENTIAL IMMUNOMODULATORY ACTIVITY IN MACROPHAGES

In this study an RT-PCR to detect mRNA expression of the markers TNF- α , IL-10 and iNOS, relevant in the macrophage activation context, was standardized in order to *in vitro* screening of natural or synthetic compounds with potential immunomodulatory activity in macrophages, whereas they constitute a major population of immune systems cells. For this, was selected the murine strain RAW 264.7 cultured *in vitro*, and that responds to stimuli such as LPS. To perform RT-PCR, RNA was extracted from cells using Trizol reagent and subsequently made a reverse transcription reaction with 1 μ g of total RNA under standard conditions. In amplification of cDNA step, were tested the best annealing temperature for each marker, the concentration of specific primers and dilution of cDNA. It was determined that the best time to view the amplification products was 6 hours for the testing of activation, and states the concentrations of LPS the cells were responsive to our model of RT-PCR and measurement of nitric oxide. It was found that the previous addition of polymyxin B (50 μ g / ml) in samples is efficient in the inactivation of endotoxin contaminants. Was established a protocol to test the potential anti-inflammatory activity of chemical compounds, by adding the substance to be tested after 6 hours prior to activation with LPS, incubated for 18 hours and observing the inhibition of expression of markers. Was determined activity of 15 polysaccharides of *Agaricus blazei* where all the extracts showed activity in the RT-PCR for the concentration of 10 μ g / ml for TNF- α cytokine and for the fractions 2, 3, 11 and 12 for the iNOS enzyme; but not in the dosage of nitric oxide. We also determined the activity of 9 gallates synthetic, and concluded that none of gallates tested showed activity in activating macrophages. Was evidenced in this study, therefore, the usefulness of an *in vitro* technique for screening of substances with potential immunomodulatory activity on macrophages, which paves the analysis of many of these substances without the use of laboratory animals.

Keywords: RT-PCR, macrophages, gallates, polysaccharide, *Agaricus blazei*, nitric oxide assay, immunomodulation activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Alguns dos receptores de macrófagos envolvidos no reconhecimento imunológico.....	08
Figura 1. Espectro de ativação dos macrófagos.....	10
Figura 2. Estrutura dos Galatos testados.....	21
Quadro 2. Amostras de <i>Agaricus blazei</i> testados neste trabalho.....	22
Quadro 3. Condições padronizadas da Reação de Transcrição Reversa.....	27
Quadro 4. Condições padronizadas da Reação da Cadeia de Polimerase.....	29
Tabela 1. Resultados dos ensaios de avaliação de citotoxicidade pelo método do MTT, com estimativa da CC ₅₀	38
Figura 3. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores TNF- α , IL-10, IL-12 e iNOS com diferentes iniciadores de transcrição.....	42
Figura 4. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores TNF- α , IL-10, IL-12 e iNOS de RT-PCR com transcrição de 10 ng de RNA total.....	44
Figura 5. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores TNF- α , IL-10, IL-12 e iNOS de RT-PCR com transcrição de 100 ng de RNA total.....	44
Figura 6. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α em diferentes temperaturas de anelamento.....	45
Figura 7. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-10 em diferentes temperaturas de anelamento.....	46

Figura 8.	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS em diferentes temperaturas de anelamento.....	46
Figura 9.	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α em diferentes concentrações de iniciadores específicos.....	47
Figura 10.	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-10 em diferentes concentrações de iniciadores específicos.....	47
Figura 11.	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS em diferentes concentrações de iniciadores específicos.....	48
Figura 12.	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α em diferentes concentrações de cDNA....	49
Figura 13.	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS em diferentes concentrações de cDNA.....	50
Figura 14.	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador β -Actina em diferentes concentrações de cDNA.....	50
Figura 15.	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores TNF- α e IL-10, demonstrando o teste de cinética de ativação com 1 μ g/ml de LPS.....	53
Figura 16.	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores IL-12 e iNOS, demonstrando o teste de cinética de ativação com 1 μ g/ml de LPS.....	53

- Figura 17. Dosagem de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 incubados em diferentes tempos com LPS 1 µg/ml.....54
- Figura 18. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação da sensibilidade da linhagem RAW 264.7 por LPS em diluição seriada na razão 1:2..... 55
- Figura 19. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS, em avaliação da sensibilidade da linhagem RAW 264.7 por LPS em diluição seriada na razão 1:2.....56
- Figura 20. Dosagem de nitrito do sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 ativados com diferentes concentrações de LPS em diluição seriada no fator 1:2.....56
- Figura 21. Representação gráfica dos esquemas de tratamento com Dexametasona (10^{-7} M).....58
- Figura 22. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação do tratamento com Dexametasona (DEX) 10^{-7} M em diferentes tempos.....58
- Figura 23. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS, em avaliação do tratamento com Dexametasona (DEX) 10^{-7} M em diferentes tempos.....59
- Figura 24. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador β -Actina, em avaliação do tratamento com Dexametasona (DEX) 10^{-7} M em diferentes tempos.....59
- Figura 25. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação do tratamento com Polimixina B (POL B) 50 µg/ml ao LPS em diluição seriada.....60
- Figura 26. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação

do marcador iNOS, em avaliação do tratamento com Polimixina B (POL B) 50 µg/ml ao LPS em diluição seriada..... 61

Figura 27. Dosagem de nitrito de macrófagos RAW 264.7 incubados por 48 horas com diferentes concentrações de LPS, em diluição seriada na razão 1:2; e as mesmas concentrações de LPS na presença de polimixina B (50 µg/ml).....62

Figura 28. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação da atividade de Polissacarídeos de *Agaricus blazei*, 10 µg/ml, estimulados por 6 horas.....64

Figura 29. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS, em avaliação da atividade de Polissacarídeos de *Agaricus blazei*, 10 µg/ml, estimulados por 6 horas.....65

Figura 30. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação da atividade de galatos sintéticos.....66

Figura 31. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS, em avaliação da atividade de galatos sintéticos.....67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O sistema imunológico e a resposta imune	3
2.1.1 Os macrófagos	4
2.1.2 Macrófagos ativados	9
2.2 Pesquisa da potencial atividade imunomodulatória de substâncias obtidas de produtos naturais	12
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Cultura celular	18
4.1.1 Linhagens celulares	18
4.1.2 Condições de cultura celular	18
4.2 Compostos testados	19
4.2.1 Galatos	19
4.2.2 Polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> Murril	20
4.3 Determinação de citotoxicidade pelo ensaio colorimétrico do sal Azul de tetrazólio (MTT)	21
4.3.1 Citotoxicidade dos galatos	21
4.3.2 Estatística dos dados de citotoxicidade	22
4.4 Dosagem de óxido nítrico produzido por macrófagos	22
4.5 Padronização da técnica de RT-PCR	23
4.5.1 Extração de RNA total	23
4.5.2 Seleção, desenho e seqüência dos pares de iniciadores específicos utilizados na RT-PCR	24
4.5.3 Reação de transcrição reversa (RT)	25
4.5.3.1 Seleção dos iniciadores para reação de transcrição reversa	26
4.5.3.2 Seleção da quantidade de RNA a ser transcrita	27
4.5.4 Reação da Cadeia de Polimerase (PCR)	27
4.5.4.1 Determinação da temperatura de anelamento ideal	28
4.5.4.2 Padronização das concentrações dos iniciadores específicos	29
4.5.4.3 Padronização diluição adequada de cDNA	29
4.5.5 Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose 1%	29

4.6 Otimização das condições de ativação de macrófagos	30
4.6.1 Seleção de linhagem celular mais adequada	30
4.6.2 Cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Condições de cultura celular	34
5.2 Determinação da citotoxicidade pelo ensaio colorimétrico do MTT	36
5.3 Padronização de RT-PCR “Two-step”	38
5.3.1 Seleção, desenho e sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR	40
5.3.2 Reação de transcrição reversa	41
5.3.3.1 Determinação da temperatura ideal de anelamento	44
5.3.3.2 Padronização das concentrações dos iniciadores específicos	45
5.3.3.3 Padronização da melhor diluição de cDNA	47
5.4 Otimização das condições de ativação de macrófagos	50
5.4.1 Seleção da linhagem celular mais adequada	50
5.4.2 Cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7	51
5.4.3 Análise Concentração-Resposta de macrófagos ativados por LPS	53
5.4.4 Inibição da ativação da linhagem RAW 264.7 por Dexametasona	56
5.4.5 Inibição do LPS por Polimixina B	58
5.5 Determinação da atividade das frações de polissacarídeos de <i>Agaricus Blazei</i>	61
5.6 Determinação da atividade de galatos sintéticos em macrófagos	65
6 CONCLUSÕES	67
7 PERSPECTIVAS	69
REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que em pelo menos 80 doenças humanas, a causa inicial seja a resposta imune não adequada. A busca de novos fármacos que possam interferir nas diversas disfunções do sistema imune tem avançado enormemente nas últimas décadas. As atuais abordagens terapêuticas, no entanto, não são totalmente satisfatórias, sendo necessária a busca por novos fármacos com menos efeitos colaterais e menor custo.

A modulação do sistema imunológico pode ser realizada através de muitos agentes sintéticos e de origem natural que possuem atividade estimulatória, supressora e regulatória.

O sistema imune adaptativo, por sua grande diversidade de especificidades, virtualmente pode responder a grande diversidade de estruturas moleculares diversas. Componentes do sistema imune inato, ao contrário, são menos diversos e parecem reconhecer um universo de estruturas muito menor, embora estas sejam características de classes específicas de potenciais patógenos. Este conceito é bem ilustrado pelos receptores do tipo *Toll-Like* (TRLs), que participam do reconhecimento de vários componentes comuns de microorganismos em geral.

Como células centrais do sistema imune inato, os macrófagos são células filogeneticamente conservadas em todos os organismos multicelulares e junto com os neutrófilos, representam a primeira linha de defesa do hospedeiro depois da barreira epitelial. Os macrófagos também atuam como apresentadores de antígenos e podem interagir com linfócitos T na modulação do sistema imune adaptativo. Além disso, os macrófagos estão envolvidos no remodelamento tecidual durante a embriogênese, reparação tecidual, *clearance* de células apoptóticas, hematopoiese e funções regulatórias. A descoberta de moléculas com atividade imunomoduladora sobre macrófagos abre a possibilidade de intervenções terapêuticas em uma grande gama de alterações patológicas, como por exemplo, em doenças inflamatórias crônicas, doenças autoimunes, neoplasias e imunodeficiências, bem como na utilização destes agentes como adjuvantes de vacinas.

O aproveitamento racional da grande biodiversidade brasileira visando à produção de medicamentos com atividade imunomodulatória

é um caminho viável a ser seguido; porém a escassez de técnicas, tecnologia e iniciativa por parte de grupos de pesquisa tem representado um entrave neste processo. Assim, no presente estudo, procurou-se desenvolver e implementar no Laboratório de Imunologia Aplicada da UFSC uma metodologia para triagem de compostos com potencial atividade imunomodulatória, que permita a determinação da atividade estimuladora e supressora de macrófagos de grande número de amostras, sem utilização de animais de experimentação.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O sistema imunológico e a resposta imune

Imunologia vem da palavra em latim “*immunitas*” ou “*immunis*”, que significa “isento de carga”, ou também “isento de enfermidade” (ABBAS; JANEWAY, 2000). Então, indivíduos que não sucumbem a uma determinada enfermidade são dita imunes, e o *status* de resistência é considerada imunidade. Desde a descoberta da fagocitose e principalmente durante todo o século XX, a Imunologia ficou notadamente baseada em funções efetoras contra patógenos, com o foco somente sobre as defesas do organismo contra infecções e ignorando suas propriedades homeostáticas vitais, que são independentes do seu envolvimento com respostas imunes (MOSSER; EDWARDS, 2008). Na visão clássica, portanto, o sistema imune consiste de uma coleção heterogênea de células que são primorosamente projetadas para funcionar como meio de proteção contra a colonização de agentes infecciosos (MORRISSEY; DEREK; CAROLYN, 1997).

O sistema imune pode ser dividido em dois ramos: inato e adaptativo. Embora os limites não sejam bem definidos e haja muita interação entre eles, esta divisão pode ser determinada por fatores como o tempo de resposta (memória) e especificidade da reação (PARKIN; COHEN, 2001).

O sistema imune inato provê uma resposta imediata que permanece constante ao longo da vida do indivíduo, enquanto que o sistema imune adaptativo consiste em reconhecimento antígeno-específico através dos linfócitos T e B, sendo necessários alguns dias para este tipo de resposta poder ser detectado; porém é uma resposta precisa e possui memória, que frente a uma exposição subsequente ao mesmo agente agressor leva a uma resposta mais vigorosa e mais rápida (PARKIN; COHEN, 2001).

O sistema imune inato consiste de mecanismos de defesa filogeneticamente mais antigos, desenvolvidos em organismos multicelulares, acionados pelo reconhecimento de padrões moleculares característicos de diferentes grupos de patógenos. A imunidade adaptativa (adquirida), por sua vez, utiliza moléculas de receptores expressos em linfócitos T e B que são gerados por rearranjos somáticos, criando através disso um repertório diverso de receptores com especificidades aleatórias, e propiciando que a resposta adaptativa se desenvolva através da seleção clonal de linfócitos. Para providenciar uma resposta precoce contra a infecção, o sistema imune inato lança sinais cruciais ao ramo adaptativo do sistema imune detalhando a natureza dos antígenos e o tipo apropriado de resposta a ser induzida (em geral, mecanismos efetores Th1 ou Th2) (MORRISSEY; DEREK; CAROLYN, 1997).

1.1.1 Os macrófagos

Caso um microorganismo atravesse a barreira epitelial e comece a se replicar nos tecidos do hospedeiro, pode ser imediatamente reconhecido pelos fagócitos mononucleares, ou macrófagos, que residem nos tecidos. Estas células amadurecem continuamente a partir dos monócitos circulantes e abandonam a circulação para migrar aos tecidos em todo o corpo, presumivelmente sobre influência de quimiocinas e outros fatores tecido-específicos (KENNEDY; ABKOWITZ, 1997). Nos tecidos migram para o parênquima, o qual influencia a função efetora deste macrófago. Assim, macrófagos residentes em diferentes tecidos mostram diferentes padrões de função, como os macrófagos do baço, do fígado (células de Küpffer), pulmão (macrófagos alveolares), sistema nervoso central (microglia), ossos (osteoclastos) e na pele (células de Langerhans); conjuntamente estas células formam o sistema fagocitário mononuclear (STOUT; SUTTLES, 2004). A ingestão de partículas estranhas e seu processamento levam à ativação do sistema imune adaptativo através da apresentação de antígenos aos linfócitos, da secreção de substâncias (como citocinas e quimiocinas) capazes de regular o sistema imunitário e de induzir a elaboração de substâncias capazes de destruir outras células e

organismos, como os anticorpos produzidos pelos linfócitos B (GORDON, 2003).

Os macrófagos foram descritos há mais de 100 anos, mas somente nas últimas décadas é que ganharam uma maior relevância, pois até então, eram vistos como células com propriedades destrutivas, desprezando-se seu potencial em reparo de tecidos e manutenção da integridade tecidual (WILSON; WALBAUM; REES, 2004). O macrófago está envolvido em muitos processos diferentes como o remodelamento de tecidos durante a embriogênese, reparo de lesões, remoção células lesadas, senescentes ou apoptóticas, subseqüentes a uma agressão ou infecção, hemopoiese e homeostase, bem como o reconhecimento de células neoplásicas (MURPHY; BITTAR; NEVILLE, 1996). Outras funções dos macrófagos são prover uma linha de defesa contra invasão microbiana e crescimento tumoral. Podem efetuar isto de maneira direta, envolvendo a liberação de produtos como radicais de oxigênio e fatores de necrose tumoral, que são lesivos a microorganismos e células cancerígenas, ou indiretamente, pela secreção de citocinas, e processamento e apresentação de antígenos, regulando o sistema imune (KLIMP et al., 2002). Sendo assim, os macrófagos se incluem entre as principais células apresentadoras de antígenos (APC's) ficando na interface entre o sistema imune inato e adaptativo (JANEWAY, 2001).

Como APCs, englobam os antígenos por fagocitose ou endocitose e após internalizados, são digeridos em fragmentos peptídicos que se associam a moléculas de MHC de classe II presentes na superfície celular (NEILD; MURATA; ROY, 2005). Como células efectoras, os macrófagos ativados podem exibir citotoxicidade através do contato celular ou por receptores para região Fc de anticorpos (por exemplo, CD16) (MANTOVANI et al., 2004) e posterior secreção de citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS, em inglês), que podem facilmente reagir com macromoléculas, incluindo lipídios, proteínas e DNA (REMER et al., 2005) que eliminam o microorganismo englobado. As espécies reativas de oxigênio mais importantes são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o óxido nítrico (NO), que são diretamente tóxicos contra as bactérias (PAHAN et al., 1998). Causam peroxidação de membranas fosfolipídicas, o que pode alterar a fluidez de membranas biológicas e levar a perda da integridade celular. Em sistemas biológicos, o NO é sintetizado a partir da L-arginina de

diferentes isoenzimas, denominadas óxido-nítrico sintases (NOS). Duas destas são constitutivamente expressas em células do endotélio vascular (eNOS ou NOS tipo III) e em neurônios (nNOS ou NOS tipo I), enquanto que a expressão da terceira isoenzima (iNOS ou NOS tipo II) é induzida, em uma variedade de células, por produtos de bactérias Gram-negativas (endotoxinas) e bactérias Gram-positivas. As eNOS e nNOS são transitoriamente ativadas em respostas ao aumento intracelular dos níveis de cálcio e estão envolvidas na regulação das funções fisiológicas, enquanto que iNOS é expressa e continuamente ativa durante inflamações, onde está envolvida na defesa do hospedeiro contra patógenos (CADENAS; CADENAS, 2002).

As citocinas desempenham importante função na indução e mediação de respostas inflamatórias e imunológicas. Entre as células inflamatórias, os macrófagos são amplamente reconhecidos como células de grande importância na secreção de citocinas (MIRE-SLUIJS; THORPE, 1998). A habilidade em reconhecer uma grande gama de ligantes exógenos e endógenos, bem como responder aos estímulos, é central para as funções dos macrófagos em homeostase e também na defesa contra patógenos na imunidade inata e adquirida, autoimunidade, inflamação e imunopatologias (TAYLOR et al., 2005). As células da imunidade inata possuem um grupo de receptores codificados no genoma (denominados Receptores de Reconhecimento de Padrão, ou PRR's), e cada receptor abriga especificidades capazes de detectar constituintes invariantes de patógenos (conhecidos como Padrões Moleculares Associados a Patógenos, PAMP's).

Esta estratégia ajuda a evitar que microrganismos mutantes escapem da vigilância e permite que o sistema imune detecte várias classes de microrganismos através do uso de um repertório relativamente limitado de receptores. Acredita-se que os PAMPs sejam produzidos somente pelos microrganismos invasores não sendo expressos no hospedeiro, o que permite que a imunidade inata discrimine entre “próprio” e “não-próprio” (MONTERO VEGA, 2008). A estrutura dos PAMPs são essenciais para a integridade e sobrevivência dos micróbios pois são estruturas invariáveis altamente conservadas de classes inteiras de micróbios (LIU, 2008). Conseqüentemente, os organismos hospedeiros podem contar com o reconhecimento dos PAMPs para a identificação dos micróbios porque

estes não podem alterá-los sem enfrentar risco para sua sobrevivência (LIU, 2008).

Os PRR's são receptores inatos definidos na sua habilidade de reconhecer especificamente micróbios e/ou produtos bacterianos. São tanto solúveis como associados à célula, expressos na superfície ou intracelularmente (JEANNIN; JAILLON; DELNESTE, 2008); e podem ser classificados em três famílias, com bases nas suas funções:

- I) Receptores endocíticos, expressos na superfície celular, medeiam o reconhecimento e internalização de micróbios e/ou produtos bacterianos. Entre estas moléculas encontramos as famílias de receptores GPI-ancorado (CD14), *Scavenger* (SR), CLR (*C-type Lectin*)
- II) Receptores de sinalização, que incluem os Receptores *Toll-Like* (TLR), *NOD-like* (NLR), *helicases RGI-like* (RLH). Estes receptores estão envolvidos na ativação celular em resposta a diversos produtos bacterianos, como proteínas, glicanas, lipoproteínas e ácidos nucleicos. Podem ser expressos na superfície celular ou intracelularmente.
- III) Moléculas de ligação solúveis (também conhecidas como opsoninas), que facilitam o reconhecimento e eliminação dos seus ligantes pelos fagócitos. Algumas estão envolvidas na ativação da via complemento (JEANNIN; JAILLON; DELNESTE, 2008). Nessa classe encontramos as colectinas, ficolinas e pentraxinas (PTX).

Alguns dos receptores envolvidos na ativação de macrófagos estão representados na Quadro 1. Os PRR agem como sensores imunológicos capazes de discriminar o “próprio” do “não-próprio” e o “próprio modificado” (por exemplo, células em apoptose, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas). O recrutamento dos PRR por seus ligantes resulta em ativação celular (expressão de moléculas co-estimulatórias e produção de citocinas pró-inflamatórias), possibilitando a iniciação de resposta imune específica (JEANNIN; JAILLON; DELNESTE, 2008).

O conceito atual é de que o PRR recrutado dita o tipo de resposta imune adaptada ao microorganismo invasor (PADOVAN; LANDMANN; DE LIBERO, 2007). Por outro lado, a internalização sem a presença de um sinal de perigo (isto é, sem recrutamento de um receptor de sinalização) pode levar à tolerância, como verificado na

internalização de células apoptóticas (JEANNIN; JAILLON; DELNESTE, 2008).

Família de Receptor	Exemplo	Função (exemplo)
<i>Scavenger</i> (colagenoso)	SR-A	Fagocitose de bactéria e células apoptóticas, endocitose de LDL modificada, adesão
<i>Scavenger</i> (não-colagenoso)	CD 36	Fagocitose de células apoptóticas, reconhecimento de diacil lipídio bacteriano
GPI-ancorada	CD14	Proteína de ligação do LPS/interações MD2 e MyD88, sinalização via TLR, reconhecimento de células apoptóticas
Integrinas	CR3 (CD18/11b)	Fagocitose mediada pelo receptor de complemento (C3bi)
Família das imunoglobulinas	FcR (ITAM/ITIM)	Ligação dependente de anticorpo, ADCC
	TREM-1 (ITAM)	Regulação da inflamação
Superfamília Transmembrana	CCR2	Receptor para MCP-1
	C5aR	Quimiotaxia, degranulação
	EMR2 (EGF-TM7)	Adesão de célula mielóide,
<i>NK-like C-type lectin-like</i>	<i>Dectin-1</i> (ITAM-like)	Receptor de β -glucana, ingestão de partícula fúngica, liberação de TNF- α /interação com TLR2
<i>C-type lectin</i> (CTL simples)	DC-SIGN	Reconhecimento de patógeno, adesão via ICAM
CTL múltiplo	MR	Clearance, ativação alternativa
<i>Toll-like</i>	TLR2	Resposta a peptidoglicana
	TLR4	Resposta a LPS

Quadro 1 :Alguns dos receptores de macrófagos envolvidos no reconhecimento imunológico.

Fonte: TAYLOR et al, 2005.

Os macrófagos, quando envolvidos na remoção de *debris* celulares, gerados durante o remodelamento tecidual, “limpam” rápida e eficientemente os tecidos das células apoptóticas, sem a participação de outras células do sistema imune. Nestas situações não produzem (ou produzem muito pouco) mediadores imunológicos (KONO; ROCK, 2008). Os receptores que medeiam estes processos de *clearance* homeostático incluem receptores *scavenger*, receptores fosfatidil-serina, receptor de trombospondina, de integrinas e complemento. De maneira geral, estes receptores não transduzem sinais que induzem a transcrição

de genes de citocinas (TAYLOR et al., 2005). Portanto, em condições de homeostase, a função principal dos macrófagos é agir como uma célula “zeladora”, limpando o ambiente intersticial de material celular estranho (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os *debris* que foram gerados por necrose resultante de trauma ou estresse também podem ser limpos pelos macrófagos, mas em contraste com o exemplo de apoptose, o *clearance* destes *debris* causa alterações marcantes na fisiologia dos macrófagos, incluindo alterações nas proteínas de superfície e produção de citocinas e mediadores inflamatórios. Em muitos casos estes *debris* funcionam como sinais de perigo, como as *heat shock-proteins* (HSPs), histonas, DNA e outros nucleotídeos, e componentes da matriz extracelular clivadas por proteases celulares (ZHANG; MOSSER, 2008).

A resposta dos macrófagos aos sinais endógenos de perigo é somente um exemplo dos diferentes estímulos que desencadeiam sua ativação nos tecidos. Assim, estas células têm uma marcante plasticidade que permite que respondam eficientemente aos sinais do ambiente e mudem seu fenótipo, sendo que sua fisiologia também pode ser marcadamente alterada pelas respostas inatas e adaptativas (MOSSER; EDWARDS, 2008). Podem responder tanto a estímulos endógenos, que são rapidamente gerados após injúria ou infecção, como a estímulos provenientes de patógenos gerando normalmente alterações mais prolongadas neste último caso (GORDON, 2007).

1.1.2 Macrófagos ativados

Os macrófagos ativados estão presentes em vários exudatos e podem ser caracterizados por parâmetros morfológicos, além de vários marcadores específicos (GORDON, 2007). O termo “macrófago ativado” geralmente refere-se a macrófagos cujas características funcionais, bioquímicas e morfológicas refletem um aumento da atividade celular. Quando comparados com macrófagos residentes, os macrófagos ativados são maiores e mais aderentes às superfícies. As células ativadas demonstram aumento da expressão e secreção de enzimas lisossomais e de fatores de crescimento (MAURYA et al., 2007). Embora ainda não haja consenso sobre formas de classificar

populações de macrófagos ativados, a Figura 1 apresenta um resumo do espectro de ativação.

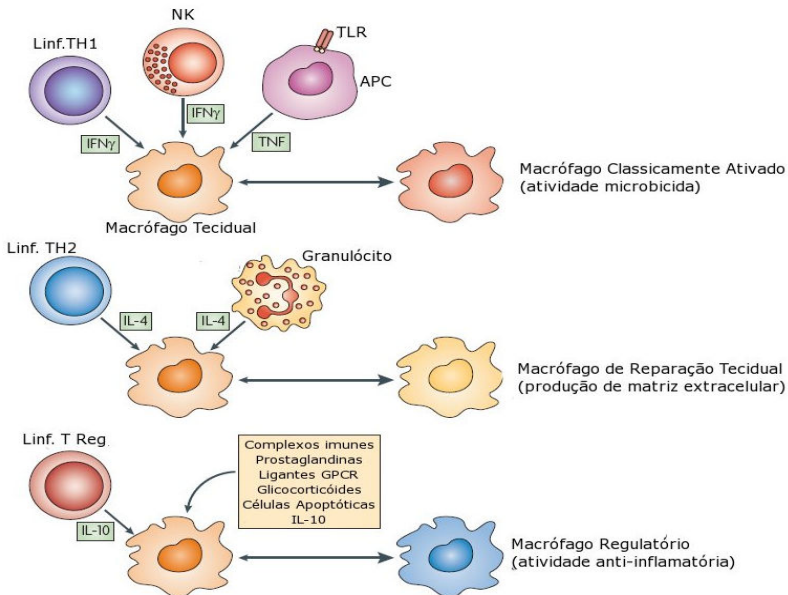


Fig 1: Espectro de ativação dos macrófagos. Adaptado de MOSSER, EDWARDS, 2008.

O termo “macrófago classicamente ativado” tem sido usado para designar macrófagos efetores que são produzidos durante respostas imunes mediadas por células. Nesta caracterização, a combinação de dois sinais, IFN- γ e TNF, resulta em uma população de macrófagos com uma capacidade microbicida e tumoricida aumentada e secretando altos níveis de mediadores e citocinas pró-inflamatórias (O'SHEA; MURRAY, 2008). O IFN- γ pode ser produzido durante uma resposta adaptativa pelos linfócitos TH1 ou TCD8+, ou durante uma resposta imune inata pelas NK, porém de maneira mais transiente e incapaz de sustentar uma população de macrófagos ativados. O TNF pode ser produzido por qualquer APC (MOSSER; EDWARDS, 2008). Os dois

sinais necessários para a ativação dos macrófagos também podem ser gerados por certos agonistas dos TLR, que induzem TNF e IFN- β , este último podendo substituir o IFN- γ (YAMAMOTO; AKIRA, 2005). As citocinas pró-inflamatórias (p.ex. TNF- α , IL-6, IL-12) que são produzidas por macrófagos classicamente ativados são componentes importantes resposta imune, mas podem causar dano muito grande ao hospedeiro (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Da mesma maneira que na ativação clássica, os “macrófagos de reparação tecidual” (*wound-healing macrophages*) podem desenvolver resposta por estímulos tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo. Um dos primeiros sinais lançados durante uma injúria tecidual é a IL-4, sendo os basófilos e mastócitos fontes iniciais importantes, embora possa também ser produzida por outros granulócitos. A IL-4 é considerada o principal ativador para o desenvolvimento e manutenção dos macrófagos de reparação tecidual e induz a atividade de arginase, convertendo arginina em ornitina, um dos precursores de poliaminas e colágeno, contribuindo então para a produção de matriz extracelular. A característica de respostas tipo TH2 é a secreção de IL-4 e IL-13, primariamente induzida em respostas a distúrbios nas superfícies de mucosas e particularmente importantes nos pulmões (VARIN; GORDON, 2009). Os macrófagos tratados *in vitro* com IL-4 e IL-13 falham em apresentar antígenos a linfócitos T, produzem quantidades mínimas de citocinas pró-inflamatórias e são menos eficientes que os macrófagos classicamente ativados em produzir radicais tóxicos de oxigênio e nitrogênio (EDWARDS et al., 2006). Estes macrófagos também podem exercer efeitos regulatórios indiretos na resposta imune, pois as poliaminas que produzem podem influenciar na produção de citocinas e suprimir a expansão clonal de linfócitos adjacentes (CORDEIRO-DA-SILVA et al., 2004). Apesar do papel na reparação tecidual, há evidências de que este tipo de ativação pode ser útil na defesa contra helmintos e nematodos. Os macrófagos de reparação tecidual podem ser prejudiciais ao hospedeiro quando a produção de matriz extracelular é desregulada, levando a fibrose, que em alguns órgãos como pulmões, rins e fígado podem ser relacionadas com doenças crônicas (MOSSER; EDWARDS, 2008).

“Macrófagos regulatórios” podem ser gerados por estímulos do sistema imune inato e adaptativo. Apesar das respostas ao estresse não serem consideradas tipicamente do sistema imune inato, o eixo

hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) pode gerar efeitos marcantes nos macrófagos. Os glicocorticóides são lançados pelas células adrenais em resposta ao estresse e podem inibir as defesas mediadas por macrófagos e funções inflamatórias pela inibição da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo a estabilidade do mRNA (STERNBERG, 2006). Entretanto, nem todas as funções são suprimidas: a fagocitose de células apoptóticas parece permanecer intacta ou até mesmo aumentada na presença de glicocorticóides (LIU et al., 1999). Os macrófagos regulatórios podem surgir durante os estágios tardios de uma resposta imune adaptativa e sua principal função parece ser a de amortecer a resposta imune e limitar a inflamação. Primeiramente foi identificada uma população de macrófagos que secretava altos níveis de IL-10 quando estimulada com um agonista TRL na presença de complexos imunes IgG (GERBER; MOSSER, 2001). Posteriormente identificaram-se outros fatores que podem levar à ativação regulatória de macrófagos, como prostaglandinas, células apoptóticas, IL-10 e alguns ligantes para receptor ligado à proteína G (GPCR) (MARTINEZ et al., 2008). Outros indutores podem ser adenosina, dopamina, histamina, fosfato de esfingosina, melanocortina e peptídeo vasoativo intestinal. Estes primeiros sinais, por si só, geralmente têm muito pouca ou nenhuma função estimulatória. Além da produção de uma citocina imunossupressiva, a IL-10, a ativação regulatória pode diminuir a produção de IL-12, que é pró-inflamatória, e, portanto a razão IL-10/IL-12 pode servir para a definição de macrófago regulatório (MOSSER; EDWARDS, 2008). Diferentemente dos macrófagos de reparação tecidual, os macrófagos regulatórios não contribuem para a produção de matriz extracelular e muitas destas células expressam altos níveis de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) podendo, portanto, apresentar antígeno a linfócitos T (EDWARDS et al., 2006). Existem, assim, claras diferenças funcionais e bioquímicas entre macrófagos regulatórios e de reparação tecidual. Os macrófagos regulatórios podem contribuir para a progressão de neoplasias e os altos níveis de IL-10 podem predispor o hospedeiro à infecção (MOSSER; EDWARDS, 2008).

1.2 Pesquisa da potencial atividade imunomodulatória de substâncias obtidas de produtos naturais

O desenvolvimento de medicamentos antiinflamatórios, imunomodulatórios, antibióticos, antivirais, imunossupressores e anticorpos monoclonais têm revolucionado o tratamento e o desfecho de diversas enfermidades. A pesquisa de novos fármacos mostrou avanços importantes nos últimos anos, principalmente, após o desenvolvimento de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais permitem a análise de várias amostras, em tempo reduzido, possibilitando a realização de várias repetições experimentais, além de propiciar uma análise estatística consistente dos resultados e conseqüente reprodutibilidade (HOUGHTON, 2000). Atualmente, muitos fármacos de origem natural encontram-se disponíveis no mercado, em decorrência da extensa diversidade química dos produtos naturais, sendo que esses constituem uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades, não apenas pelo grande número de espécies com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos sintetizados (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Além disso, grande parte das substâncias ativas pode ser isolada e modificada estruturalmente, alcançando maior eficácia e menor citotoxicidade (NIELSEN, 2002). Uma das estratégias na busca de novos fármacos derivados de produtos naturais é baseada no estudo de extratos vegetais de plantas medicinais (PATWARDHAN; GAUTAM, 2005). Estes extratos constituem uma grande fonte de metabólitos secundários, tais como flavonóides (HAVSTEEN, 2002), alcalóides (RAGHAV et al., 2006), taninos (KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005), compostos fenólicos (WADSWORTH; KOOP, 1999), entre outros. Muitos destes extratos têm comprovada atividade *in vitro*. A ação destas substâncias sobre células do sistema imune, porém, tem sido pouco estudada.

Embora as células do sistema imune sejam normalmente ativadas através de antígenos específicos, existem substâncias que podem agir sobre estas populações celulares de maneira inespecífica, modulando a resposta imune. Estas substâncias, denominados imunomodulares, são compostos que modificam as respostas biológicas, afetando a resposta imunológica de modo positivo ou negativo (CHIRIGOS, 1992). A modulação da atividade do sistema imune é uma intervenção farmacológica requerida para muitas condições patológicas. Imunossupressão é proeminente no tratamento de doenças autoimunes e alergias, e a inibição e prevenção integral de respostas imunes. Por outro lado, a estimulação do sistema imune é desejável para outras condições

como infecções e neoplasias. Os imunostimulantes (também conhecidos como modificadores de resposta imunológica) representam uma classe emergente de fármacos que são designados para amplificar as respostas imunes que ocorrem naturalmente contra patógenos infecciosos e células tumorais (MIZUMOTO et al., 2005).

Muitos tipos de imunomoduladores têm sido identificados, incluindo proteínas de mamíferos, como o IFN- γ , fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos, bem como substâncias isoladas e purificadas de microorganismos. Nas últimas décadas, polissacarídeos isolados de fontes naturais (cogumelos, algas, líquens e plantas superiores) têm atraído a atenção da pesquisa biomédica em função do seu largo espectro de propriedades terapêuticas e baixa toxicidade (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Com os fármacos imunomoduladores tradicionais continuando a exibir eficácia limitada e efeitos colaterais indesejáveis, torna-se necessário desenvolver imunoterapias novas, melhores, alvo-específicas. (PATWARDHAN; GAUTAM, 2005).

A descoberta de novas substâncias com atividade imunomodulatória abre a possibilidade de intervenções terapêuticas numa variedade de distúrbios, incluindo neoplasias, imunodeficiências como AIDS, doenças inflamatórias e doenças auto-imunes. Apesar da grande biodiversidade brasileira, que pode, sem dúvida, ser uma importante fonte de novas moléculas com capacidade de modular a resposta imune, poucos estudos com componentes da biodiversidade. Uma possibilidade para explicar esta escassez de pesquisas nesta área, deve-se ao fato de não existirem técnicas rápidas, sensíveis e reprodutíveis para triagem de grande número destas substâncias (SMIT; OBERHOLZER; PRETORIUS, 2009).

As técnicas mais comumente empregadas para avaliação da ativação de células imunes baseiam-se na pesquisa da produção de citocinas por estas células. Normalmente estas células são obtidas de diferentes linhagens de camundongos e ratos, o que em parte explica a baixa reprodutibilidade (DELARCHE; CHOLLET-MARTIN, 1999). As produções de citocinas pode ser mensurada em dois níveis: proteínas e transcritos de mRNA. As proteínas podem ser medidas usando várias técnicas, como ELISA, Elispot, métodos biológicos e marcação intracelular. Todas estas técnicas se baseiam na capacidade dos anticorpos reagentes e de níveis adequados da expressão das proteínas.

A expressão de proteínas também podem ser avaliadas indiretamente através da detecção de mRNA usando-se técnicas como *Northern blot*, hibridização *in situ*, ensaio de proteção de RNase (RPA) e RT-PCR. Apesar das análises de *Northern blot* e RPAs serem quantitativas, estas técnicas requerem grandes quantidades de RNA. A RT-PCR permite uma amplificação exponencial do gene de interesse, entretanto não é quantitativa. Muitas técnicas quantitativas têm sido desenvolvidas, como a PCR quantitativa competitiva (QC-PCR), que utiliza quantidades conhecidas de um competidor no mesmo tubo de reação do transcrito de interesse; e mais recentemente a reação de PCR em Tempo Real (qRT-PCR) (BUDHIA et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Padronizar a técnica de RT-PCR para triagem *in vitro* de compostos de origem natural ou sintética com potencial atividade imunomodulatória em macrófagos.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar as condições ideais de cada etapa da RT-PCR para detecção da expressão/inibição do mRNA de TNF- α , IL-10, IL-12 e iNOS em células RAW 264.7;
- Determinar o efeito citotóxico de galatos sintéticos, através da determinação da CC50% (citotoxicidade em 50% de células), pelo ensaio do MTT sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7;
- Aplicar a técnica de RT-PCR padronizada em avaliação da potencial atividade imunodulatória dos galatos e dos polissacarídeos de *Agaricus blazei* sobre linhagem de macrófagos RAW 264.7, como prova conceito.
- Avaliar a potencial atividade imunodulatória dos galatos e dos polissacarídeos de *Agaricus blazei* sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7, por meio da Dosagem de óxido nítrico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura celular

4.1.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas foram:

- RAW 264.7 (ATCC TIB-71), gentilmente cedida pelo Dr. Juliano Bordignon, do Instituto Carlos Chagas (Curitiba/PR). É uma linhagem de macrófagos derivados de tumores induzidos pelo vírus de *Abelson Murine Leukemia virus*, em camundongos machos BALB/c.
- J774.A1 (ATCC TIB-67), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Mário Steindel do Laboratório de Protozoologia da UFSC. É uma linhagem de macrófagos derivada de camundongos BALB/c.
- J774.16, gentilmente cedida pela Prof^ª. Dra. Elaine G. Rodrigues, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP/SP. É uma linhagem de origem murina (BALB/c, haplótipo H-2^d) derivada de sarcoma reticular.
- THP-1 (ATCC TIB-202), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Hernán Terenzi, do Laboratório de Expressão Gênica da UFSC. É uma linhagem humana com morfologia de pró-monócito, derivada de leucemia monocítica aguda.

4.1.2 Condições de cultura celular

As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² e mantidas à temperatura de 37°C e 5% de CO₂, cada linhagem com os seguintes meios de cultura:

RAW 264.7: meio DMEM (Cultilab) suplementado com 1,8g/L de Bicarbonato de sódio (Merck), 10% (V/V) Soro Bovino Fetal (SBF) (Cultilab), 0,1% (V/V) de antibiótico Gentamicina 40mg/mL (Schering-Plough).

J774.A1: meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 2 g/L de Bicarbonato de sódio (Merck), L-Glutamina 0,3g/L (Sigma), ácido

pirúvico 0,11g/L (Sigma) e HEPES 2,3g/L (Biosolve); 10% (V/V) Soro Bovino Fetal (SBF) (Cultilab), 0,1% (V/V) de antibiótico PSA (Penicilina + Streptomina + Anfotericina) 1% (Sigma).

J774.16: meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 2 g/L de Bicarbonato de sódio (Merck), L-Glutamina 0,3g/L (Sigma), ácido pirúvico 0,11g/L (Sigma) e HEPES 2,3g/L (Biosolve); 10% (V/V) Soro Bovino Fetal (SBF) (Cultilab), 0,1% (V/V) de antibiótico PSA 1% (Sigma), 1% de solução de aminoácidos (Sigma).

THP-1: meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 2 g/L de Bicarbonato de sódio (Merck), L-Glutamina 0,3g/L (Sigma), ácido pirúvico 0,11g/L (Sigma) e HEPES 2,3g/L (Biosolve); 10% (V/V) Soro Bovino Fetal (SBF) (Cultilab), 0,1% (V/V) de antibiótico PSA 1% (Sigma).

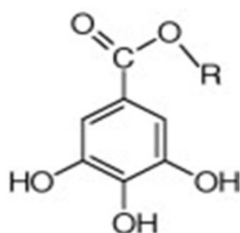
As passagens de células foram feitas a cada 3-4 dias, com auxílio de *cell scraper* para as linhagens aderentes (RAW 264.7, J774.A1 e J774.16). A linhagem THP-1 cresce em suspensão, sendo as passagens feitas através de transferência de volume da suspensão contendo 5×10^4 células.

Para os experimentos de RT-PCR observou-se que os melhores resultados eram obtidos quando o plaqueamento era feito com passagem para a placa de 12 cavidades esperando a confluência do tapete celular antes de iniciar o experimento, ao invés um plaqueamento direto de grande número de células, assim evitando a manipulação excessiva e *stress* celular antes dos experimentos. Também verificou-se que a placa de 12 cavidades é a mais adequada para os experimentos.

4.2 Compostos testados

4.2.1 Galatos

Os galatos que foram testados quanto à toxicidade e potencial atividade estimulatória sobre macrófagos, descritos na Figura 2, foram gentilmente cedidos pelo doutorando Paulo César Leal, que os sintetizou (SAVI et al., 2005), orientado pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes (QMC/CFM/UFSC). Os compostos (50 mM) foram dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido), estocados a -20°C ao abrigo da luz, e posteriormente diluídos em meio de cultura antes do uso.



Composto	Substituinte (R)
Ácido Gálico	H
Galato de Metila	CH ₃
Galato de Etila	C ₂ H ₅
Galato de Propila	C ₃ H ₇
Galato de Butila	C ₄ H ₉
Galato de Pentila	C ₅ H ₁₁
Galato de Hexila	C ₆ H ₁₃
Galato de Heptila	C ₇ H ₁₅
Galato de Octila	C ₈ H ₁₇
Galato de Nonila	C ₉ H ₁₉
Galato de Decila	C ₁₀ H ₂₁
Galato de Undecila	C ₁₁ H ₂₃
Galato de Dodecila	C ₁₂ H ₂₅
Galato de Tetradecila	C ₁₄ H ₂₉

Figura 2: Estrutura dos galatos testados.

4.2.2 Polissacarídeos de *Agaricus blazei* Murril

As amostras testadas neste estudo (Quadro 3), foram gentilmente cedidas pela doutoranda Carla Máisa Camellini, responsável pela sua extração, purificação e caracterização, sob a orientação da Prof. Dra. Margarida Matos Mendonça (Laboratório de Bioprocessos/MIP/CCB/UFSC). As amostras foram estocadas a 2 g/ml a -20°C ao abrigo da luz e diluídas em meio de cultura antes do uso.

1	Amostra extraída da frutificação- Produto bruto
2	Amostra extraída da frutificação - Separação por membrana de microfiltração
3	Amostra extraída da frutificação - Separação por membrana de ultrafiltração 1
4	Amostra extraída da frutificação - Separação por membrana de ultrafiltração 2
5	Amostra extraída da frutificação - Separação por membrana de nanofiltração
6	Amostra extraída do micélio em grãos de trigo - Produto bruto
7	Amostra extraída do micélio em grãos de trigo - Separação por membrana de microfiltração
8	Amostra extraída do micélio em grãos de trigo - Separação por membrana de ultrafiltração 1
9	Amostra extraída do micélio em grãos de trigo - Separação por membrana de ultrafiltração 2
10	Amostra extraída do micélio em grãos de trigo - Separação por membrana de nanofiltração
11	Amostra extraída do micélio em meio líquido - Produto bruto
12	Amostra extraída do micélio em meio líquido - Separação por membrana de microfiltração
13	Amostra extraída do micélio em meio líquido - Separação por membrana de ultrafiltração 1
14	Amostra extraída do micélio em meio líquido - Separação por membrana de ultrafiltração 2
15	Amostra extraída do micélio em meio líquido - Separação por membrana de nanofiltração

Quadro 2: Amostras de *Agaricus blazei* testados neste trabalho.

4.3 Determinação de citotoxicidade pelo ensaio colorimétrico do sal Azul de tetrazólio (MTT)

4.3.1 Citotoxicidade dos galatos

Para a determinação da citotoxicidade (CC₅₀ –toxicidade para 50% das células) dos galatos utilizou-se o método do MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) proposto por Mosmann (1983) e modificado por que avalia o estado funcional da cadeia respiratória. As células metabolicamente ativas reduzem o sal de

tetrazólio formando cristais de formazana solúveis em DMSO com uma coloração roxa característica. Nesta avaliação os macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados em placa de 96 cavidades na densidade de 5×10^5 células/cavidade, e no dia seguinte as células aderidas foram lavadas com PBS estéril e adicionado o meio de cultura contendo diversas concentrações dos galatos para a determinação da citotoxicidade. Estas preparações foram incubadas por 48 horas ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$). Em seguida, removeu-se o meio cuidadosamente e adicionou-se 50 μl de solução de MTT (Sigma) em PBS (5 mg/mL). A placa foi incubada por mais 6 horas a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Ao término da incubação o excesso de MTT foi removido por remoção do sobrenadante e os cristais de formazana, que precipitaram sobre as células viáveis, foram dissolvidos em 100 μl de DMSO (Merck). A absorbância das amostras foram medidas em leitor de microplacas (Bio-Tek – EL_x 800) utilizando o comprimento de onda de 540 nm, onde o branco era DMSO. A viabilidade celular em cada concentração testada dos diferentes compostos foi estimada por comparação com um controle celular (células sem tratamento).

4.3.2 Estatística dos dados de citotoxicidade

A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi estimada através de Regressão Linear em comparação com um controle celular equivalente a 100% de viabilidade, e submetida a teste estatístico ANOVA. Os valores calculados representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão.

4.4 Dosagem de óxido nítrico produzido por macrófagos

Para a avaliação da produção de óxido nítrico os macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na densidade de 5×10^5 células por cavidade em placas de 96 cavidades e incubados *overnight* para aderência. Aos macrófagos aderidos foi adicionado meio novo contendo a substância ou composto a ser analisado. Como controle positivo da ativação utilizou-se lipopolissacarídeo (LPS de *E.coli* - Sigma) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. As células foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de $5\% \text{CO}_2$. Após este tempo, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para outra placa de

96 cavidades e adicionou-se 100 μL do reagente de Griess. O reagente de Griess foi preparado pela mistura de duas soluções na proporção 1:1, imediatamente antes do uso. A primeira solução era constituída por naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) (Sigma) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) (Sigma) e a outra solução por sulfonamina *p*-aminobenzeno 1% (p/v) (Sigma) em ácido fosfórico 5% (v/v) (GREEN et al., 1982) Após a incubação por dez minutos a absorbância foi medida em 540 nm, em leitor de micro-placas, utilizando como branco, meio de cultura contendo reagente de Griess. As concentrações de nitrito foram estimadas utilizando-se uma curva padrão de NaNO_2 . Em outro grupo, os compostos foram tratados com Polimixina B (Sigma) na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em agitador horizontal por 1 hora, antes de serem adicionados aos macrófagos.

4.5 Padronização da técnica de RT-PCR

4.5.1 Extração de RNA total

Foram utilizados materiais e soluções isentos de RNase (*RNase Free*) durante toda a manipulação das amostras, sendo sempre observadas as boas práticas de manipulação. As RNases (ribonucleases) são enzimas extremamente resistentes a vários tratamentos, inclusive térmicos. De forma a diminuir a contaminação com RNases das soluções, vidrarias e reagentes, foi feito tratamento com autoclavagem e com DEPC (dietilpirocarbonato) 0,01%, que é um forte inibidor de RNases. As amostras de RNA foram mantidas em freezer -80°C e em gelo durante a manipulação, para evitar a degradação por temperatura.

Para extração do RNA, retirava-se o meio de cultura sobrenadante das placas cada experimento e, sobre o tapete celular (aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células), adicionava-se 0,5 mL de TRIZOL® (Invitrogen). Por pipetagem repetitiva promoveu-se a lise celular. Após incubação a temperatura ambiente por 5 min, para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas, adicionou-se 100 μL de clorofórmio (Merck) e procedeu-se a centrifugação (12.000 rpm, 15 min a 4°C , em centrífuga (Eppendorf modelo 5804R). A fase aquosa (até 60% do volume original de TRIZOL) é então transferida novamente para um outro tubo e o RNA total é precipitado com 250 μL de isopropanol

(Merck) resfriado. Procedese uma incubação por 10 minutos, em gelo e centrifuga-se novamente o material (12.000 rpm, 10 min a 4°C em centrífuga. A fina camada de gel no fundo do tubo) é então lavado com 0,5 mL de etanol 75% (diluído em água DEPC 0,01%), sob homogeneização. Após mais uma centrifugação (7.500 rpm, 5 min a 4°C em centrífuga, o sobrenadante é desprezado e o sedimento é seco com o tubo aberto por aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. O RNA total é então suspenso em água DEPC. Os estoques de RNA total foram mantidos a -80°C, por no máximo um mês. A concentração de RNA das amostras foi determinada em espectrofotômetro (Eppendorf – Biophotomer), estimando-se a concentração com base na absorbância em 260 nm (A_{260nm}), através da fórmula:

$$[\text{RNA total ng}/\mu\text{l}] = (A_{260nm}) \times (\text{Fc } 40) \times \text{fator de diluição}$$

Onde (Fc 40) corresponde ao Fator de Conversão no qual a A_{260nm} máxima é 1 e corresponde a 40 ng/mL de RNA total

4.5.2 Seleção, desenho e seqüência dos pares de iniciadores específicos utilizados na RT-PCR

Após seleção criteriosa dos marcadores de ativação de macrófagos (TNF- α , IL-10, IL-12a e iNOS) e do controle interno (β -Actina), os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen. Os iniciadores para TNF- α , IL-10, IL-12a foram desenhados com auxílio da plataforma Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>), com base no genoma murino acessado junto ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Foram respeitados alguns parâmetros físico-químicos desejáveis como: não-formação de *hairpin* e dímeros, pouca complementaridade interna, ausência de estrutura secundária significativa (conteúdo C+G entre 40-60%), baixa estabilidade da extremidade 3'. O alinhamento específico foi conferido pelo programa BioEdit® versão 7.0.9, e similaridades entre as seqüências e seqüências disponíveis no GenBank pela ferramenta *on-*

line BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) . Os iniciadores utilizados foram: TNF- α , 5' CTGGGACAGTGACCTGGACT e 3' GCACCTCAGGGAAGAGTCTG (204 pb); IL-10, 5' TGCTATGCTGCCTGCTCTTA e 3' TCATTTCCGATAAAGGCTTGG (243pb); IL-12a 5' ATGACCCTGTGCCTTGGTAG e 3' GAAGCAGGATGCAGAGCTTC (241pb); iNOS 5' TCACTGGGACAGCACAGAAT e 3' TGTGTCTGCAGATGTGCTGA (510 pb); β -Actina, 5' CCAACCGTGAAAAGATGACC e 3' GCAGTAATCTCCTTCTGCATCC (616 pb).

4.5.3 Reação de transcrição reversa (RT)

Ao RNA total (1 μ g) foi feita a reação de transcrição reversa (RT) para cDNA, com volume final de 20 μ l. Em tubo tipo eppendorff de 600 μ l, isento de RNases, foram adicionados os seguintes componentes: 1 μ l de Oligo d(T) 500 μ g/ μ l (Invitrogen) (conforme padronização que será descrita no item 4.5.3.1), 1 μ l de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 1 μ g de RNA total, água DEPC suficiente para completar 12 μ l. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 minutos em termociclador e em seguida retiradas e mantidas em gelo, a fim de evitar anelamento inespecífico do iniciador. Foram adicionados os seguintes componentes: 4 μ l de First Strand (5X), 2 μ l de 0,1 M de ditioneitol (DTT) (Invitrogen), 1 μ l de RNase OUT (40 uM/ul) (Invitrogen). Agitou-se suavemente e incubou-se a 37°C por 2 min no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient). Adicionou-se, sob agitação suave, 1 μ l de M-MLV Transcriptase Reversa 200 U/ μ l (Invitrogen) e procedeu-se nova incubação a 37°C por 50 min, seguida de outra a 70°C por 15 min, em termociclador.

REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA - RT			
Reagente	Concentração	Volume utilizado	Observação
Oligo d(T)	500 µg/ml	1 µl	Padronizado conforme item 4.5.3.1
RNA total	1 µg	-	Padronizado conforme item 4.5.3.2
dNTP Mix	1 µl	10 mM	-
Água DEPC	-	qsp 20 µl	-
<i>First Strand Buffer</i>	5 X	4 µl	-
DTT	0,1 mM	2 µl	-
<i>RNAse OUT</i>	40 mM/µl	1 µl	-
M-MLV	200 U/µl	1 µl	-

Quadro 3: Condições padronizadas da Reação de Transcrição Reversa

4.5.3.1 Seleção dos iniciadores para reação de transcrição reversa

Foram testados três iniciadores para a Reação de Transcrição Reversa (RT): Oligo d(T), Iniciador randômico e Iniciador *Antisense* (iniciador 3'), sendo estes substituídos na reação descrita no item 4.5.3. A sequência *antisense* do iniciador se anela especificamente ao mRNA do gene a ser amplificado, construindo um transcrito de cDNA específico. O iniciador Oligo dT anela-se à sequência repetida de adenina (cauda poliA), peculiar a todo mRNA, enquanto que o iniciador randômico é um sequência de 6 oligodeoxiribonucleotídeos que se ligam aleatoriamente à qualquer tipo de RNA existente. Após a reação de transcrição, procedeu-se a reação de PCR conforme descrito no item 4.5.5 e visualização em gel de agarose 1% conforme será descrito no item 4.5.5

4.5.3.2 Seleção da quantidade de RNA a ser transcrita

Foram testadas as concentrações de 10 ng, 100 ng e 1 µg de RNA total para ser transcrita em cDNA na reação da Transcriptase Reversa (RT), a fim de eliminar bandas provenientes de expressão basal de citocinas por macrófagos não ativados. O experimento se deu pela comparação de resultados de controles positivos (com 1 µg/ml de LPS) e controles negativos em células RAW 264.7, incubadas por 24 horas, nas condições descritas no item 4.1.2. Após a reação de transcrição, procedeu-se a reação de PCR conforme será descrito no item 4.5.4 e visualização em gel de agarose 1% conforme será descrito no item 4.5.5.

4.5.4 Reação da Cadeia de Polimerase (PCR)

A reação foi realizada em volume final de 10 µL e, para isso, foram adicionados os seguintes componentes em cada tubo: 4,5 µl de água ultrapurificada estéril tratada com DEPC 0,1%, 1 µl de Tampão na concentração 10 X (Invitrogen), 0,3 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 1 µl da mistura com os deoxinucleotídeos trifosfatados 2 mM (0,5 mM de cada dNTP) (Invitrogen), 0,2 µl da enzima Platinum Taq Polymerase 5 U/µl (Invitrogen), 1 µl de iniciador 5' e 1 µl de iniciador 3' (10 pmoles/µl), e finalmente 1 µl de cDNA (produto da reação de transcrição).

Os componentes foram homogeneizados, e posteriormente incubados em Termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), onde os ciclos e temperaturas foram definidos conforme padronização (será descrito nos itens 4.5.4.1 e 4.5.4.2): desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 30 ciclos repetidos de 94°C por 45 segundos para desnaturação; hibridização por 45 segundos em temperatura específica para cada marcador (66°C para TNF-α, 59°C para IL-10, 54°C para iNOS, 58°C para β-Actina), seguidos de 45 segundos a 72°C para polimerização. Após estes ciclos, a reação era finalizada com uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE - PCR			
Reagente	Concentração	Volume utilizado	Observação
Água DEPC	-	4,5 µl	-
Tampão	10 X	1 µl	-
MgCl ₂	50 mM	0,3 µl	-
dNTP Mix	2 mM	1 µl	-
Taq Polimerase	5 U/µl	0,2 µl	-
Iniciador 5'	10 pmoles/µl	1 µl	Padronizado conforme item 4.5.4.2
Iniciador 3'	10 pmoles/µl	1 µl	Padronizado conforme item 4.5.4.2
cDNA	Produto RT (1 µg) diluído 1:100	1 µl	Padronizado conforme item 4.5.4.3

Quadro 4: Condições padronizadas da Reação da Cadeia de Polimerase - PCR

4.5.4.1 Determinação da temperatura de anelamento ideal

Para o sucesso da PCR, é necessário que os iniciadores anelem especificamente à região alvo do cDNA molde, com a estringência adequada. Para isso foram testadas as seguintes temperaturas de anelamento: 51,9 °C, 54,2 °C, 58,0 °C, 60,4 °C, 64,8 °C e 66,5 °C. As temperaturas foram definidas pela programação de um gradiente no bloco do termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), onde o meio do bloco estava a 59°C, com variação de +/- 7°C. Fez-se a PCR a partir de amostra estimulada com 1 µg/ml de LPS por 24 horas, na linhagem RAW 264.7, nas condições descritas no item 4.1.2. Após isso, procedeu-se a reação de RT-PCR conforme descrito nos itens 4.5.1, 4.5.3, 4.5.4 e visualização em gel de agarose 1% conforme será descrito no item 4.5.5.

4.5.4.2 Padronização das concentrações dos iniciadores específicos

Na determinação da melhor concentração de iniciadores específicos para os genes em estudo, fez-se um teste a partir de um controle positivo com células RAW 264.7, ativadas com 1 µg/ml de LPS por 24 horas, conforme condições descritas no item 4.1.2. As concentrações testadas foram 500 nM, 250 nM e 100 nM de cada iniciador. Após a reação de transcrição descrita no item 4.5.3, procedeu-se a reação de PCR conforme descrito no item 4.5.4 e visualização em gel de agarose 1% conforme será descrito no item 4.5.6.

4.5.4.3 Padronização diluição adequada de cDNA

Para determinar-se qual a quantidade de cDNA que permite uma distinção dos produtos de amplificação gerados por uma expressão basal dos marcadores, o que seria um falso positivo, daqueles gerados pelo incremento nas taxas de amplificação dos mesmos., procederam-se cinco diluições seriadas na razão 10 partir do cDNA construído conforme o item 4.5.3, derivado de células RAW 264.7 ativadas durante 24h com LPS (500 ng/ml) nas condições descritas no item 4.1.2. Após isso, procedeu-se a reação de RT-PCR conforme descrito nos itens 4.5.1, 4.5.3, 4.5.4 e visualização em gel de agarose 1% conforme será descrito no item 4.5.5.

4.5.5 Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose 1%

Cinco microlitros dos produtos de PCR misturados a 5 µl de tampão de aplicação 2 X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 25%, ficol 15% e glicerina 30% p/v em água ultrapurificada) foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (GE Healthcare) a 1,0% (p/v) preparados em tampão Tris-Borato EDTA 1 X (TBE, Tris-HCl 0,09M, ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M), com coloração pelo brometo de etídio (50µg/ml) (Invitrogen) de acordo com metodologia padronizada (Sambrook et al,1989). Para cada conjunto de amostras, foram aplicados

conjuntamente 8 μ l do marcador de baixo peso molecular p Blue Script (LMW – 50 μ g de DNA pUC, 128 μ l de tampão 10 X da enzima HaeIII, 10-20 unidades da enzima HaeIII e água ultrapura em quantidade suficiente para 1280 μ l). As bandas de DNA separadas eletroforéticamente foram visualizadas em transluminador de luz ultravioleta e fotografadas para documentação com câmera fotográfica digital (KODAK) utilizando o programa UVP Life Science Software, versão 4.0.

4.6 Otimização das condições de ativação de macrófagos

4.6.1 Seleção de linhagem celular mais adequada

Avaliou-se, entre as linhagens RAW 264.7, J774.A1, J774.16 e THP-1, qual gerava melhores resultados por RT-PCR. Ativou-se as linhagens com 1 μ g/ml de LPS por 24 horas, nas condições de RT-PCR previamente descritas.

4.6.2 Cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7

A fim de determinar qual o melhor tempo de incubação dos macrófagos com os compostos a serem testados, procedeu-se uma cinética de ativação utilizando LPS 1 μ g/ml como padrão de substância ativadora, nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas, e controles celulares (células sem LPS) nos tempos 0 e 48 horas. As RT-PCR e a dosagem de óxido nítrico foram realizadas conforme itens anteriormente descritos.

4.6.3 Análise concentração-resposta dos macrófagos por LPS

Para determinar a concentração-resposta dos macrófagos, testou-se a ativação com diluições seriadas no fator 1:2 de LPS nas concentrações de 1 μ g/ml até 61 pg/ml para o método de RT-PCR e de 10 μ g/ml até 190 pg/ml para o método de dosagem de óxido nítrico. Para RT-PCR, o tempo de ativação foi de 6 horas; enquanto que o para a

dosagem de óxido nítrico foi de 48 horas, conforme descrito anteriormente.

4.6.4 Inibição da ativação da linhagem RAW 264.7 por dexametasona

A dexametasona (DEX) é fármaco antiinflamatório esteroide, que age sobre receptores de glicocorticóides que regulam alguns genes de resposta primária, sendo capaz de inibir a transcrição de grande número de citocinas, incluindo as que foram incluídas neste trabalho. Além disso, também promove a repressão da síntese dos receptores de citocinas. Para ter um controle de inibição de ativação de macrófagos e modelo de composto imunossupressor, a linhagem RAW 264.7 foi submetida a tratamento com 10^{-7} M de Dexametasona (Schering-Plough), concentração usualmente utilizada (FONG et al., 2007). Avaliou-se três modelos de tratamento, conforme a ordem de adição de Dexametasona (inibidor) em relação ao LPS $1\mu\text{g/ml}$ (ativador): pré-tratamento, tratamento concomitante e pós-tratamento. Assim, os tempos de adição foram: 1) pré-tratamento com DEX 24 horas antes da adição de LPS, seguida de incubação por mais 6 horas; 2) pré-tratamento com DEX por 6 horas antes da adição do LPS, seguida de incubação por mais 6 horas; 3) adição concomitante de DEX e LPS, seguida de incubação por 6 horas; 4) adição de DEX após 5 horas de ativação com LPS, seguida de incubação por mais 1 hora; 5) adição de DEX após 18 horas de ativação com LPS, seguida de incubação por mais 6 horas. Após os tempos de incubação, procedeu-se a RT-PCR conforme descrita anteriormente.

4.6.5 Inibição do LPS pela Polimixina B

A Polimixina B é um antibiótico de origem natural que liga e neutraliza o LPS, pela ligação ao Lipídio A, maior componente do LPS e demais endotoxinas. O tratamento com Polimixina B é uma alternativa comumente utilizada para garantir a ausência de LPS contaminante em amostras a serem testadas (SCHEPETKIN; QUINN, 2006), evitando-se

resultados falso-positivos. Avaliou-se a capacidade de inibição de 50 µg/ml de Polimixina B (Sigma) frente a diferentes diluições no fator 1:2 de LPS, de 0,0019 µg/ml até 1 µg/ml para o método de RT-PCR e de 0,0006 µg/ml até 2,5 µg/ml no método de dosagem de óxido nítrico. Os dois compostos foram previamente misturados por 1 hora, primeiramente agitados em aparelhos tipo vórtex e depois em homogeneizados em agitador orbital, e incubados em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7, e realizada RT-PCR e dosagem de óxido nítrico conforme descrito anteriormente.

4.7 Determinação da atividade das frações de polissacarídeos de *Agaricus blazei* em macrófagos

Para avaliação da atividade estimuladora das amostras de polissacarídeos descritas na tabela do item 4.2.2, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram incubadas com 10 µg/ml de cada amostra de polissacarídeo e com 50 µg/ml de Polimixina B (Sigma). Em seguida, foi realizada RT-PCR e dosagem de óxido nítrico conforme descrito anteriormente.

4.8 Determinação da atividade de galatos sintéticos em macrófagos

Para avaliação da atividade estimulatória de galatos sintéticos em macrófagos, incubou-se cada amostra em macrófagos RAW 264.7 nas concentrações determinadas pelo Ensaio de Citotoxicidade – CC_{50%} (MTT), descrito no item 4.3.2. As concentrações testadas foram as seguintes: ácido gálico (750 µM), galato de metila (1000 µM), galato de etila (1000 µM), galato de propila (750 µM), galato de butila (500 µM), galato de pentila (100 µM), galato de hexila (50 µM), galato de heptila (15 µM), galato de octila (30 µM), galato de nonila (15 µM). Após a incubação com estes compostos, procedeu-se avaliação por RT-PCR e dosagem de óxido nítrico conforme descrito anteriormente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condições de cultura celular

Para experimentos de ativação de macrófagos, a condição essencial para a realização dos ensaios é que os macrófagos estejam em “estado de repouso”, cumprindo somente suas funções vitais e regulares sem exercer suas funções efetoras. Os macrófagos estão na primeira linha de defesa do organismo, devendo responder rapidamente a diversos estímulos presentes no meio extracelular adjacente. Sendo assim, para os ensaios de ativação, é fundamental que nenhuma molécula com propriedade estimulatória entre em contato com os receptores envolvidos no processo, gerando uma ativação inespecífica ou pré-ativação, que pode levar a artefato de técnica, interpretações erradas e conseqüentemente resultados sem correlação biológica. Este foi o maior desafio encontrado durante a realização dos experimentos e que consumiu mais tempo, tendo em vista que utilizou-se uma técnica com alta sensibilidade (RT-PCR) e um modelo celular altamente responsivo a estímulos. Portanto, a prevenção, remoção e detecção de moléculas contaminantes com propriedades estimulatórias são importantes, sendo as endotoxinas bacterianas as principais representantes. A denominação de lipopolissacarídeo (LPS) é aplicada a endotoxina purificada, para enfatizar sua natureza química, e às vezes pode ser utilizada como sinônimo. O LPS é biologicamente efetivo em baixas concentrações (abaixo de pg/ml) e é secretado durante a lise celular, porém não no meio de cultura a partir de bactérias vivas.

Reagentes químicos, materiais, vidrarias, tampões são fontes potenciais de endotoxinas, que aderem fortemente a estes e podem ser de difícil remoção durante a lavagem convencional (GORBET; SEFTON, 2005).

A inativação e a remoção das endotoxinas são dois tipos de processos de despirogenização que podem ser aplicados a dispositivos, componentes e qualquer tipo de material que entre em contato com a cultura celular. A inativação pode ser conseguida pela detoxificação da molécula de LPS com tratamentos químicos que promovam a quebra de pontes lábeis ou o bloqueio de sítios necessários à atividade biológica,

como por exemplo, pela hidrólise ácida, oxidação com peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, permanganato de sódio diluído, alquilação com anidridos acético e succínico, ou óxido de etileno. Outras formas de inativar o LPS são tratamento por calor seco, radiação ionizante e tratamento com o antibiótico polimixina B. Para materiais com resistência à temperatura, como vidrarias, os protocolos de inativação por autoclave têm pouco ou nenhum efeito nos níveis de endotoxinas devido à sua alta estabilidade térmica, apenas sujeitando a vidraria a temperaturas de 250°C por mais de 30 minutos ou a 180°C por mais de três horas é que se consegue inativar o LPS (GORBET; SEFTON, 2005).

Água de alta pureza é essencial, não só para a preparação do meio de cultura, mas também para a lavagem de material. Com procedimentos adequados de lavagem com água livre de pirogênios é possível também remover baixos níveis de LPS superficial adsorvidos na vidraria, tampas e dispositivos. A destilação e a deionização da água de laboratório não são suficientes para remoção das endotoxinas, embora leve à redução na concentração destas. Sistemas de ultrafiltração por osmose reversa (p. ex. sistema *Milli-Q*) são eficazes como filtros despirogenizantes e seu mecanismo se deve à exclusão por peso molecular, onde os poros da membrana são pequenos o suficiente para reter a passagem de LPS, com eficiência de 99,5%. Portanto, a osmose reversa complementar à destilação é bastante eficiente para remover as endotoxinas, sendo estes métodos reconhecidos pela Farmacopéia Americana na preparação de água estéril para injeção (RYAN, 2004).

Assim, neste estudo, o procedimento adotado para vidrarias foi o tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% em imersão, durante 15 minutos; seguida de lavagem em água ultrapurificada (água *Milli-Q*) e posterior autoclavagem convencional (121°C por 20 minutos). A mesma abordagem foi utilizada por Wu et al. (2006), que utilizaram ensaio de ativação com a linhagem RAW 264.7. O efeito de solução de peróxido de hidrogênio foi comprovada por estudos que utilizaram três lavagens por imersão de 5 minutos em solução 5% H₂O₂ para a despirogenização de material cirúrgico, conseguindo uma significativa diminuição no nível de endotoxinas (PINTO, 1995).

No passado o Soro Bovino Fetal (SBF) foi uma das maiores fontes de endotoxinas para culturas celulares, mas atualmente o problema está resolvido e os fabricantes disponibilizam produtos com

baixa contaminação e com controle de qualidade baseado no teste do LAL (*Lympulus Amebocyte Lysate*) (KIRIKAE et al., 1997).

Para todos os experimentos utilizaram-se materiais de cultura celular (garrafas de cultura, *cell scrappers*, ponteiras, microtubos) descartáveis e com certificação de “livre de endotoxinas”.

Os macrófagos são células que se aderem aos plásticos utilizados na cultura através de receptores de integrinas e outros receptores cátion-dependentes (MAURYA et al., 2007). Inicialmente utilizou-se tripsina para fazer as subculturas, mas como este procedimento causa a clivagem de proteínas de superfície celular, pode também gerar pré-ativação, conforme verificado experimentalmente (dados não mostrados). Assim, o procedimento adotado para a realização de subculturas foi com o uso de *cell scrappers* para o descolamento de células. Para a realização dos experimentos, optou-se por fazer subculturas diretamente nas placas de 12 cavidades, esperando-se obter a confluência do tapete celular (o que ocorria geralmente após 2-3 dias, com trocas diárias do meio de cultura), dando às células utilizadas em cada experimento um tempo de repouso para recuperação do estresse gerado pelo descolamento. As contagens em câmara de Neubauer mostraram que após este período havia $1,6 \times 10^6$ células/cavidade, em média.

5.2 Determinação da citotoxicidade pelo ensaio colorimétrico do MTT

As células respondem rapidamente a estresse tóxico pela alteração, por exemplo, de taxas metabólicas e crescimento celular ou transcrição gênica que controla funções básicas. Dados de citotoxicidade são importantes em experimentos *in vitro* para triagem de compostos com atividade biológica. Nestes estudos de compostos, têm-se encontrado uma razoável correlação entre citotoxicidade celular e toxicidade aguda em animais e humanos. (EISENBRAND et al., 2002). Desta maneira, a citotoxicidade celular pode ser considerada como um ponto de partida para a avaliação de atividades biológicas de compostos químicos.

O ensaio de viabilidade celular através do sal de tetrazólio MTT [3-(4,5 dimetiazol-2il) 2,5 difenil brometo de tetrazólio] avalia a

atividade metabólica de células pela determinação colorimétrica da redução enzimática do MTT, um composto hidrossolúvel de cor amarela, em cristais insolúveis de formazana com coloração azul-púrpura. As reduções só acontecem quando as enzimas lactato desidrogenases estão ativas, o que só acontece em células viáveis; e por isso este ensaio relaciona a quantidade produzida de formazana, pela leitura colorimétrica da densidade ótica, com a quantidade de células viáveis (LIU et al., 1997).

Resultados preliminares (dados não mostrados) indicaram qual a faixa de concentração adequada dos compostos para a realização dos experimentos. Os valores de CC_{50} dos galatos foram estimados através de regressão linear e os resultados encontram-se na Tabela 1.

Composto	Equação	CC_{50} estimada (μ M)
Ácido gálico	$y = -4,0845x + 1079,4$ $R^2 = 0,8763$	$875,17 \pm 145,6$
Metil galato	$y = -17,782x + 2168,4$ $R^2 = 0,9186$	$1279,3 \pm 208,2 (> 1000)$
Etil galato	$y = -19,028x + 2246,3$ $R^2 = 0,9263$	$1294,9 \pm 103,9 (>1000)$
Propil galato	$y = -8,6902x + 1341,1$ $R^2 = 0,8588$	$906,59 \pm 108,2$
Pentil galato	$y = -10,626x + 672,93$ $R^2 = 0,9329$	$141,63 \pm 15,3$
Hexil galato	$y = -0,3972x + 76,35$ $R^2 = 0,8681$	$56,49 \pm 6,6$
Heptil galato	$y = -2,5618x + 112,05$ $R^2 = 0,851$	$16,04 \pm 3,9$
Octil galato	$y = -1,2698x + 99,121$ $R^2 = 0,805$	$35,72 \pm 4,4$
Nonil galato	$y = 5,0732x + 14,341$ $R^2 = 0,3341$	*

Tabela 1: Resultados dos ensaios de avaliação de citotoxicidade pelo método do MTT, com estimativa da CC_{50} .

* Sem significância estatística.

Observa-se que com o aumento do número de carbonos na cadeia lateral dos galatos, aumenta também a citotoxicidade. Observou-se também que para compostos com cadeia lateral muito grande a hidrossolubilidade diminui, representando uma dificuldade para a execução da técnica, e esta é uma hipótese para os baixos valores do Coeficiente de Determinação (R^2) encontrados para o galato de nonila. Embora um pouco superiores, os resultados obtidos de CC_{50} foram semelhantes aos encontrados por Kratz (2007), que utilizou os mesmos compostos para a determinação da citotoxicidade em células Vero. Com o aumento da cadeia lateral, a partir do decil galato, os resultados de citotoxicidade não foram estatisticamente válidos, devido aos altos desvios-padrão; e conseqüentemente foram eliminados do estudo.

Polissacarídeos isolados de fontes botânicas (cogumelos, algas, líquens e plantas superiores) atraem grande atenção da área biomédica porque possuem amplas propriedades terapêuticas aliadas a uma baixa toxicidade celular (SCHEPETKIN; QUINN, 2006), geralmente não mostrando citotoxicidade em nenhuma das concentrações em que usualmente exibem atividade biológica e que foram escolhidas para este estudo. Desta maneira, não foi feita nenhuma análise quanto à citotoxicidade das frações de polissacarídeos isolados de *Agaricus blazei*. Depois, com as mesmas amostras, Pasetti (2009) encontrou baixa citotoxicidade para concentrações 10 μ M, em linfócitos da linhagem Jurkat.

5.3 Padronização de RT-PCR “Two-step”

Uma das formas de avaliar a ativação de células do sistema imune é pela expressão de genes regulatórios, podendo ser analisadas em dois diferentes níveis, mRNA e proteína

A mensuração da liberação de citocinas e do óxido nítrico nos sobrenadantes celulares é essencialmente uma medida cumulativa e, a menos que os tempos das análises sejam escolhidos com cuidado, não gerará informações de como as células estão respondendo a vários estímulos e como a cascata de eventos está progredindo. Geralmente, a taxa de produção de citocinas neste tipo de ensaio é maior do que a taxa de degradação (pela ligação com o receptor e por proteólise não

específica) e, assim, dessa forma a medida representará somente a soma dos efeitos cumulativos. Sabendo-se que as respostas imunes envolvem uma seqüência de eventos, podemos não identificar alterações cruciais na expressão gênica e conseqüentemente os eventos cruciais para a manifestação imunotóxica. Com isso, a medida de citocinas no sobrenadante celular nem sempre gera a imagem completa da realidade celular (ALLEN et al., 2007). A ativação de genes pode ser monitorada usando RT-PCR, que é baseada na transcrição reversa do RNA e amplificação a níveis detectáveis de cDNA por PCR. A maioria das espécies de mRNA são de vida curta, existindo somente para transportar informação do núcleo ao citoplasma e posteriormente ser rapidamente degradada por ribonucleases endógenas.

Desta forma análises baseadas no mRNA permitem detalhar com precisão o comportamento das células em determinado momento, frente a vários estímulos externos. Com isso o método RT-PCR foi escolhido para a determinação da ativação privilegiando a resposta baseada na ativação de genes específicos pela interação com receptores de macrófagos, evento que é considerado precoce. A RT-PCR é altamente sensível e permite a detecção de citocinas que são expressas em baixos níveis e também em poucas quantidades de células. Sobre o custo, uma reação de RT-PCR completa (extração de RNA, reação de transcrição reversa, PCR e eletroforese) pode custar muito menos que uma reação de ELISA, devido ao alto preço de alguns anticorpos comerciais. Esta redução de custos se enquadra nos requisitos desejáveis para um método de triagem de compostos bioativos (VANDEBRIEL; VAN LOVEREN; MEREDITH, 1998).

Os macrófagos foram ativados com 1 µg/ml de LPS, por 24 horas nos experimentos em que o objetivo era a padronização da técnica de RT-PCR; e por 6 horas para experimentos de determinação da ativação (GORDON, 2007). Esta endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo, LPS) é um glicolípido complexo composto por uma porção polissacarídica hidrofílica em um domínio hidrofóbico conhecido como Lipídio A. O LPS é principal componente da parede celular de bactérias Gram-negativas e um dos mais potentes ativadores de macrófagos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-12. Os macrófagos também secretam, em resposta ao LPS, uma grande variedade de outros mediadores incluindo

radicais livres como o óxido nítrico. Por estas razões o LPS foi escolhido como padrão para realização dos ensaios (GORDON, 2007).

Para a extração do RNA, utilizou-se o reagente Trizol (Invitrogen) que é uma metodologia rápida, prática e com um bom rendimento e qualidade de RNA total. A fim de evitar a contaminação com DNA genômico do RNA extraído, o que poderia interferir na análise causando um falso positivo, durante a reação de transcrição reversa foi incluído um tubo contendo todos os reagentes da RT-PCR, exceto a enzima transcriptase reversa. A presença de produto de amplificação neste tubo é indicativa de DNA contaminante na amostra, fazendo-se necessário um tratamento com DNase. Nenhuma das amostras demonstrou contaminação com DNA genômico.

5.3.1 Seleção, desenho e sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR

Tratando-se de ativação de macrófagos, alguns marcadores são tradicionalmente escolhidos, como é o caso do TNF- α e a iNOS, ambos marcadores que são evidentes na ativação clássica, com produção modesta de IL-10. Essa é produzida em altos níveis para suprimir a resposta imune na ativação regulatória, e neste tipo de ativação não há produção de TNF- α (MOSSER; EDWARDS, 2008). A β -actina é expressa constitutivamente e, portanto, pode ser utilizada como referência de comparação, além de também servir como indicativo da viabilidade celular. Os iniciadores desenhados para a IL-12 não funcionaram (dados não mostrados).

A sequência de nucleotídeos obtida foi submetida à avaliação pelo método do algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), de acordo com Altschul (ALTSCHUL et al., 1990). A análise mostrou baixa similaridade com outros genes, o que gerará um único produto de amplificação do genoma molde, com grande homologia com genes humanos, portanto podendo ser utilizada para linhagens de células murinas e humanas.

5.3.2 Reação de transcrição reversa

5.3.2.1 Seleção dos iniciadores para a transcrição reversa

Os iniciadores usados na transcrição reversa podem influenciar nos resultados. Iniciadores randômicos amplificam a maioria dos RNAs (incluindo mRNA, tRNA e rRNA), enquanto que o Oligo dT preferencialmente amplifica mRNA (HEMBRUFF; VILLENEUVE; PARISENTI, 2005). Para a construção do cDNA foram testados iniciadores específicos, randômicos e Oligo dT, em células RAW 264.7 ativadas. Observa-se na Figura 3 que os iniciadores Oligo dT e os randômicos apresentaram resultados muito semelhantes para TNF- α , IL-10 e iNOS. Sendo assim, optou-se por utilizar nos experimentos seguintes somente o iniciador Oligo dT por este ser específico para mRNA.

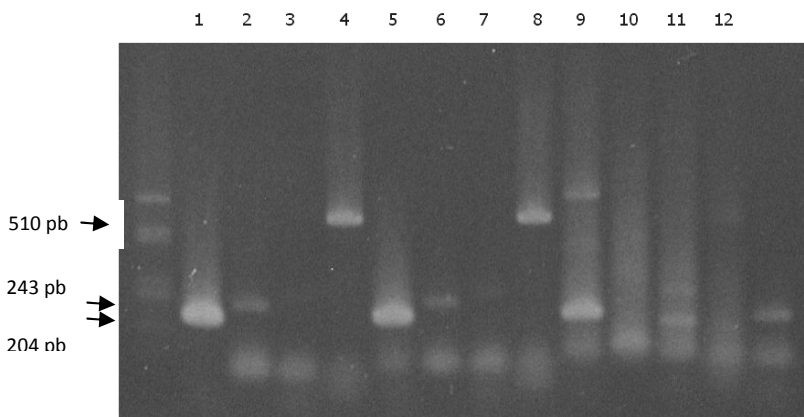


Figura 3: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores TNF- α , IL-10, IL-12 e iNOS. Linha 1= oligo dT (TNF- α), 2= oligo dT (IL-10), 3= oligo dT (IL-12), 4= oligo dT (iNOS), 5= iniciador randômico (TNF- α), 6= iniciador randômico (IL-10), 7= iniciador randômico (IL-12), 8= iniciador randômico (iNOS), 9= iniciador específico (TNF- α), 10= iniciador específico (IL-10), 11= iniciador específico (IL-12), 12= iniciador específico (iNOS).

5.3.2.2 Seleção da quantidade de RNA a ser transcrita

Na RT-PCR, o aumento exponencial do número de cópias ocorre até um determinado número de ciclos, e esta saturação tem relação inversamente proporcional com a concentração do cDNA molde; ou seja, quanto maior a sua concentração no tubo de PCR, menos ciclos serão necessários para que ocorra saturação (CONNOLLY; CLELAND; KIRKHAM, 1995). Nesse raciocínio, tentou-se reduzir a concentração da seqüência molde de DNA a fim de discriminar produtos amplificados de uma expressão celular basal dos produtos amplificados de um incremento na taxa de expressão gênica causada por um evento de ativação, em uma RT-PCR de 30 ciclos. A redução da seqüência molde pode ser feita pela redução da concentração do RNA total utilizado na reação de transcrição, e também através da diluição do produto da transcrição (cDNA).

Na figura 4, observa-se que nas colunas 1 e 2 para TNF- α , quando a reação de transcrição foi realizada com apenas 10 ng de RNA total (quantificados em espectrofotômetro), existe diferença nos produtos de PCR entre os controles positivo e celular; o que não ocorre quando a transcrição é feita a partir de 100 ng de RNA total, com bandas tanto no controle positivo quanto no controle celular (figura 5, coluna 9 e 12). Para o marcador iNOS, observa-se que existe distinção quanto a transcrição é feita a partir de 10 ng (figura 4, colunas 7 e 8) e quando é feita com 100 ng (figura 5, colunas 11 e 14). Não se observam produtos de amplificação para os marcadores IL-10 e IL-12. Este experimento demonstram que uma redução da seqüência molde foi eficiente na discriminação basal dos marcadores em relação à expressão após uma ativação; no entanto, visando uma maior confiabilidade nos resultados optou-se por fazer a transcrição de 1 μ g de RNA total e diluir o cDNA (as condições de reação são descritas em Materiais e Métodos).

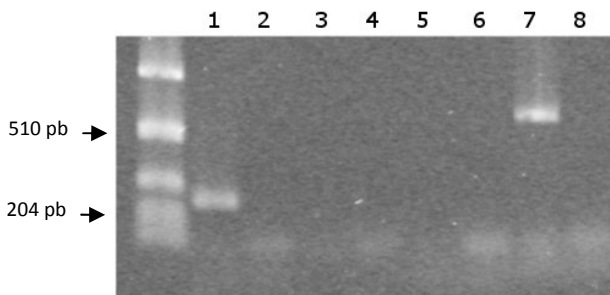


Figura 4: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores TNF- α , IL-10, IL-12 e iNOS de RT-PCR com transcrição de 10 ng de RNA total. Linha 1= controle positivo (TNF- α), 2= controle celular (TNF- α), 3= controle positivo (IL-10), 4= controle celular (IL-10), 5= controle positivo (IL-12), 6= Controle celular (IL-12), 7= controle positivo (iNOS), 8= controle celular (iNOS)

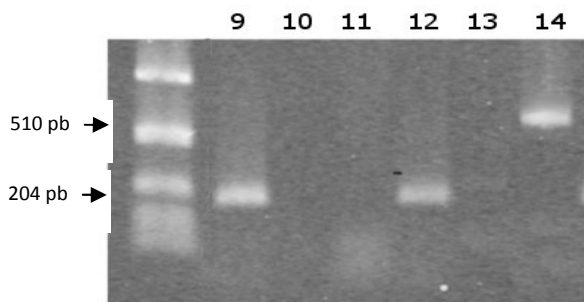


Figura 5: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores TNF- α , IL-10 e iNOS de RT-PCR com transcrição de 100 ng de RNA total. Linha 9= controle celular (TNF- α), 10 = controle celular (IL-10), 11= controle celular (iNOS), 12= controle positivo (TNF- α), 13= controle positivo (IL-10), 14= controle positivo (iNOS)

5.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

5.3.3.1 Determinação da temperatura ideal de anelamento

Para que ocorra a hibridização dos iniciadores nos seus sítios complementares do cDNA molde, é fundamental que esta ocorra em temperatura adequada, sendo esta a principal variável na padronização de ciclos de RT-PCR. Apesar da possibilidade de determinação da temperatura de anelamento ideal através de equações, que nem sempre são confiáveis, é preciso determinar empiricamente a temperatura de anelamento ideal (FARRELL, 2005).

Para isso foi programado no termociclador um gradiente de temperatura, com variações de 51,9°C a 66,5°C, quando foram testadas seis temperaturas diferentes nesta faixa. Os ciclos foram definidos nas seguintes condições: 94°C por 4 minutos para a desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, gradiente de 51,9°C a 66,5°C na etapa de anelamento por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; seguido de um ciclo extra de extensão por 5 minutos a 72°C.

Conforme a figuras 6, 7 e 8, a melhor temperatura de anelamento selecionada para o marcador TNF- α foi de 66,5°C, para IL-10 foi de 60,4°C e para iNOS foi de 54,2°C; respectivamente.

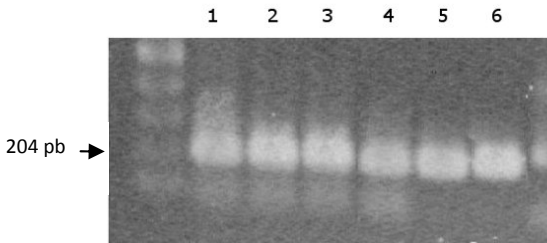


Figura 6: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α em diferentes temperaturas de anelamento. Linha 1 = 51,9 °C, 2= 54,2 °C, 3= 58,0 °C, 4= 60,4 °C, 5=64,8 °C, 6= 66,5 °C.

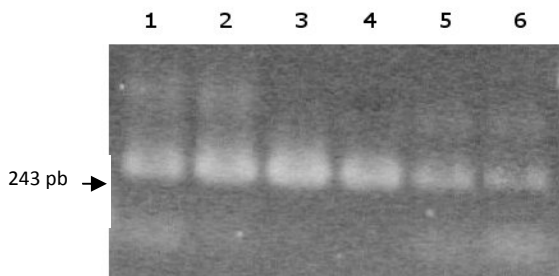


Figura 7: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-10 em diferentes temperaturas de anelamento. Linha 1 = 51,9 °C, 2= 54,2 °C, 3= 58,0 °C, 4= 60,4 °C, 5=64,8 °C, 6= 66,5 °C.

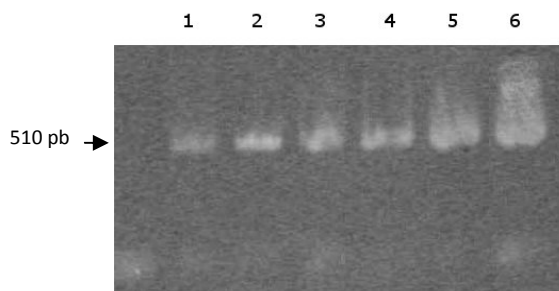


Figura 8: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS em diferentes temperaturas de anelamento. Linha 1 = 51,9 °C, 2= 54,2 °C, 3= 58,0 °C, 4= 60,4 °C, 5=64,8 °C, 6= 66,5 °C.

5.3.3.2 Padronização das concentrações dos iniciadores específicos

A concentração dos iniciadores na faixa compreendida entre 0,1 a 0,5 mM são, geralmente, satisfatórios. Concentrações maiores podem

promover erros de hibridização (*mispriming*) e acúmulo de produtos não específicos e podem aumentar a probabilidade de gerar um artefato independente do DNA molde, denominado de dímeros de iniciadores (*primer-dimer*). Produtos não específicos e dimerização de iniciadores são por si só substratos para o PCR e competem com o produto desejado pela enzima, dNTPs, e os iniciadores, resultando em baixo rendimento do produto (FARRELL, 2005). Para o experimento, adicionou se os iniciadores específicos (TNF- α , IL-10 e iNOS) nas concentrações de 100 nM, 250 nM e 500 nM na reação de RT-PCR, a partir de um controle positivo da linhagem RAW 264.7 ativado com 1 μ g/ml de LPS por 24 horas. Observa-se na figura 9, 10 e 11 que praticamente não há diferenças entre as amostras testadas, e por isso optou-se por utilizar a concentração mais baixa (100 nM de cada iniciador) nas reações posteriores.

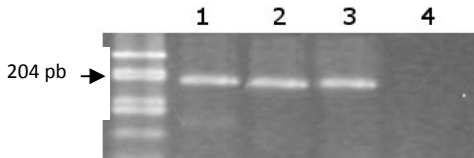


Figura 9: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α em diferentes concentrações de iniciadores específicos. Linha 1= 0,5 mM, 2= 0,25 M, 3= 0,1 mM, 4= controle negativo PCR.

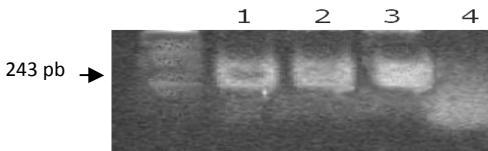


Figura 10: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-10 em diferentes concentrações de iniciadores específicos. Linha 1= 0,5 mM, 2= 0,25 M, 3= 0,1 mM, 4= controle negativo PCR.

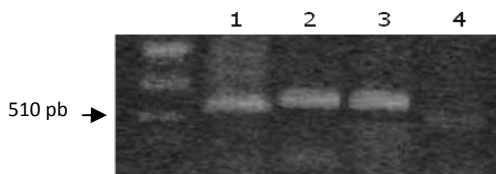


Figura 11: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS em diferentes concentrações de iniciadores específicos. Linha 1= 0,5 mM, 2= 0,25 M, 3= 0,1 mM, 4= controle negativo PCR.

5.3.3.3 Padronização da melhor diluição de cDNA

Conforme discutido no item 5.3.2.2, a concentração inicial do molde é um fator importante para o sucesso da técnica, influenciando diretamente no rendimento dos produtos amplificados (MÜLHARDT; BEESE, 2007). Com o objetivo de avaliar a quantidade mínima de cDNA, na qual a RT-PCR a partir de células ativadas com 500 ng/ml de LPS e células do controle celular (sem LPS) eram capazes de detectar, foram feitas diluições seriadas no fator 1:10 do cDNA construído com 1 µg de RNA total. Conhecendo estes limites de detecção foi possível determinar uma diluição de cDNA em que é possível visualizar os produtos de amplificação do controle ou amostra positiva e não do controle celular, visto que esse geralmente expressa uma quantidade basal dos marcadores selecionados. Para cada amostra estudada, considerou-se o limite de detecção como sendo a maior diluição que ainda resultou em um fragmento de DNA visível no gel de agarose correspondente ao peso molecular do produto amplificado específico. Como se observa na figura 12, o limite de detecção para os controles celulares foi de 1:10 para TNF- α (coluna 2), indicando uma expressão basal do marcador; e 1:1000 para o controle positivo (coluna 10). Para o marcador iNOS (figura 13), os limites de detecção também encontraram-se em 1:10 para o controle celular (coluna 2) e 1:1000 para o controle positivo (coluna 10).

Não observou-se diferença entre os controles celulares e positivos para o gene constitutivo β -actina, e conforme observa-se na figura 14, o limite de detecção foi 1:10000. Em razão da alta sensibilidade e especificidade do método, o sucesso deste depende da qualidade e da concentração do cDNA utilizado. Dessa forma, usando-se a diluição 1:100 conseguiu-se eliminar produtos de amplificação gerados por uma expressão basal dos marcadores, o que seria um falso positivo, daqueles gerados pelo incremento nas taxas de amplificação dos mesmos.

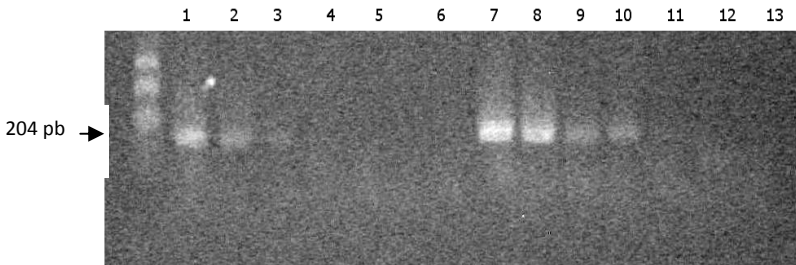


Figura 12: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α em diferentes concentrações de cDNA, em diluição seriada na razão 1:2. Linha 1= cDNA sem diluição, controle celular, 2= diluição 1:10, controle celular, 3= diluição 1:100, controle celular, 4= diluição 1:1000, controle celular, 5= diluição 1:10000, controle celular, 6= controle negativo PCR, 7= cDNA sem diluição, controle celular, 8= diluição 1:10, controle celular, 9= diluição 1:100, controle celular, 10= diluição 1:1000, controle celular, 11= diluição 1:10000, controle celular, 12= controle negativo PCR , 13= controle negativo RT

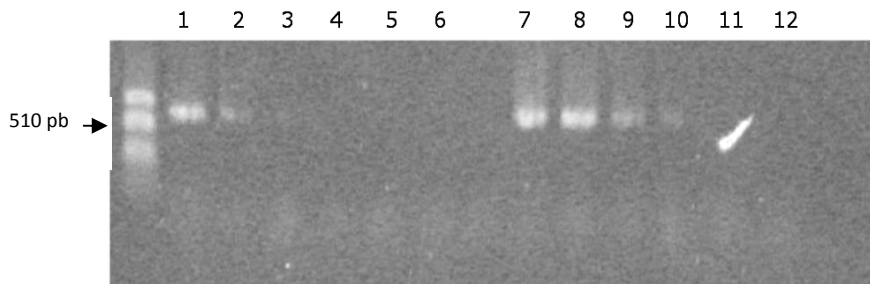


Figura 13: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS em diferentes concentrações de cDNA, em diluição seriada na razão 1:2. Linha 1= cDNA sem diluição, controle celular, 2= diluição 1:10, controle celular, 3= diluição 1:100, controle celular, 4= diluição 1:1000, controle celular, 5= diluição 1:10000, controle celular, 6= controle negativo PCR, 7= cDNA sem diluição, controle celular, 8= diluição 1:10, controle celular, 9= diluição 1:100, controle celular, 10= diluição 1:1000, controle celular, 11= diluição 1:10000, controle celular, 12= controle negativo PCR

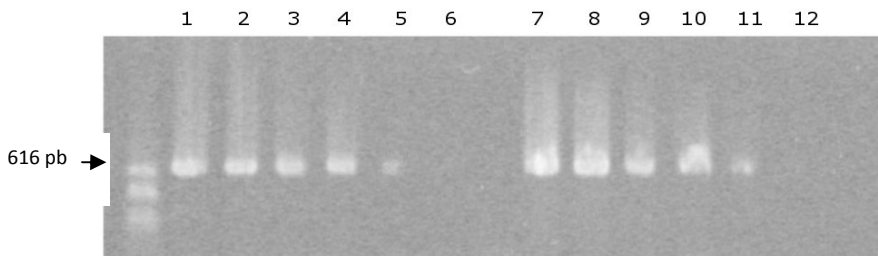


Figura 14: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do gene constitutivo β -actina em diferentes concentrações de cDNA, em diluição seriada na razão 1:2. Linha 1= cDNA sem diluição, controle celular, 2= diluição 1:10, controle celular, 3= diluição 1:100, controle celular, 4= diluição 1:1000, controle celular, 5= diluição 1:10000, controle celular, 6= controle negativo PCR, 7= cDNA sem diluição, controle celular, 8= diluição 1:10, controle celular, 9= diluição 1:100, controle celular, 10= diluição 1:1000, controle celular, 11= diluição 1:10000, controle celular, 12= controle negativo PCR.

5.4 Otimização das condições de ativação de macrófagos

5.4.1 Seleção da linhagem celular mais adequada

Para o desenvolvimento dos ensaios, é importante que a linhagem celular selecionada como modelo seja responsiva aos estímulos, tenha comparabilidade com outras pesquisas, e esteja em boas condições de cultura. A maior parte dos modelos de ativação para macrófagos se baseia em células isoladas da cavidade peritoneal de camundongos e em linhagens da cultura RAW 264.7 (NAURECKIENE et al., 2007). Por considerações éticas, optou-se por desenvolver os experimentos utilizando linhagens celulares. A linhagem de macrófagos RAW 264.7 possui muitas das propriedades dos macrófagos normais (FONG et al., 2007) e é derivada de tumores induzidos pelo vírus murino Abelson, que causa leucemia em camundongos BALB/c, e que retém certas características de isolados primários de macrófagos peritoneais (MEI-JEN et al., 2006). Foi demonstrado que a linhagem RAW 264.7 é a que melhor mimetiza macrófagos derivados de medula óssea, com relação aos receptores de superfície e resposta a ligantes microbianos que iniciam a ativação via receptores Toll-like 3 e 4 (BERGHAUS et al., 2009). Entretanto, devem ser tomadas precauções na extrapolação de resultados obtidos com RAW 264.7, pois pode haver mudanças no fenótipo e na função das células em cultura contínua (BERGHAUS et al., 2009).

Além da linhagem RAW, foram testadas as linhagens J774.A1, que é uma linhagem de macrófagos de camundongos BALB/c (ATCC # TIB-67); J774.16, que é uma linhagem de origem murina (BALB/c, haplótipo H-2^d) derivada de sarcoma reticular; THP-1 (ATCC TIB-202), que é uma linhagem humana com morfologia de pró-monócito, derivada de leucemia monocítica aguda. As células foram ativadas com 1 µg/ml de LPS, por 24h (controle positivo) e comparadas com um controle celular (células sem tratamento), conforme descrito anteriormente. Baseados em dados obtidos por RT-PCR (dados não mostrados), pela observação de células e por dados da literatura (MEI-JEN et al., 2006; NAURECKIENE et al., 2007; BERGHAUS et al., 2009) optou-se por utilizar a linhagem RAW 264.7 como modelo. Os dados obtidos com as

linhagens J774.A1, J774.16, MH-S e THP-1 indicam provável contaminação microbiana e ativação inespecífica.

5.4.2 Cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7

Scarfi et al. (2009) relataram que a transcrição de TNF- α em RAW 264.7 foi significativamente induzida em tempos de 30 minutos e 3 horas após a exposição de um ativador; enquanto que os níveis de mRNA retornaram à valores basais sem estimulação após 24 horas. Kota et al. (2006) encontraram, para a iNOS, o tempo de estimulação máxima em 4 horas, com conseqüente decréscimo até 24 horas.

O término dos bioensaios é importante para o sucesso do estudo, pois quanto maior o tempo, mais problemas inerentes às técnicas podem acontecer. Geralmente, quanto maior o tempo do bioensaio, maior a variabilidade. Além disso, há a possibilidade de que o sinal a ser avaliado se deve a um receptor alternativo, que quando ativado, leva à mesma resposta fenotípica (interferência ou reatividade cruzada) (SADICK et al., 1999). Espera-se também que um ensaio de triagem que ele não consuma muito tempo. Por estas razões avaliou-se o tempo necessário para estimular os macrófagos a produzirem os marcadores de ativação em questão, com a finalidade de selecionar um tempo final com confiabilidade e segurança.

Para estudos funcionais da linhagem RAW 264.7, procedeu-se estudos sobre a cinética de expressão dos genes referentes aos marcadores de ativação, com o objetivo de determinar qual o melhor tempo para finalizar o ensaio. Para isso, as células foram ativadas com 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, e a avaliação feita nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas. Observa-se na figura 15 que para o TNF- α a linhagem celular responde rápido e com 6 horas já está expressando o gene. Resultados semelhantes foram encontrados por Sun et al. (2005) para TNF- α e iNOS (observado na fig. 16), utilizando a mesma linhagem e a mesma concentração de LPS, nos mesmos tempos de ativação. Para a IL-10, Yanagawa et al. (1999) e Chanteux et al. (2007) encontraram resultados semelhantes, com transcrição de mRNA máxima em 16 horas.

Sendo assim, escolheu-se o tempo de 6 horas para a ativação dos macrófagos, que era então interrompida com a primeira etapa de extração de RNA (adição de Trizol).

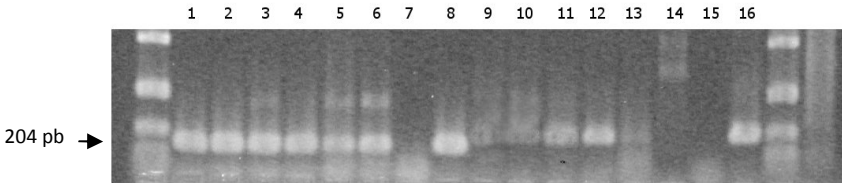


Figura 15: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores TNF- α e IL-10, demonstrando o teste de cinética de ativação com 1 μ g/ml de LPS. Linha 1= controle celular, tempo 0 h, TNF- α , 2= controle positivo, tempo 6h, TNF- α , 3= controle positivo, tempo 12h, TNF- α , 4= controle positivo, tempo 24h, TNF- α , 5= controle positivo, tempo 48h, TNF- α , 6= controle celular, tempo 48h, TNF- α , 7= controle negativo da PCR, TNF- α , 8= controle positivo PCR, TNF- α , 9= controle celular, tempo 0h, IL-10, 10= controle positivo, tempo 6 h, IL-10, 11= controle positivo, tempo 12 h, IL-10, 12= controle positivo, tempo 24 h, IL-10, 13= controle positivo, tempo 48 h, IL-10, 14= controle celular, tempo 48 h, IL-10, 15= controle negativo da PCR, IL-10, 16= controle positivo da PCR, IL-10.

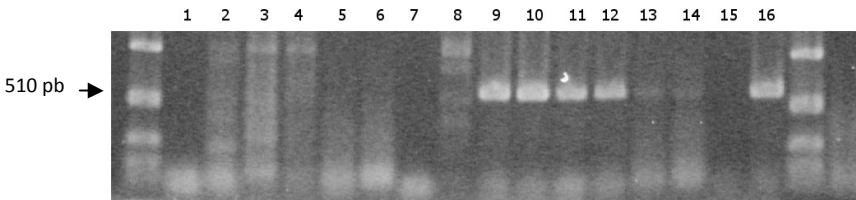


Figura 16: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação dos marcadores IL-12 e iNOS, mostrando o teste de cinética de ativação com 1 μ g/ml de LPS. Linha 1= controle celular, tempo 0 h, IL-12, 2= controle positivo, tempo 6h, IL-12, 3= controle positivo, tempo 12h, IL-12, 4= controle positivo, tempo 24h, IL-12, 5=

controle positivo, tempo 48h, IL-12, 6= controle celular, tempo 48h, IL-12, 7= controle negativo da PCR, IL-12, 8= controle positivo PCR, IL-12, 9= controle celular, tempo 0h, iNOS, 10= controle positivo, tempo 6 h, iNOS, 11= controle positivo, tempo 12 h, iNOS, 12= controle positivo, tempo 24 h, iNOS, 13= controle positivo, tempo 48 h, iNOS, 14= controle celular, tempo 48 h, iNOS, 15= controle negativo da PCR, iNOS, 16= controle positivo da PCR, iNOS.

Na dosagem do óxido nítrico, conforme Figura 17, observa-se que existe um considerável aumento entre os tempos 12 e 24 horas, seguido de um aumento discreto até 48 horas.

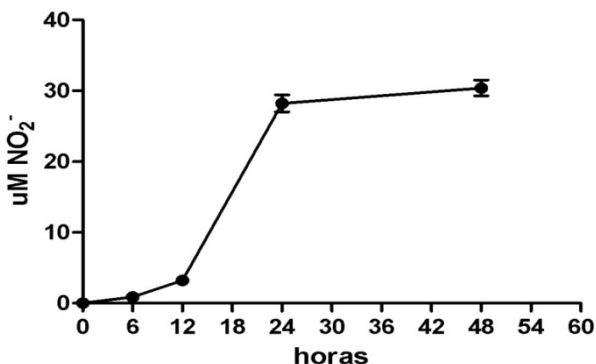


Figura 17: Dosagem de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 incubados em diferentes tempos com LPS (1µg/ml).

5.4.3 Análise Concentração-Resposta de macrófagos ativados por LPS

Para avaliar a sensibilidade analítica dos produtos de estimulação com LPS, foram utilizadas concentrações de 1 µg /ml até 61 pg /ml, por 6 horas para o método RT-PCR e de 190 pg/ml até 10 µg/ml de LPS para o dosagem de óxido nítrico.

No método de RT-PCR, verificou-se que para o marcador TNF- α , os produtos de amplificação puderam ser observados até a concentração de 244 pg/ml de LPS, conforme a coluna 9 da figura 18. Para o marcador iNOS foi de 482 pg/ml, observado na coluna 8 da figura 19. Observou-se, portanto, uma maior sensibilidade da técnica de RT-PCR em relação à dosagem de nitrito no sobrenadante, conforme resultados observados nas figuras 18, 19 e 20. Estes dados obtidos estão de acordo com o encontrado na literatura (NAURECKIENE et al., 2007)

De acordo com Virca et al. (1989) a linhagem RAW 264.7 é sensível às concentrações de LPS (até 10 ng/ml), quando se avalia a expressão de mRNA de TNF- α . Sabe-se que o LPS é capaz de induzir tolerância ou hiporresponsividade aos seus próprios efeitos; quando a linhagem é exposta a baixas concentrações de LPS por mais de 6 horas antes do desafio com uma dose estimulatória (VIRCA et al., 1989) (MAGES; DIETRICH; LANG, 2008). Os valores relativamente elevados encontrados para a linhagem selecionada podem sugerir uma prévia contaminação basal com LPS.

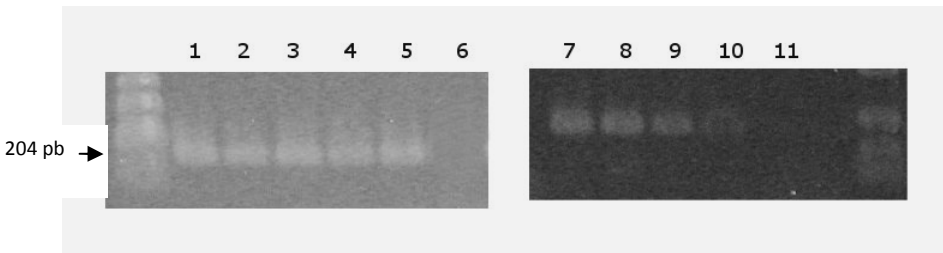


Figura 18: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação da sensibilidade da linhagem RAW 264.7 por LPS em diluição seriada na razão 1:2. Linha 1= 1 µg/ml de LPS, 2= 0,5 µg/ml, 3= 0,25 µg/ml, 4= 0,125 µg/ml, 5= 0,0625 µg/ml, 6= controle celular, 7= 976 pg/ml de LPS, 8= 482 pg/ml, 9= 244 pg/ml, 10= 122 pg/ml, 11= 61 pg/ml.

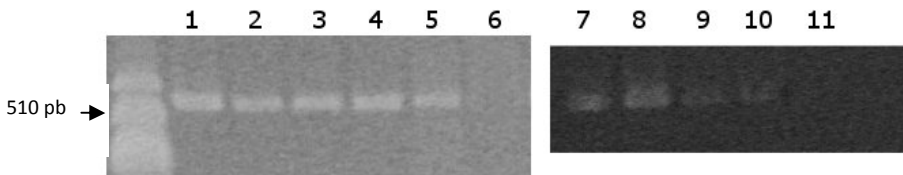


Figura 19: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS, em avaliação da sensibilidade da linhagem RAW 264.7 por LPS em diluição seriada na razão 1:2. Linha 1= 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, 2= 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 3= 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 4= 0,125 $\mu\text{g/ml}$, 5= 0,0625 $\mu\text{g/ml}$, 6= controle celular, 7= 976 pg/ml de LPS, 8= 482 pg/ml, 9= 244 pg/ml, 10= 122 pg/ml, 11= 61 pg/ml.

Abaixo, na figura 20, observa-se a curva de ativação obtida com a linhagem RAW 264.7, ativada durante 48 horas com diferentes concentrações de LPS, a partir de 10 $\mu\text{g/ml}$, em diluições seriadas na razão 2.

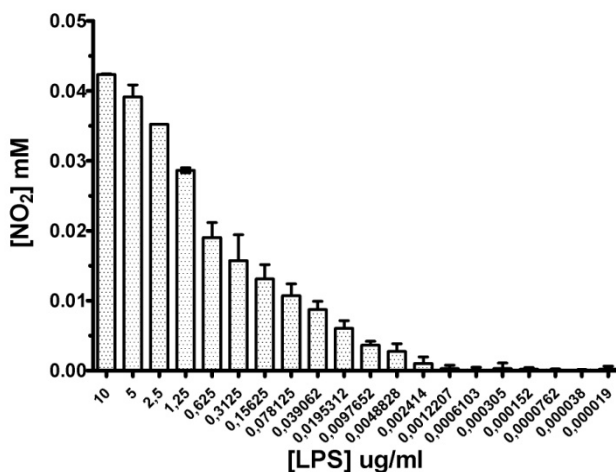


Figura 20: Dosagem de nitrito do sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados durante 48h com diferentes concentrações de LPS.

5.4.4 Inibição da ativação da linhagem RAW 264.7 por Dexametasona

Os glicocorticóides são fármacos antiinflamatórios e imunossuppressores potentes que podem modular a expressão de muitos genes pela ligação a um receptor protéico específico (GR). Em particular, a interação do GR ativado com o fator de transcrição NF- κ B explica a supressão de vários genes pró-inflamatórios (NECELA; CIDLOWSKI, 2004), incluindo os marcadores utilizados no presente estudo.

Os métodos de triagem mais comuns para testar compostos com efeitos antiinflamatórios envolvem o pré-tratamento das células com o composto antes de estimular a resposta inflamatória (KIM; KIM, 2000). Entretanto, alguns modelos utilizam um pré-tratamento com LPS seguido de tratamento com o composto (GUO et al., 2009).

Neste estudo foram comparados os resultados obtidos com duas diferentes estratégias: uma em que os macrófagos foram pré-tratados com dexametasona 10^{-7} M e então estimulados com LPS (1 μ g/ml) e outra em que os macrófagos foram pré-tratados com LPS e então tratados com dexametasona. Os tempos de tratamento foram os seguintes: 1) pré-tratamento com dexametasona por 24 horas, ativação com LPS e coleta do RNA após 6 horas; 2) pré-tratamento com dexametasona por 6 horas, seguida de ativação com LPS e extração de RNA após 6 horas; 3) LPS e dexametasona adicionados simultaneamente, e extração de RNA após 6 horas; 4) ativação com LPS por 5 horas seguida de tratamento com dexametasona por 1 hora, e em seguida a extração de RNA; 5) ativação com LPS por 18 horas, seguida de tratamento com dexametasona por mais 6 horas, e após este tempo a extração de RNA; conforme visualizado na figura 21. . Observa-se nas figuras 22 e 23 que os pré-tratamentos com dexametasona (coluna 1 e 2) não foram suficientes para inibir a expressão dos marcadores, e que os melhores resultados foram encontrados quando a dexametasona foi adicionada 6 horas após a ativação com LPS (coluna 5), e a extração de RNA se deu após 18 horas depois da adição do glicocorticóide.

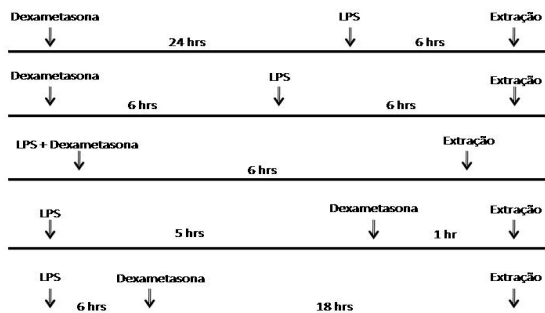


Figura 21: Representação gráfica dos esquemas de tratamento com Dexametasona (10⁻⁷M).

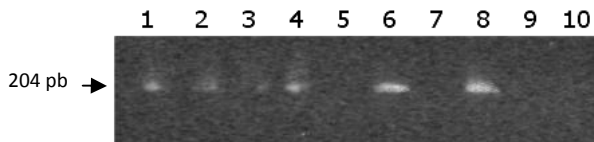


Figura 22: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação do tratamento com Dexametasona (DEX) 10⁻⁷M em diferentes tempos. Linha 1= pré-tratamento com DEX por 24 h, ativação por 6 h com LPS; 2= pré-tratamento com DEX por 6 h, ativação por 6 h; 3= DEX e LPS adicionados simultaneamente, incubação por 6 horas; 4= ativação com LPS por 5 horas antes do tratamento com DEX por mais 1 h; 5= ativação com LPS por 6 horas, seguido de tratamento com DEX por mais 18 horas; 6= ativação com LPS por 6 horas (controle positivo); 7= controle celular em 6 horas; 8= ativação com LPS por 24 horas (controle positivo); 9= controle celular em 24 horas; 10= controle negativo da PCR.

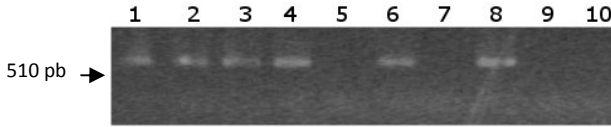


Figura 23: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS, em avaliação do tratamento com Dexametasona (DEX) 10-7M em diferentes tempos. Linha 1= pré-tratamento com DEX por 24 h, ativação por 6 h com LPS; 2= pré-tratamento com DEX por 6 h, ativação por 6 h; 3= DEX e LPS adicionados simultaneamente, incubação por 6 horas; 4= ativação com LPS por 5 horas antes do tratamento com DEX por mais 1 h; 5= ativação com LPS por 6 horas, seguido de tratamento com DEX por mais 18 horas; 6= ativação com LPS por 6 horas (controle positivo); 7= controle celular em 6 horas; 8= ativação com LPS por 24 horas (controle positivo); 9= controle celular em 24 horas; 10= controle negativo da PCR.

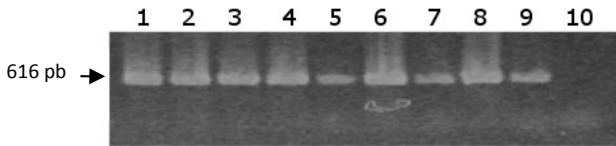


Figura 24: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do gene constitutivo β -actina, em avaliação do tratamento com Dexametasona (DEX) 10-7M em diferentes tempos. Linha 1= pré-tratamento com DEX por 24 h, ativação por 6 h com LPS; 2= pré-tratamento com DEX por 6 h, ativação por 6 h; 3= DEX e LPS adicionados simultaneamente, incubação por 6 horas; 4= ativação com LPS por 5 horas antes do tratamento com DEX por mais 1 h; 5= ativação com LPS por 6 horas, seguido de tratamento com DEX por mais 18 horas; 6= ativação com LPS por 6 horas (controle positivo); 7= controle celular em 6 horas; 8= ativação com LPS por 24 horas (controle positivo); 9= controle celular em 24 horas; 10= controle negativo da PCR.

5.4.5 Inibição do LPS por Polimixina B

A polimixina B, um peptídeo natural, é um potente antibiótico que se liga e neutraliza o LPS. É um antibiótico decapeptídeo catiônico

cíclico que contém grupamentos lipofílicos e hidrofílico que se liga ao lipídio A, a maior porção de LPS, bloqueando a maior parte de seus efeitos biológico *in vitro* e *in vivo*. Neste ensaio, avaliou-se a capacidade da polimixina B em neutralizar os efeitos do LPS, para sua posterior adição nas amostras dos compostos a serem testados (tanto pela RT-PCR quanto para a dosagem de NO), com o objetivo de excluir a possibilidade de eventuais contaminações das amostras. Deve-se ressaltar, entretanto, que outros efeitos da polimixina B sobre macrófagos já foram descritos, como a regulação negativa de proteínas quinases, ligantes de fosfolipídeos cálcio-dependentes, a inibição da expressão gênica de iNOS e a inibição de produção de citocinas, o que pode mascarar eventuais efeitos de ativação mais sutis dos compostos testados (SCHEPETKIN et al., 2008)

Conforme observado na coluna 20 da Figura 25 a maior concentração de LPS inibida por polimixina B foi de 0,0039 $\mu\text{g/ml}$ para a citocina TNF- α . Para o marcador iNOS, foi de 0,0078 $\mu\text{g/ml}$, conforme observado na coluna 19 da Figura 26.

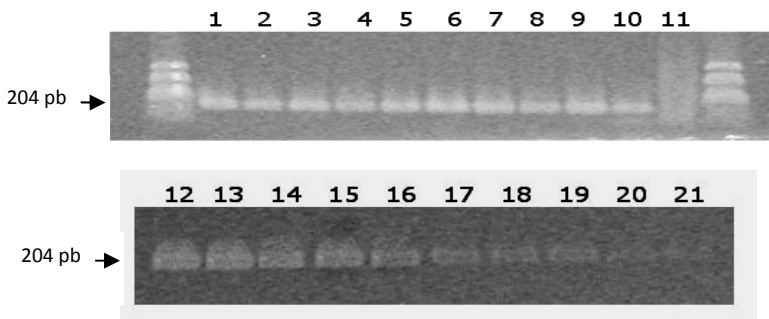


Figura 25: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação do tratamento com Polimixina B (POL B) 50 $\mu\text{g/ml}$ ao LPS em diluição seriada. Linha 1= POL B + 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 2= POL B + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 3= POL B + 0,25 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 4= POL B + 0,125 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 5= POL B + 0,062 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 6= 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 7= 0,5 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 8= 0,25 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 9= 0,125 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 10= 0,062 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 11= controle celular; 12= 0,031 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 13= 0,015 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 14= 0,0078 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 15= 0,0039 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 16= 0,0019 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 17= POL B + 0,031 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 18= POL B + 0,015 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 19= POL B + 0,0078 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 20= POL B + 0,0039 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 21= POL B + 0,0019 $\mu\text{g/ml}$ LPS.

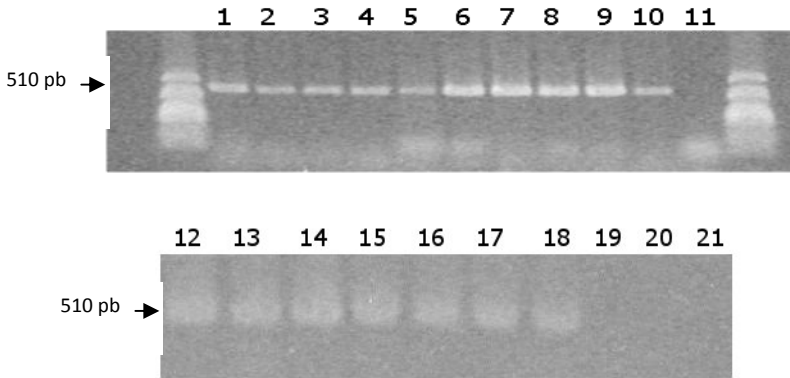


Figura 26: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS, em avaliação do tratamento com Polimixina B (POL B) 50 µg/ml ao LPS em diluição seriada. Linha 1= POL B + 1 µg/ml LPS; 2= POL B + 0,5 µg/ml LPS; 3= POL B + 0,25 µg/ml LPS; 4= POL B + 0,125 µg/ml LPS; 5= POL B + 0,062 µg/ml LPS; 6= 1 µg/ml LPS; 7= 0,5 µg/ml LPS; 8= 0,25 µg/ml LPS; 9= 0,125 µg/ml LPS; 10= 0,062 µg/ml LPS; 11= controle celular; 12= 0,031 µg/ml LPS; 13= 0,015 µg/ml LPS; 14= 0,0078 µg/ml LPS; 15= 0,0039 µg/ml LPS; 16= 0,0019 µg/ml LPS; 17= POL B + 0,031 µg/ml LPS; 18= POL B + 0,015 µg/ml LPS; 19= POL B + 0,0078 µg/ml LPS; 20= POL B + 0,0039 µg/ml LPS; 21= POL B + 0,0019 µg/ml LPS.

De acordo com a Figura 27, nota-se que diferentes concentrações de LPS incubadas previamente com 50 µg/ml de polimixina B tiveram suas ações estimulatórias inibidas totalmente até a concentração de 1,25 µg/ml e parcialmente a partir de 2,5 µg/ml.

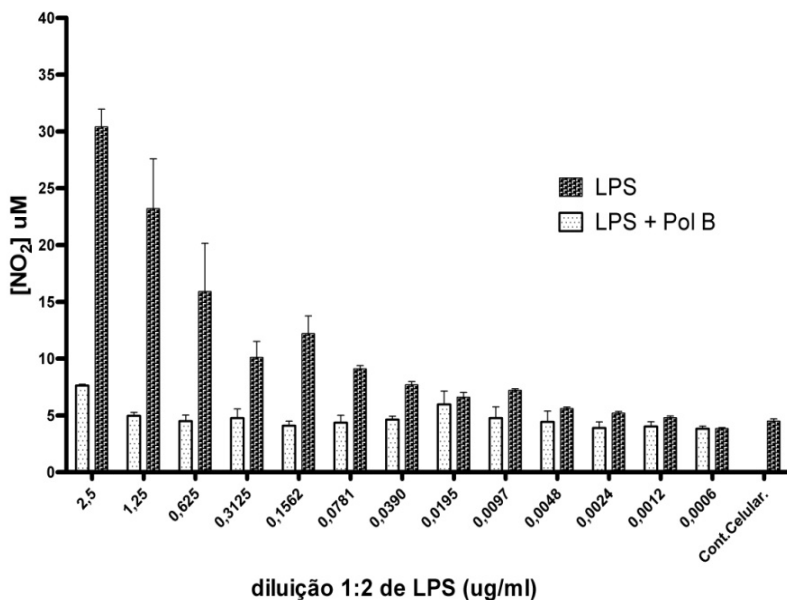


Figura 27: Dosagem de nitrito de sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 incubados por 48 horas com diferentes concentrações de LPS e nas mesmas condições acrescidas de polimixina B (50 µg/ml).

De posse da técnica padronizada de RT-PCR, passou-se à prova de conceito, testando dois grupos de compostos: as frações de polissacarídeos de *Agaricus blazei* (item 5.5) e os galatos (item 5.6).

5.5 Determinação da atividade das frações de polissacarídeos de *Agaricus Blazei*

O cogumelo *Agaricus blazei* (ou *Agaricus brasiliensis*, conhecidos popularmente como “cogumelo do sol”), muito consumido como alimento e remédio, tem chamado a atenção devido à suas propriedades medicinais, sendo usados com o objetivo de prevenir

câncer e doenças cardíacas, melhorar a circulação sanguínea e reduzir o colesterol (WASSER; WEIS, 1999) e para tratar a hepatite crônica (ELLERTSEN et al., 2006). A partir dos corpos de frutificação, cultura pura de micélios e da cultura filtrada, podem ser isolados muitos metabólitos bioativos. Entre os compostos isolados, destacam-se as β -glucanas, que são polissacarídeos de parede celular, e que recebem crédito para a maioria dos efeitos antitumorais (MANTOVANI et al., 2008) e também a atividades imunomoduladoras sobre linfócitos (PASETTI, 2009), macrófagos, células NK e células dendríticas (LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005).

De acordo com a Figura 28, observa-se que todas as 16 frações de polissacarídeos isolados de *Agaricus blazei* estimularam a expressão de TNF- α . Conforme observado na figura 28, apenas as amostras 2, 3, 4, 6, 7, 11, 12 e 15 apresentaram bandas visíveis para a expressão de iNOS; o que pode ser devido à menor concentração de β -glucanas na amostra de polissacarídeo, ou também à diferenças na estrutura, peso molecular e número de ramificações, visto que estes fatores influenciam na atividade biológica (BROWN; GORDON, 2003). Na dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess, as mesmas amostras não demonstraram atividade na mesma concentração (10 μ g/ml de cada amostra) utilizada na RT-PCR (dados não mostrados), e isso se deve à maior sensibilidade do método de RT-PCR.

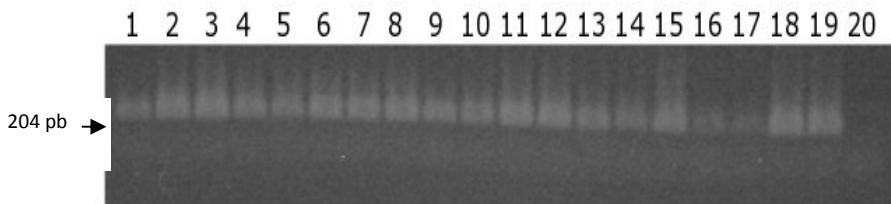


Figura 28: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação da atividade de Polissacarídeos de *Agaricus blazei*, 10 $\mu\text{g/ml}$, estimulados por 6 horas. Linha 1= amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto bruto), 2 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto separado por membrana de microfiltração), 3 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto separado por membrana de ultrafiltração 1), 4 = amostra de polissacarídeo extraídos da frutificação (produto separação por membrana de ultrafiltração 2), 5 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto separado por membrana de nanofiltração), 6 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto bruto), 7 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de microfiltração), 8 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de ultrafiltração 1), 9 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de ultrafiltração 2), 10 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de nanofiltração), 11 = amostra de polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto bruto), 12 = polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de microfiltração) , 13= polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de ultrafiltração 1), 14 = polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de ultrafiltração 2), 15= polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de nanofiltração), 16= controle celular, 17= controle celular, 18= controle positivo (1 $\mu\text{g/ml}$ LPS), 19= controle positivo (1 $\mu\text{g/ml}$ LPS), 20= controle negativo da PCR.

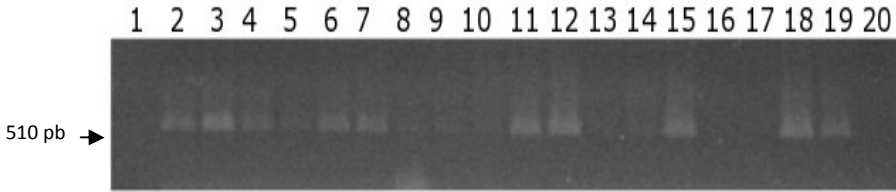


Figura 29: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS, em avaliação da atividade de Polissacarídeos de *Agaricus blazei*, 10 µg/ml, estimulados por 6 horas. Linha 1= amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto bruto), 2 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto separado por membrana de microfiltração), 3 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto separado por membrana de ultrafiltração 1), 4 = amostra de polissacarídeo extraídos da frutificação (produto separação por membrana de ultrafiltração 2), 5 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto separado por membrana de nanofiltração), 6 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto bruto), 7 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de microfiltração), 8 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de ultrafiltração 1), 9 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de ultrafiltração 2), 10 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de nanofiltração), 11 = amostra de polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de microfiltração) , 13= polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de ultrafiltração 1), 14 = polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de ultrafiltração 2), 15= polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de nanofiltração), 16= controle celular, 17= controle celular, 18= controle positivo (1 µg/ml LPS), 19= controle positivo (1 µg/ml LPS), 20= controle negativo da PCR.

5.6 Determinação da atividade de galatos sintéticos em macrófagos

O ácido gálico é um composto fenólico tri-hidroxilado (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), que é obtido pela hidrólise de taninos, e é também um intermediário do metabolismo de plantas. Os n-álquil ésteres do ácido gálico são conhecidos como galatos e são utilizados pela indústria de alimentos e farmacêutica como antioxidantes, melhorando a estabilidade de produtos (GUNCCEL et al., 1998; KUBO et al., 2000). Além disso, estes compostos estão envolvidos em uma grande variedade de ações biológicas, como antioxidante (KLEIN; WEBER, 2001), antifúngica (FUJITA; KUBO, 2002; KUBO; FUJITA; NIHEI, 2002; HSU; CHANG; CHANG, 2007), antibacteriana (BOYD; BEVERIDGE, 1981; KUBO; FUJITA; NIHEI, 2002; STAPLETON et al., 2004; KREANDER; VUORELA; TAMMELA, 2005; SHIBATA et al., 2005), antiviral (KANE et al., 1988; AHN et al., 2002; SAVI et al., 2005; UOZAKI et al., 2007; KRATZ et al., 2008a; KRATZ et al., 2008b) e tripanocida (ALBINO, 2005).

Em estudo de ativação de NF- κ B com os mesmos compostos, Locatelli et al. (2008) demonstraram que o galato de octila foi o único que demonstrou atividade na linhagem linfoblástica L1210. No mesmo estudo, os autores propuseram relações entre a atividade citotóxica a fatores como lipofilicidade e tempo de exposição, conforme também observado neste estudo. Conforme observa-se nas figuras 30 e 31, não foi verificada a expressão de TNF- α e iNOS, nem na citocina IL-10 (dados não mostrados).

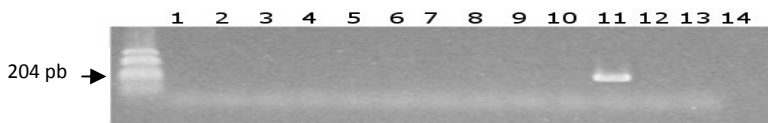


Figura 30: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador TNF- α , em avaliação da atividade de galatos sintéticos. Linha 1= ácido gálico, 2= galato de metila, 3= galato de etila, 4= galato de propila, 5= galato de butila, 6= galato de pentila, 7= galato de hexila, 8= galato de heptila, 9= galato de octila, 10= galato de nonila, 11= controle positivo (1 μ g/ml de LPS), 12= controle celular, 13= controle negativo da PCR, 14= controle negativo da RT.

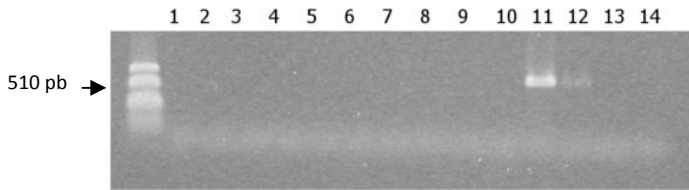


Figura 31: Imagem de Eletroforese em Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo demonstrando os produtos de amplificação do marcador iNOS, em avaliação da atividade de galatos sintéticos. Linha 1= ácido gálico, 2= galato de metila, 3= galato de etila, 4= galato de propila, 5= galato de butila, 6= galato de pentila, 7= galato de hexila, 8= galato de heptila, 9= galato de octila, 10= galato de nonila, 11= controle positivo (1 μ g/ml de LPS), 12= controle celular, 13= controle negativo da PCR, 14= controle negativo da RT.

Assim, de acordo com o método padronizado neste estudo, não demonstrou-se qualquer atividade dos galatos em linhagem de macrófagos.

6 CONCLUSÕES

- Padronizou-se um método *in vitro*, baseado na expressão do mRNA de marcadores de ativação (TNF-alfa, IL-10 e iNOS), que pode ser útil na triagem de compostos com potencial atividade imunomodulatória sobre macrófagos;
- Determinou-se a citotoxicidade (CC₅₀) de uma série de galatos sintéticos e de diferentes amostras de polissacarídeos de *Agaricus blazei* sobre macrófagos da linhagem RAW 264.7;
- Os galatos sintéticos não apresentaram atividade imunoestimulatória em macrófagos, nas condições experimentais empregadas;
- Todas as 15 amostras de polissacarídeos testadas aumentaram a expressão de TNF- α , e 6 dentre as 15 amostras também induziram a expressão de mRNA para iNOS;
- A reação de RT-PCR mostrou-se mais sensível na detecção da ativação de macrófagos em cultura do que o método de dosagem de Óxido nítrico.

7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados encontrados pode-se vislumbrar novos estudos, tais como:

- 1- Bioprospecção de grande número de compostos de origem natural ou sintéticos com potencial atividade imunomodulatória sobre macrófagos;
- 2 – Avaliação da possível atividade imunossupressora dos galatos;
- 3- Aprofundar os estudos sobre as frações polissacarídicas de *Agaricus blazeii* com maior atividade estimulatória sobre macrófagos;
- 3 – Padronizar e implementar novos ensaios *in vitro* que substituam a utilização de animais experimentais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; JANEWAY, C. A., JR. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 129-38, 2000.
- AHN, M. J.; KIM, C. Y.; LEE, J. S.; KIM, T. G.; KIM, S. H.; LEE, C. K.; LEE, B. B.; SHIN, C. G.; HUH, H.; KIM, J. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*. **Planta Med**, v. 68, n. 5, p. 457-9, 2002.
- ALLEN, C. A.; PAYNE, S. L.; HARVILLE, M.; COHEN, N.; RUSSELL, K. E. Validation of quantitative polymerase chain reaction assays for measuring cytokine expression in equine macrophages. **Journal of Immunological Methods**, v. 328, n. 1-2, p. 59-69, 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.
- BERGHAUS, L. J.; MOORE, J. N.; HURLEY, D. J.; VANDENPLAS, M. L.; FORTES, B. P.; WOLFERT, M. A.; BOONS, G.-J. Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. In Press, Corrected Proof, 2009.
- BOYD, L.; BEVERIDGE, E. G. Antimicrobial activity of some alkyl esters of gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) against *Escherichia coli* NCTC 5933 with particular reference to n-propyl gallate. **Microbios**, v. 30, n. 120, p. 73-85, 1981.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, n. 3, p. 311-5, 2003.
- BUDHIA, S.; HARING, L. F.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. A. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. **Journal of Immunological Methods**, v. 309, n. 1-2, p. 160-72, 2006.

CADENAS, S.; CADENAS, A. M. Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 45-63, 2002.

CHIRIGOS, M. A. Immunomodulators: current and future development and application. **Thymus**, v. 19 Suppl 1S7-20, 1992.

CONNOLLY, A. R.; CLELAND, L. G.; KIRKHAM, B. W. Mathematical considerations of competitive polymerase chain reaction. **Journal of Immunological Methods**, v. 187, n. 2, p. 201-11, 1995.

CORDEIRO-DA-SILVA, A.; TAVARES, J.; ARAÚJO, N.; CERQUEIRA, F.; TOMÁS, A.; KONG THOO LIN, P.; OUAISSI, A. Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 4, p. 547-56, 2004.

DELARCHE, C.; CHOLLET-MARTIN, S. Plasma cytokines: what we are measuring. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 2, n. 6, p. 475-9, 1999.

EDWARDS, J. P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K. A.; MOSSER, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 6, p. 1298-307, 2006.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

ELLERTSEN, L. K.; HETLAND, G.; JOHNSON, E.; GRINDE, B. Effect of a medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 133-43, 2006.

FARRELL, J. R. E. 2005. RT-PCR, RNA Methodologies (Third Edition): 439-89. Burlington: Academic Press.

FONG, C. C.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; TZANG, C. H.; FONG, W. F.; WU, R. S.; YANG, M. Dexamethasone protects RAW264.7 macrophages from growth arrest and apoptosis induced by H₂O₂ through alteration of gene expression patterns and inhibition of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) activity. **Toxicology**, v. 236, n. 1-2, p. 16-28, 2007.

FUJITA, K.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **Int J Food Microbiol**, v. 79, n. 3, p. 193-201, 2002.

GERBER, J. S.; MOSSER, D. M. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. **J Immunol**, v. 166, n. 11, p. 6861-8, 2001.

GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Endotoxin: The uninvited guest. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6811-17, 2005.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **Eur J Immunol**, v. 37 Suppl 1S9-17, 2007.

GUNCKEL, S.; SANTANDER, P.; CORDANO, G.; FERREIRA, J.; MUNOZ, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A. Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. **Chem Biol Interact**, v. 114, n. 1-2, p. 45-59, 1998.

GUO, L. Y.; HUNG, T. M.; BAE, K.; JANG, S.; SHIN, E. M.; CHUNG, J. W.; KANG, S. S.; KIM, H. P.; KIM, Y. S. Effects of schisandrin on transcriptional factors in lipopolysaccharide-pretreated macrophages. **Arch Pharm Res**, v. 32, n. 3, p. 399-405, 2009.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HEMBRUFF, S. L.; VILLENEUVE, D. J.; PARISENTI, A. M. The optimization of quantitative reverse transcription PCR for verification of

cDNA microarray data. **Analytical Biochemistry**, v. 345, n. 2, p. 237-49, 2005.

HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytother Res**, v. 14, n. 6, p. 419-23, 2000.

HSU, F. L.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T. Evaluation of antifungal properties of octyl gallate and its synergy with cinnamaldehyde. **Bioresour Technol**, v. 98, n. 4, p. 734-8, 2007.

JANEWAY, C. A., JR. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect**, v. 3, n. 13, p. 1167-71, 2001.

JEANNIN, P.; JAILLON, S.; DELNESTE, Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. **Curr Opin Immunol**, v. 20, n. 5, p. 530-7, 2008.

KANE, C. J.; MENNA, J. H.; SUNG, C. C.; YEH, Y. C. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. **Biosci Rep**, v. 8, n. 1, p. 95-102, 1988.

KENNEDY, D. W.; ABKOWITZ, J. L. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. **Blood**, v. 90, n. 3, p. 986-93, 1997.

KIM, S. J.; KIM, M. S. Inhibitory effects of cimicifugae rhizoma extracts on histamine, bradykinin and COX-2 mediated inflammatory actions. **Phytother Res**, v. 14, n. 8, p. 596-600, 2000.

KIRIKAE, T.; TAMURA, H.; HASHIZUME, M.; KIRIKAE, F.; UEMURA, Y.; TANAKA, S.; YOKOCHI, T.; NAKANO, M. Endotoxin contamination in fetal bovine serum and its influence on tumor necrosis factor production by macrophage-like cells J774.1 cultured in the presence of the serum. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 255-62, 1997.

KLEIN, E.; WEBER, N. In Vitro Test for the Effectiveness of Antioxidants as Inhibitors of Thiyl Radical-Induced Reactions with Unsaturated Fatty Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1224-27, 2001.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 44, n. 2, p. 143-61, 2002.

KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2056-71, 2005.

KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 4, p. 279-89, 2008.

KRATZ, J. M.; ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R.; KOLLING, D. J.; LEAL, P. C.; CIRNE-SANTOS, C. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; TRYBALA, E.; BERGSTROM, T.; FRUGULHETTI, I. C.; BARARDI, C. R.; SIMOES, C. M. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 437-42, 2008a.

KRATZ, J. M.; ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; TRYBALA, E.; BERGSTROM, T.; BARARDI, C. R.; SIMOES, C. M. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 5, p. 903-7, 2008b.

KREANDER, K.; VUORELA, P.; TAMMELA, P. A rapid screening method for detecting active compounds against erythromycin-resistant bacterial strains of Finnish origin. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 50, n. 6, p. 487-93, 2005.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Anti-Salmonella activity of alkyl gallates. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 23, p. 6692-6, 2002.

KUBO, I.; KINST-HORI, I.; KUBO, Y.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T.; HARAGUCHI, H. Molecular design of antibrowning agents. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 4, p. 1393-9, 2000.

LIU, A. H. Innate microbial sensors and their relevance to allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 122, n. 5, p. 846-58; quiz 58-60, 2008.

LIU, Y.; COUSIN, J. M.; HUGHES, J.; VAN DAMME, J.; SECKL, J. R.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I.; SAVILL, J.; ROSSI, A. G. Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. **J Immunol**, v. 162, n. 6, p. 3639-46, 1999.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 581-93, 1997.

LULL, C.; WICHERS, H. J.; SAVELKOUL, H. F. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. **Mediators Inflamm**, v. 2005, n. 2, p. 63-80, 2005.

MAGES, J.; DIETRICH, H.; LANG, R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. **Immunobiology**, v. 212, n. 9-10, p. 723-37, 2008.

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**, v. 25, n. 12, p. 677-86, 2004.

MANTOVANI, M. S.; BELLINI, M. F.; ANGELI, J. P. F.; OLIVEIRA, R. J.; SILVA, A. F.; RIBEIRO, L. R. [beta]-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 154-61, 2008.

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Front Biosci**, v. 13, p. 13453-61, 2008.

MAURYA, M. R.; BENNER, C.; PRADERVAND, S.; GLASS, C.; SUBRAMANIAM, S. Systems biology of macrophages. **Adv Exp Med Biol**, v. 59862-79, 2007.

MEI-JEN, W.; JON-SON, K.; WEN-WEN, L.; HSIN-YI, H.; WU-FU, C.; SHINN-ZONG, L. Translational event mediates differential production of tumor necrosis factor- α in hyaluronan-stimulated microglia and macrophages. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 3, p. 857-71, 2006.

MIRE-SLUIJS, A. R.; THORPE, R. Laboratory protocols for the quantitation of cytokines by bioassay using cytokine responsive cell lines. **J Immunol Methods**, v. 211, n. 1-2, p. 199-210, 1998.

MIZUMOTO, N.; GAO, J.; MATSUSHIMA, H.; OGAWA, Y.; TANAKA, H.; TAKASHIMA, A. Discovery of novel immunostimulants by dendritic-cell-based functional screening. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3082-9, 2005.

MONTERO VEGA, M. T. A new era for innate immunity. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 36, n. 3, p. 164-75, 2008.

MORRISSEY, P. J.; DEREK, L.; CAROLYN, B. 1997. The immune system: A functional perspective, Growth Factors and Cytokines in Health and Disease, Vol. Volume 3, Part 1: 55-125: JAI.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-69, 2008.

MÜLHARDT, C.; BEESE, E. W. 2007. The Polymerase Chain Reaction, Molecular Biology and Genomics: 65-94. Burlington: Academic Press.

MURPHY, P. M.; BITTAR, E. E.; NEVILLE, B. 1996. Chapter 11 Phagocytes in immunity and inflammation, Principles of Medical Biology, Vol. Volume 6: 197-229: Elsevier.

NAURECKIENE, S.; EDRIS, W.; AJIT, S. K.; KATZ, A. H.; SREEKUMAR, K.; ROGERS, K. E.; KENNEDY, J. D.; JONES, P. G.

Use of a murine cell line for identification of human nitric oxide synthase inhibitors. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 55, n. 3, p. 303-13, 2007.

NECELA, B. M.; CIDLOWSKI, J. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. **Proc Am Thorac Soc**, v. 1, n. 3, p. 239-46, 2004.

NEILD, A.; MURATA, T.; ROY, C. R. Processing and major histocompatibility complex class II presentation of Legionella pneumophila antigens by infected macrophages. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2336-43, 2005.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Curr Opin Chem Biol**, v. 6, n. 3, p. 297-305, 2002.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477-87, 2008.

PADOVAN, E.; LANDMANN, R. M.; DE LIBERO, G. How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 7, p. 308-14, 2007.

PAHAN, K.; SHEIKH, F. G.; NAMBOODIRI, A. M.; SINGH, I. N-acetyl cysteine inhibits induction of NO production by endotoxin or cytokine stimulated rat peritoneal macrophages, C6 glial cells and astrocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 24, n. 1, p. 39-48, 1998.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-89, 2001.

PATWARDHAN, B.; GAUTAM, M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 7, p. 495-502, 2005.

PINTO, T. D. J. A. Peróxido de hidrogênio como agente despirogenizante de componentes para produtos médico-hospitalares. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, p. 75-79, 1995.

RAGHAV, S. K.; GUPTA, B.; AGRAWAL, C.; GOSWAMI, K.; DAS, H. R. Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. **J Ethnopharmacol**, v. 104, n. 1-2, p. 234-9, 2006.

REMER, K. A.; REIMER, T.; BRCIC, M.; JUNGI, T. W. Evidence for involvement of peptidoglycan in the triggering of an oxidative burst by *Listeria monocytogenes* in phagocytes. **Clin Exp Immunol**, v. 140, n. 1, p. 73-80, 2005.

RYAN, J. Endotoxins and cell culture. **Corning Life Sciences Technical Bulletin** p.1-8, 2004.

SADICK, M. D.; INTINTOLI, A.; QUARMBY, V.; MCCOY, A.; CANOVA-DAVIS, E.; LING, V. Kinase receptor activation (KIRA): a rapid and accurate alternative to end-point bioassays. **J Pharm Biomed Anal**, v. 19, n. 6, p. 883-91, 1999.

SAVI, L. A.; LEAL, P. C.; VIEIRA, T. O.; ROSSO, R.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R.; SIMOES, C. M. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**, v. 55, n. 1, p. 66-75, 2005.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317-33, 2006.

SCHEPETKIN, I. A.; XIE, G.; KIRPOTINA, L. N.; KLEIN, R. A.; JUTILA, M. A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 10, p. 1455-66, 2008.

SHIBATA, H.; KONDO, K.; KATSUYAMA, R.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 2, p. 549-55, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1235-40, 2002.

SMIT, E.; OBERHOLZER, H. M.; PRETORIUS, E. A review of immunomodulators with reference to Canova®. **Homeopathy**, v. 98, n. 3, p. 169-76, 2009.

STAPLETON, P. D.; SHAH, S.; ANDERSON, J. C.; HARA, Y.; HAMILTON-MILLER, J. M.; TAYLOR, P. W. Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **Int J Antimicrob Agents**, v. 23, n. 5, p. 462-7, 2004.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 4, p. 318-28, 2006.

STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **J Leukoc Biol**, v. 76, n. 3, p. 509-13, 2004.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 23901-44, 2005.

UOZAKI, M.; YAMASAKI, H.; KATSUYAMA, Y.; HIGUCHI, M.; HIGUTI, T.; KOYAMA, A. H. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. **Antiviral Res**, v. 73, n. 2, p. 85-91, 2007.

VANDEBRIEL, R. J.; VAN LOVEREN, H.; MEREDITH, C. Altered cytokine (receptor) mRNA expression as a tool in immunotoxicology. **Toxicology**, v. 130, n. 1, p. 43-67, 1998.

VARIN, A.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 630-41, 2009.

VIRCA, G. D.; KIM, S. Y.; GLASER, K. B.; ULEVITCH, R. J. Lipopolysaccharide induces hyporesponsiveness to its own action in RAW 264.7 cells. **J Biol Chem**, v. 264, n. 36, p. 21951-6, 1989.

WADSWORTH, T. L.; KOOP, D. R. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 8, p. 941-49, 1999.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Crit Rev Immunol**, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999.

WILSON, H. M.; WALBAUM, D.; REES, A. J. Macrophages and the kidney. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 13, n. 3, p. 285-90, 2004.

YAMAMOTO, M.; AKIRA, S. Mechanisms of innate immune responses mediated by Toll-like receptors. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 5, n. 3, p. 167-83, 2005.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 161-78, 2008.

Comentário orelha da capa:

Este estudo apresenta a padronização de um ensaio *in vitro* para a triagem de compostos com potencial atividade imunomodulatória sobre o sistema imune inato. Foi empregada a técnica de biologia molecular RT-PCR para a detecção de expressão de mRNA dos marcadores de ativação TNF- α , IL-10 e iNOS na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. O ensaio relatado neste trabalho permite a triagem simultânea de um grande número de amostras, sem o viés técnico e ético do uso de animais em pesquisa científica.

Site:

<http://www.biotecnologia.ufsc.br/>