

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

Douglas Bardini Silveira

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO *IN VITRO* PARA
TRIAGEM DE COMPOSTOS COM POTENCIAL
ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA SOBRE
LINFÓCITOS B**

Florianópolis

2011

Douglas Bardini Silveira

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO *IN VITRO* PARA TRIAGEM DE
COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE
IMUNOMODULATÓRIA SOBRE LINFÓCITOS B**

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

Área de Concentração: Saúde

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

Florianópolis

2011

S5871p Silveira, Douglas Bardini

Padronização de ensaio in vitro para triagem de compostos com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B [dissertação] / Douglas Bardini Silveira; orientador, Carlos Roberto Zanetti. - Florianópolis, SC, 2011. 78 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Linfócitos B. 3. Imunomodulação. 4. Polissacarídeos. I. Zanetti, Carlos Roberto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

**“Padronização de ensaio in vitro para triagem de compostos com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B” POR
DOUGLAS BARDINI SILVEIRA**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:

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

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. André Luiz Barbosa Báfica
MIP/CCB/UFSC

Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho
FMC/CCB/UFSC

Prof. Dr. Juliano Bordignon
Instituto Carlos Chagas/PR

Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC
Florianópolis, Fevereiro de 2011

*À toda minha família, pelo amor,
apoio e incentivo incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre e acima de tudo.

Aos meus pais, Elemar e Ivanir, por todo amor e incentivo que sempre fizeram-me sentir seguro, mesmo longe.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti - a quem hoje considero um amigo - pela oportunidade, confiança, paciência, incentivo, conselhos e ensinamentos que levarei para toda minha vida.

À minha namorada Maria Luiza, pelo carinho, compreensão e apoio em todos os momentos.

Aos bons amigos e colegas de laboratório Álvaro Celmer, Artur Batisti Neto, Camila Zanluca, Caroline H. Seibert, Elis Amaral Rosa, Fernando Mafalda, Gisele Pasetti, Jonatan Ersching, Luan Aires, Mariana Borsa, Ricardo de Carli da Silva, Silvia Lanza, Tiago Gräf e Yuri Tonello pelo ótimo convívio, amizade, apoio e pelos bons momentos de lazer e descontração vivenciados.

Aos professores Dr. Aguinaldo Pinto e Dr. André Báfica, pela orientação e convivência.

À Prof^ª. Dr^ª. Maristela Martins Carmargo, pela linhagem celular gentilmente cedida.

À Dr^ª. Carla Maísa Camelini pelas amostras de polissacarídeos extraídos de *Agaricus subrufescens* avaliadas neste estudo.

Aos integrantes do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, pelo apoio técnico.

Aos integrantes do Laboratório de Virologia Aplicada, Laboratório de Protozoologia, Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas e Laboratório de Farmacologia Experimental pelo auxílio e disponibilidade à utilização de reagentes e equipamentos.

À Dr^a. Silvia Ferreira, à laboratorista Renata Silva e demais integrantes do Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro de Santa Catarina, pelo apoio técnico e disponibilidade à utilização de reagentes e equipamentos.

À Coordenadoria do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, representada pela Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões, pela orientação e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela infra-estrutura e oportunidade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

“Não importa o quanto você é forte, o mundo o colocará de joelhos e o deixará assim se você permitir. Nem você ou eu, ninguém baterá tão forte quanto a vida. E não importa o quão forte você golpeia, mas sim o quanto você suporta ser golpeado e seguir em frente; o quanto resiste sem desistir. Assim são construídas as vitórias.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

O presente trabalho propôs desenvolver uma metodologia *in vitro* simples, sensível e reprodutível para a prospecção de compostos obtidos de produtos naturais ou seus derivados sintéticos com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B, principal célula efetora da resposta imune humoral, como alternativa ao uso de sistemas experimentais *in vivo*. O planejamento do estudo fundamentou-se na utilização da linhagem linfoblastóide B humana SKW 6.4, imortalizada via EBV, como modelo preditivo *in vitro*; na padronização do método ELISA para a titulação de imunoglobulinas totais secretadas em cultura, empregada como parâmetro inicial de avaliação; e na definição de condições experimentais e padrões comparativos que propiciem a análise do modelo selecionado quanto à modulação de suas funções imunes. O protocolo de cultivo celular e demais variáveis foram determinados para placas de cultura de 96 micropoços. Células SKW 6.4 foram fortemente imunoestimuladas em tratamento com PMA ou LPS nas concentrações ótimas de $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Condições referenciais de imunossupressão foram estabelecidas após ensaio com $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AZA, $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de MPA ou $10\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de RAPA. A secreção de IL-6 pelo modelo *in vitro* foi claramente modulada na presença de LPS e DEX, possibilitando sua dosagem como parâmetro avaliativo adicional de resposta imunológica. A análise de diferentes extratos polissacarídicos de *Agaricus subrufescens* conforme o ensaio padronizado revelou significativa atividade imunoestimulatória sobre células SKW 6.4 para frações com maior peso molecular médio ($\sim 630\text{kDa}$), permitindo especular sobre possíveis rotas de ativação e sugerir um método ótimo de purificação para futura aplicação biotecnológica. Os resultados globais alcançados neste estudo demonstraram a sensibilidade e eficácia do ensaio *in vitro* desenvolvido, viabilizando sua utilização na pesquisa e triagem de compostos com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B como possível método substitutivo ao uso de animais de experimentação.

Palavras-chave: biotecnologia, linfócitos B, imunomodulação, polissacarídeos

ABSTRACT

Standardization of an *in vitro* assay for the screening of compounds with potential immunomodulatory activity on B lymphocytes

The present study aims to develop a simple, sensitive, and reproducible *in vitro* approach for prospecting compounds obtained from natural products and their synthetic derivatives with immunomodulatory activity on B lymphocytes, the main effector cell in the humoral immune response, representing an alternative to *in vivo* experimental systems. The study design was based on the use of the EBV-immortalized human B lymphoblastoid cell line SKW 6.4 as a predictive *in vitro* model, on the standardization of the ELISA method for titrating total secreted immunoglobulins in culture, used as an initial parameter for evaluation, and on the definition of experimental conditions and comparative patterns providing an evaluation of the selected model regarding the modulation of immune functions. The cell culture protocol and other variables were defined for 96 microwells culture plates. SKW 6.4 cells were intensely immunostimulated with PMA or LPS under the optimal concentrations of $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ or $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. Reference patterns of immunosuppression were established after an assay using $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of AZA, $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of MPA, or $10\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of RAPA. IL-6 secretion by the *in vitro* model was clearly modulated in the presence of LPS and DEX, allowing its concentration to be used as an additional parameter for the evaluation of the immune response. The analysis of different polysaccharide extracts from *Agaricus subrufescens* by standardized tests revealed significant immunostimulatory activity on SKW 6.4 cells for fractions of greater mean molecular weight (~ 630 kDa), making it possible to speculate on possible activation routes and to suggest an optimal purification method for future biotechnological application. The overall results achieved in this study demonstrate the sensibility and efficacy of the developed *in vitro* assay, allowing it to be used in research and in screening for compounds with potential immunomodulatory activity on B lymphocytes as a possible replacement method for the use of experimental animals.

Key-words: biotechnology, B lymphocytes, immunomodulation, polysaccharides,

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Expressão de genes virais e marcadores fenotípicos in vivo conforme o tipo de latência do vírus Epstein-Barr.....	08
Figura 1. Representação gráfico de resultados obtidos de diferentes diluições de anticorpos anti-Ig polivalente e anti-Ig polivalente conjugado à peroxidase na padronização de ELISA para titulação de imunoglobulinas totais.....	10
Figura 2. Cinética de produção de imunoglobulinas por células SKW 6.4 ao longo do tempo.....	21
Figura 3. Perfis de secreção de imunoglobulinas totais, proliferação e viabilidade de células SKW 6.4 após tratamento com PMA e LPS.....	22
Figura 4. Perfis de secreção de imunoglobulinas totais, proliferação e viabilidade de células SKW 6.4 após tratamento com AZA, MPA e RAPA.....	27
Figura 5. Perfil de secreção de IL-6 por células SKW 6.4 após tratamento com PMA, LPS e DEX.....	29
Figura 6. Efeito de ASP sobre a produção de imunoglobulinas em células SKW6.....	38
Figura 7. Efeito de ASP-FB na secreção de IL-6 por células SKW 6.4.....	42

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	LINFÓCITOS B.....	19
2.1.1	Ontogenia, ativação e mecanismos de regulação	20
2.2	SISTEMAS EXPERIMENTAIS EM PESQUISA IMUNOLÓGICA.....	25
2.2.1	Cultura de células imunes in vitro	26
2.2.1.1	Imortalização in vitro de Linfócitos B por infecção com EBV.....	26
2.3	PESQUISA DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE COMPOSTOS OBTIDOS DE PRODUTOS NATURAIS.....	29
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	CULTURA CELULAR..... Erro! Indicador não definido.	
4.1.1	Linhagem celular	33
4.1.2	Condições de cultura celular	33
4.1.3	Despirogenização de vidrarias e demais utensílios utilizados	34
4.2	PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IN VITRO PARA TRIAGEM DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO.....	34
4.2.1	Padronização de ensaio ELISA de captura para titulação de imunoglobulinas humanas totais	34
4.2.2	Ensaio de proliferação celular e teste de exclusão por azul de tripan em placas de 96 micropoços	35
4.2.3	Padronização das condições de ativação e supressão de células SKW 6.4 em placas de cultura de 96 micropoços	36
4.2.3.1	Determinação do número de células por poço e tempo e período de incubação.....	36
4.2.3.2	Determinação das concentrações ótimas de imunomoduladores como referências de ativação/supressão de células SKW 6.4.....	37

4.3	DOSAGEM DE IL-6 COMO PARÂMETRO ADICIONAL DE AVALIAÇÃO EM EVENTOS DE IMUNOMODULAÇÃO DE CÉLULAS SKW 6.4.....	38
4.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOESTIMULATÓRIA DE POLISSACARÍDEOS DE <i>Agaricus subrufescens</i> SOBRE LINFÓCITOS B	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	CÉLULAS SKW 6.4 COMO MODELO <i>IN VITRO</i>	41
5.2	PADRONIZAÇÃO DE ELISA DE CAPTURA PARA TITULAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS SECRETADAS POR CÉLULAS SKW 6.4.....	42
5.3	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVAÇÃO E SUPRESSÃO DE CÉLULAS SKW 6.4 EM PLACAS DE CULTURA DE 96 MICROPOÇOS	44
5.4	DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES ÓTIMAS DE IMUNOESTIMULAÇÃO COMO PADRÕES COMPARATIVOS DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS SKW 6.4.....	46
5.5	DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES ÓTIMAS DE IMUNOSSUPRESSORES COMO PADRÕES COMPARATIVOS DE SUPRESSÃO DE CÉLULAS SKW 6.4.....	48
5.6	DOSAGEM DE IL-6 COMO PARÂMETRO AVALIATIVO AO ENSAIO <i>IN VITRO</i> PADRONIZADO	52
5.7	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE POLISSACARÍDEOS DE <i>Agaricus subrufescens</i> SOBRE LINFÓCITOS B	55
5.7.1	Atividade imunoestimulatória de polissacarídeos de <i>A. subrufescens</i> sobre a secreção de imunoglobulinas por células SKW 6.4	55
5.7.2	Análise da secreção de IL-6 induzida por ASP em células SKW 6.4	59
6	CONCLUSÕES	62
7	PERSPECTIVAS	63
	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

O termo “imunidade” é derivado da palavra de origem latina “*immunitas*”, a qual se referia à proteção contra eventuais acusações jurídicas dirigidas a senadores da Roma Antiga durante seus mandatos. Coloquialmente, “imunidade” passou a significar o *status* de proteção e resistência de um indivíduo a determinadas enfermidades, mais especificamente doenças relacionadas a agentes infecciosos. A coleção heterogênea de células e moléculas efetoras responsáveis pela imunidade constitui o sistema imune, e sua ação coordenada contra a introdução de partículas, substâncias ou organismos exógenos é denominada resposta imune.

O sistema imune pode ser didaticamente dividido em dois braços principais: inato e adaptativo. Embora os limites não sejam claramente definidos, dado os diversos mecanismos de ação intrinsecamente relacionados entre os dois sistemas, esta divisão pode ser determinada por fatores como o tempo de resposta e especificidade da reação. A imunidade humoral, uma das ramificações do sistema imune adaptativo, é mediada por macromoléculas solúveis circulantes no sangue e em líquidos teciduais que reconhecem alvos específicos, desencadeando uma série de eventos biológicos decisivos na defesa do hospedeiro. Tais moléculas, denominadas imunoglobulinas ou anticorpos, são secretadas unicamente por um subconjunto de células do sistema imune conhecido como linfócitos B.

O papel dos linfócitos B no sistema imune adaptativo estende-se não somente à produção de anticorpos contra um repertório virtualmente inesgotável de sítios antigênicos, mas também à participação na ativação e regulação de outras linhagens celulares associadas à imunidade humoral. Dessa maneira, estratégias terapêuticas para uma vasta gama de alterações patológicas da resposta imune adaptativa refletem formas de intervenção farmacológica nos processos de proliferação, maturação, diferenciação, ativação e apoptose de linfócitos B.

Grande parte das pesquisas destinadas à descoberta e desenvolvimento de fármacos moduladores da atividade imunológica baseia-se na prospecção de compostos bioativos em sistemas de experimentação animal. A abordagem investigativa *in vivo* constitui-se da extrapolação de uma resposta imunitária desencadeada pela

substância avaliada em modelos animais para a espécie humana; contudo, interações celulares desconhecidas e a diversidade de alvos moleculares espécie-específicos podem adicionar ambigüidade à interpretação dos dados, tornando o valor preditivo destes modelos por vezes questionável. Implicações filosóficas, éticas e técnicas inviabilizam a utilização de modelos animais em ensaios de larga escala necessários ao processo de triagem de produtos naturais – considerados importante fonte de protótipos moleculares imunoativos. A escassez de metodologias alternativas aos modelos *in vivo* correntes representa um entrave na pesquisa e exploração da biodiversidade brasileira, caracterizada pela ampla variedade estrutural e complexidade bioquímica, para produção de novos medicamentos voltados ao tratamento de distúrbios relacionados ao sistema imune.

Assim, o presente trabalho propôs desenvolver e implementar no Laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina um ensaio *in vitro* que permita avaliar de maneira simples, rápida e reprodutível, a atividade imune de linfócitos B frente a um grande número de amostras de compostos de origem natural ou sintética, sem o viés ético e técnico do uso de animais em experimentação científica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LINFÓCITOS B

A função dos linfócitos B – também denominados células B – foi por muito tempo atrelada unicamente à produção de moléculas efetoras da imunidade humoral, os anticorpos ou imunoglobulinas. Esse fato pode ser parcialmente atribuído a fatores históricos, uma vez que o descobrimento das imunoglobulinas não só precedeu à identificação dos linfócitos, mas serviu como o ponto de partida para a intensificação dos esforços direcionados à caracterização das diferentes populações linfocitárias e componentes envolvidos na resposta imune (SAMITAS; LÖTVALL, 2010). Contudo, estudos realizados nas últimas duas décadas têm relatado novos aspectos sobre a funcionalidade dos linfócitos B na atividade imunitária; além de seu papel fundamental na resposta imune humoral, linfócitos B podem atuar como células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells*, APCs), produtoras de grande número de citocinas e secretoras de exossomos (BLANK; SHOENFELD, 2007). Funções recentemente descritas permanecem não totalmente elucidadas, como a participação de um pequeno subconjunto de células B na regulação de mecanismos de inflamação tecido-específicos e a potencial atividade de linfócitos B imunologicamente ativos na modulação da resposta inflamatória mediada por linfócitos T (MIGOZUSHI; BHAN, 2006; SAMITAS; LÖTVALL, 2010; VITALE *et al.*; 2010).

Em consoante, a etiologia de diversos distúrbios clínicos associados ao sistema imune é conferida à desordens proliferativas, auto-reatividade ou deficiências na resposta humoral de células B. GRIMALDI *et al.*, 2005; OLLILA; VIHINEN, 2005; MANJARREZ-ORDUNO *et al.*, 2009). O papel crítico na iniciação e regulação de uma série de condições patológicas aponta os linfócitos B como o principal alvo celular para o estabelecimento de estratégias terapêuticas e desenvolvimento de novos fármacos, como os já utilizados correntemente para depleção ou modulação da atividade imune de determinadas populações de linfócitos B autoreativos ou tumorais (BLANK; SHOENFELD, 2007; SAMITAS *et al.*, 2010).

2.1.1 Ontogenia, ativação e mecanismos de regulação

O estágio inicial do desenvolvimento de linfócitos B a partir de células progenitoras linfóides (*common lymphoid progenitors*, CLPs) ocorre na medula óssea e caracteriza-se pelo rearranjo randômico dos segmentos gênicos $V_H/D_H/J_H$ responsáveis pela síntese de cadeias pesadas de imunoglobulinas. Os primeiros rearranjos ocorrem numa população de CPLs mitoticamente ativa, descritas como células pró-B, assinaladas pela expressão dos antígenos de superfície CD10, CD19 e CD34, bem como de proteínas nucleares responsáveis pela clivagem e recombinação de sequências gênicas específicas: desoxinucleoditil-transferase terminal (*terminal deoxynucleotidyltransferase*, TdT) e os produtos expressos pelos genes de recombinação e ativação (*recombination and activation gene* - RAG) 1 e RAG-2 (OLLILA; VIHINEN, 2005; BLOM; SPITS, 2006; SAMITAS; LÖTVALL, 2010; ABBAS *et al.*, 2010).

A junção combinatória inicial dos segmentos $V_H/D_H/J_H$ permite que a célula sintetize imediatamente cadeias pesadas μ funcionais circulantes no citoplasma. Células pró-B expressam proteínas estruturalmente homólogas as cadeias leves κ e λ , designadas $\lambda 5$ e VpreB, que associam-se a cadeias pesadas μ e a proteínas de transdução de sinal Iga (CD79a) e Igb (CD79b) e são exibidas transitoriamente na membrana de superfície celular (BLOM; SPITS, 2006; VALE; SHROEDER, 2010; ABBAS *et al.*, 2010).

O complexo resultante, denominado pré-BCR (*pre-B cell receptor*) regula os mecanismos de sinalização que desencadeiam o rearranjo V_L/J_L para a geração de genes κ ou λ funcionais. Com efeito, a célula interrompe qualquer rearranjo adicional dos genes de cadeia pesada e cessa a expressão de TdT. Tais eventos celulares marcam a transição de células pró-B para o próximo estágio na ontogenia de linfócitos B, denominado célula pré-B (KONCZ *et al.*, 2002; ABBAS *et al.*, 2010).

Tão logo a recombinação gênica V_L/J_L sintetize proteínas de cadeias leves, estas ligam-se as cadeias pesadas μ presentes para constituir unidades de quatro cadeias transportadas a superfície celular como IgM de membrana. Nesta etapa do desenvolvimento celular, as recombinases RAG-1 e RAG-2 deixam de ser expressas e, conseqüentemente, a célula perde a capacidade de efetuar rearranjos

V_L/J_L adicionais. A capacidade de sintetizar uma proteína IgM completa e sua expressão como antígeno de superfície ou associadas às proteínas Ig α e Ig β , constituindo um receptor antigênico funcional (*B-cell receptor*, BCR), identificam uma célula B como imaturo. A especificidade do BCR recém expresso a antígenos próprios presentes na medula óssea induz o linfócito B imaturo auto-reativo a um novo rearranjo V_L/J_L, através da reativação dos genes RAG-1 e RAG-2, ou a deleção clonal, ocasionada por seleção negativa ou apoptose (BLOM; SPITS, 2006; VALE; SHROEDER, 2010; ABBAS *et al.*, 2010).

Os estágios finais de maturação de linfócitos B ocorrem após a migração de células imaturas da medula óssea para o sangue periférico e baço, onde adquirem moléculas de superfície adicionais. O processamento alternativo de transcritos originados do gene de cadeia pesada rearranjado permite a produção de uma segunda imunoglobulina de membrana, denominada IgD, que embora não desempenhe função definida, incorpora as mesmas cadeias leves e consequente especificidade antigênica da proteína IgM sintetizada. A coexpressão de IgM e IgD de superfície consensualmente caracteriza um linfócito B maduro. Outros antígenos de superfície acessórios são requeridos para a imunocompetência de células maduras, incluindo moléculas de MHC (*major histocompatibility complex*) classe II – responsáveis pela apresentação de antígenos endocitados via ligação com BCR, CD20, CD23, receptores de moléculas do sistema complemento (complement receptor, CR) 1 e 2 (CD21), proteínas de adesão LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen-1*) e ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*), CD22, CD40 e CD45/B220 (BLOM; SPITS, 2006; VALE; SHROEDER, 2010; ABBAS *et al.*, 2010).

Contudo, células individuais da linhagem B podem diferir sobremaneira quanto à origem, sequência de desenvolvimento e expressão de marcadores de superfície, caracterizando populações celulares distintas. O subconjunto de linfócitos B de longa vida denominado linfócitos B-1 são derivados de precursores hematopoiéticos do fígado fetal e encontrados principalmente nas cavidades peritoneal e pleural. Linfócitos B-1 são distinguidos pela expressão de CD5 (Ly-1), apresentam um repertório de especificidades antigênicas relativamente limitado e secretam IgM reativos primariamente contra constituintes não-próprios lipídicos. Os linfócitos B-2, conjunto de células originadas da medula óssea pela via de desenvolvimento descrita, compreendem a maioria dos linfócitos B

maduros capazes de circular entre tecidos e órgãos linfóides adjacentes, além de um pequeno grupo localizado nas proximidades do sino marginal esplênico, designados respectivamente de linfócitos B foliculares e linfócitos B da zona marginal (DONO *et al.*, 2004; ABBAS *et al.*, 2010).

Linfócitos B maduros permanecem inativos até o início dos eventos sinalizadores de ativação celular, mediado pelo reconhecimento antígeno-específico através do BCR. A ligação cruzada de antígenos multivalentes ao BCR específico induz a fosforilação dos motivos de ativação baseados em tirosina (*Immunoreceptortyrosine-based activation motif*, ITAMs) situados no domínio citoplasmático das proteínas acessórias I α e I β , resultante da ação de proteínas tirosina-quinases pertencentes à família Src. Em consequente, os ITAMs fosforilados originam sítios de ligação e ativação para uma segunda ordem de tirosinas-quinases, denominada Syk, desencadeando uma cascata de fosforilação de proteínas adaptadoras que culmina no recrutamento e ativação de diferentes vias de sinalização (KONCZ *et al.*, 2002; HARNETT *et al.*, 2005). A fosforilação da enzima fosfatidilinositol-fosfolipase C isoforma $\gamma 2$ (*phosphatidylinositol phospholipase C*, PKC $\gamma 2$), através das proteínas Syk e Btk (*Bruton's tyrosine-kinase*), permite o aumento da concentração de Ca⁺ e a liberação de diacilglicerol (DAG) em níveis citoplasmáticos, resultando na ativação de algumas isoformas da proteína quinase C (*protein kinase C*, PKC) requeridas para a translocação do fator de transcrição NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) ao núcleo celular. A sinalização por BCR também pode ativar proteínas da família das MAP quinases (*mitogen-activated protein*) via Ras, induzindo a transcrição de componentes do fator de transcrição AP-1 (*activation protein-1*) em linfócitos B (VALE; SHROEDER, 2010). A ativação de uma variedade de fatores de transcrição através de diversas cascatas de sinalização acarreta a expressão de genes diretamente envolvidos nas respostas funcionais observadas em linfócitos B ativados (KUROSAKI *et al.*, 2002; KONCZ *et al.*, 2002; HARNETT *et al.*, 2004; SAMITAS; LÖTVALL, 2010).

A intensidade da resposta de ativação de linfócitos dirigida pelo BCR pode ser sinergicamente modulada através da sinalização do complexo acessório CD19/CR2/CD81. Durante a interação de linfócitos B com antígenos associados ao fragmento C3b do sistema complemento, o receptor de superfície específico CR2 (*complement receptor 2*, CD21) acoplado ao BCR, induz a fosforilação dos resíduos

de tirosina presentes na cauda citoplasmática da molécula CD19 adjacente, conferindo o aumento nos níveis de fosforilação dos ITAMs de Ig α e Ig β pela ação de proteínas da família Src. Moléculas de CD19 fosforiladas também são capazes de ativar a enzima PI-3 quinase (*phosphatidylinositol-3-kinase*), ampliando os sinais de ativação resultantes da fosforilação de Btk e PKC γ 2 (ABBAS *et al.*, 2010).

Em contraponto, a ligação de complexos antígeno-anticorpo ao receptor de membrana específico para a porção Fc de imunoglobulinas do isótipo γ (Fc γ RIIB, CD32) determina o bloqueio dos sinais de ativação provenientes do BCR. A fosforilação de resíduos de tirosina presentes no domínio citoplasmático do Fc γ RIIB (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*, ITIMs) ativa enzimas fosfatases que hidrolizam os precursores lipídicos responsáveis pela mobilização de Ca⁺ intracelular, inibindo as cascatas de sinalização que levam a ativação dos fatores de transcrição nucleares. Da mesma forma, linfócitos B maduros expressam outro receptor inibitório de superfície denominado CD22, uma molécula ligante ao ácido α -2,6-sialílico. O domínio citoplasmático de CD22 conta com ITIMs que, quando fosforilados, associam-se à tirosina fosfatases que catalisam a remoção de fosfatos dos resíduos de tirosina dos ITAMs de Ig α e Ig β , revogando a sinalização mediada por BCR (HARNETT *et al.*, 2004; GRIMALDI *et al.*, 2005; ABBAS *et al.*, 2010).

As conseqüências da ativação deflagrada pelo contato do BCR com seu antígeno cognato dependem da natureza da molécula antigênica e da eventual presença de diferentes sinais co-estimulatórios. Linfócitos B circulantes no tecido linfóide secundário podem ser ativados através de interações celulares com linfócitos T que apresentem especificidade antigênica recíproca. A apresentação de um antígeno protéico complexado à molécula de MHC classe II e o seu reconhecimento pelo TCR (*T cell receptor*) específico precede a interação da molécula de superfície CD40 em linfócitos B com a molécula CD40L (CD154) expressa por linfócitos T auxiliares ativados. A associação CD40/CD40L induz a ativação de proteínas citosólicas denominadas TRAFFs (TNF - *tumor necrose factor - receptor-associated factors*) que levam a ativação e translocação de fatores de transcrição, incluindo NF- κ B e AP-1 (BISHOP; HOSTAGER, 2001; HARNETT *et al.*, 2004; ABBAS *et al.*, 2010; SAMITAS; LÖTVALL, 2010; KRAJ *et al.*, 2010). Com efeito, o linfócito B ativado expressa as moléculas coestimulatórias CD80 (B7.2) e CD86 (B7.1) e é induzido por diferentes citocinas

secretadas por linfócitos T auxiliares ativos, tais como interleucina (IL) 2, IL-4, IL-6 e IFN- γ (*interferon- γ*), a eventos celulares de proliferação, secreção de anticorpos, mudança de isótipo de cadeias pesadas, hipermutações somáticas dos genes de cadeias leves e a diferenciação para células de memória imunológica ou plasmócitos (CHAPEROT *et al.*, 1998; BISHOP; HOSTAGER, 2001; OLLILA; VIHINEN, 2005). A ativação conduzida por linfócitos T pode ser retroativamente regulada pela secreção de citocinas por linfócitos B ativados (BLANK; SHOENFELD, 2007; ABBAS *et al.*, 2010).

Antígenos não-proteicos - como os componentes estruturais lipopolissacarídicos constituintes de parede bacteriana (LPS) - podem induzir diretamente a ativação policlonal de linfócitos B via BCR. Tais antígenos, denominados T-independentes, não podem ser processados e apresentados em moléculas MHC classe II, e portanto não reconhecidos por linfócitos T auxiliares da resposta imune humoral. Em adição, a sinalização por BCR pode ser ampliada através da adesão de antígenos T-independentes complexados ao fragmento C3b do sistema complemento pela interação com receptores CR2, como anteriormente relatado. Sinais de ativação adicionais podem ser desencadeados através do reconhecimento de padrões moleculares de microorganismos potencialmente patogênicos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) através de receptores de superfície ou intracelulares, dentre os quais a família de receptores semelhantes a *Toll* (*Toll-like receptors*), receptores de lectinas (*C-type lectin receptors*, CLR), entre outros (BOOTH *et al.*, 2010). A resposta de secreção de anticorpos contra antígenos T-independentes é primariamente de IgM, embora antígenos capsulares de determinados microorganismos possam induzir a secreção de IgG2 em humanos (ABBAS *et al.*, 2010).

O estágio terminal de diferenciação de linfócitos B ativados por antígenos protéicos ou T-independentes origina células morfológicamente distintas denominadas plasmócitos, caracterizados pela expressão de CD138 (*syndecan-1*) e a ausência de antígenos de superfície presentes em etapas anteriores de maturação, como CD19. Plasmócitos migram de tecidos linfóides secundários para sítios extrafoliculares e podem se estabelecer na medula óssea como plasmócitos secretores de longa vida, mediados pela ação das citocinas denominadas BAFF (*B cell activation factor of the tumor necrosis factor family*) secretadas por células mielóides (BOSSSEN; SCHNEIDER, 2006; KRAJ *et al.*, 2010). Estima-se que plasmócitos

continuem a secretar imunoglobulinas contra antígenos específicos durante meses ou anos, de forma que grande parte dos anticorpos circulantes em um indivíduo adulto é resultado de infecções passadas (ABBAS *et al.*, 2010).

2.2 SISTEMAS EXPERIMENTAIS EM PESQUISA IMUNOLÓGICA

Sistemas experimentais de vários tipos são empregados para esclarecer as interações celulares complexas da reposta imune. Os sistemas *in vivo*, os quais envolvem modelos animais, proporcionam condições experimentais próximas as encontradas naturalmente em um organismo; no entanto, é impossível definir regras gerais para a validade da extrapolação de uma espécie para a outra. Variáveis adicionais inerentes ao modelo utilizado podem frequentemente levar a interpretações de resultados errôneas ou pouco confiáveis. (FAGUNDES; TAHA, 2004; GOLDSBY *et al*, 2008). Ademais, os custos de manutenção e acondicionamento de animais inviabilizam sua utilização em centros ou laboratórios de pesquisa menos estruturados. Restrições técnicas somadas aos aspectos éticos envolvidos no uso de animais de experimentação direcionam pesquisadores a optarem por metodologias de estudo alternativas, como modelos matemáticos e sistemas de experimentação em cultura de células e tecidos (GOLDSBY *et al*, 2008).

Métodos experimentais *in vitro*, nos quais populações celulares definidas são estudadas sob condições controladas e, conseqüentemente, reprodutíveis, constituem uma importante ferramenta de investigação nas diversas áreas da Imunologia. Os sistemas *in vitro* propiciam a simplificação de um fenômeno biológico ao ponto de interações celulares e moleculares poderem ser analisadas individualmente. Contudo, experimentações *in vitro* podem apresentar resultados limitados a um produto de condições específicas, e não necessariamente refletir situações biológicas reais (GOLDSBY *et al*, 2008).

2.2.1 Cultura de células imunes *in vitro*

Culturas primárias de células linfóides compreendem grupos celulares heterogêneos, obtidos diretamente de órgãos linfóides através de dissociação tecidual e acondicionados em meio basal quimicamente definido, em geral suplementado com componentes séricos. A heterogeneidade observada em culturas primárias de linfócitos pode dificultar a análise de resultados experimentais, direcionando pesquisadores ao uso de linhagens de células linfóides clonais ou híbridas (GOLDSBY *et al.*, 2008).

Células normais de mamíferos geralmente possuem tempo finito de sobrevivência em cultura (ABBAS *et al.*, 2010). Entretanto, células tumorais ou fisiologicamente modificadas por carcinógenos químicos ou vírus podem ser propagadas indefinidamente em cultura de tecidos e são denominadas imortais. Tais células apresentam características singênicas e são referidas como linhagens celulares (FAGUNDES; TAHA, 2004). O desenvolvimento de linhagens híbridas secretoras de anticorpos monoclonais resultantes da fusão entre esplenócitos ativos á linhagens de mielomas não-secretoras tem se mostrado uma ferramenta fundamental na pesquisa imunológica, biomédica e em laboratório clínico. Da mesma forma, métodos de transformação celular induzida pela infecção por vírus linfotrópicos (*Abelson's murine leukemia virus* – A-MLV, *simian virus 40* – SV40, *Epstein-Barr virus* – EBV, *humam T-cell leukemia virus type 1* – HTLV-1) são rotineiramente utilizados em laboratório para a imortalização de amostras celulares de interesse (WALL *et al.*, 1995; GOLDSBY *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Imortalização *in vitro* de Linfócitos B por infecção com EBV

O vírus Epstein-Barr, um γ herpesvírus envelopado de DNA dupla fita, está associado á numerosas doenças humanas, destacando-se a mononucleose infecciosa, o linfoma de Burkitt, o linfoma de Hodgkin, o carcinoma nasofaríngeo humano, além de outros distúrbios linfoproliferativos (MANET *et al.*, 1998; WROBLEWSKY *et al.*, 2002; OGHA *et al.*, 2002; KLEIN *et al.*, 2010). Em adição ao seu impacto

clínico, o EBV é empregado em rotina laboratorial na geração de linhagens de linfoblastóides cultiváveis *in vitro* a partir de linfócitos B humanos (*B-lymphoblastoid cell lines* – B-LCLs, HUR *et al.*, 2005; KLEIN *et al.*, 2010). O estabelecimento de B-LCLs em cultura tem servido a uma variedade de propósitos em estudos imunológicos, a citar: utilização como modelos representativos de tumorigênese, latência viral em células humanas e resposta de ativação de linfócitos B T-independente (TAMURA *et al.*, 1993; KAMAWOTO *et al.*, 1998; SAKUMA *et al.*, 2001; OGHA *et al.*, 2002); utilização em pesquisas *in vitro* de linfócitos B de pacientes imunodeficientes (KURIBAYASHI *et al.*, 2008); utilização na propagação de culturas de linfócitos T e células *natural killers* como células fornecedoras de fatores exócrinos (WROBLEWSKY *et al.*, 2002).

O EBV infecta linfócitos B preferencialmente através de ligação e internalização via receptores de moléculas Cd3 do sistema complemento (CR2/CD21). Após os primeiros ciclos replicativos, o genoma viral torna-se latente e estabelece múltiplas cópias episomais junto ao núcleo celular (KLEIN *et al.*, 2010). B-LCLs são induzidas à contínua proliferação através da expressão de produtos gênicos do epissoma latente capazes de mimetizar eventos intracelulares de ativação imune, dentre os quais: 6 antígenos nucleares denominados antígenos nucleares de Epstein-barr (*Epstein-Barr nuclear antigen - EBNA*) 1, 2, 3 (3A), 4 (3B), 5, e 6 (3C), 3 proteínas latentes de membrana (*latente membrane proteins* – LMP 1, 2A e 2B) e 2 pequenas moléculas de RNA não traduzidas - EBER (*EBV-encoded RNA*) 1 e EBER 2 (OGHA *et al.*, 2002; TAKACS *et al.*, 2010; KLEIN *et al.*, 2010). O ciclo lítico viral pode ser restabelecido através da tradução de proteínas codificadas pelo gene precoce imediato BZFL 1 (MANET *et al.*, 1998; OGHA *et al.*, 2002; KUBOTA *et al.*, 2008; KLEIN *et al.*, 2010). Embora a geração espontânea de B-LCLs *in vivo* apresente perfis de expressão de genes virais e marcadores fenotípicos característicos da infecção latente do tipo III (Quadro 1), o mesmo não é observado para B-LCLs cultivadas *in vitro*, de forma que a constituição imunofenotípica e o conjunto de genes latentes expresso pode variar de linhagem para linhagem (WROBLEWSKY *et al.*, 2002; KUBOTA *et al.*, 2008; TAKACS *et al.*, 2010).

B-LCLs em cultura podem secretar espontaneamente IgM e/ou IgG, além de citocinas como interleucina (IL) 6, IL-10, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (*tumoral necrose factor* – TNF- α) e fator de

necrose tumoral beta (*tumoral necrose factor* – TNF- β), em combinações e quantidades variáveis. A produção espontânea de níveis significativos de imunoglobulinas e citocinas está aparentemente correlacionada com a expressão de marcadores imunofenotípicos característicos de estágios avançados de desenvolvimento e maturação de linfócitos B. Esta constatação sugere que a heterogeneidade encontrada entre diferentes B-LCLs é resultado direto do estágio de desenvolvimento celular no momento da transformação e imortalização induzida pelo EBV (WROBLEWSKY *et al.*, 2002).

Latência	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Expressão viral	EBNA 1 EBERs	EBNA 1 EBERs LPM 1 e 2	EBNA 1 à 6 EBERs LPM 1 e 2
Expressão fenotípica celular	CD 10, 77 TAP 1 e 2	CD 23, 80, 86, 40 TAP 1 e 2 LFA 1 e/ou 3 ICAM 1 HLA classe I	CD 23, 80, 86 TAP 1 e 2 LFA 1 e/ou 3 ICAM 1 e/ou 2 HLA classe II
Distúrbios clínicos associados	Linfoma de Burkitt; carcinoma gástrico	Linfoma de Hodgkin; carcinoma nasofaríngeo; linfoma nasal de células T/NK; CAEBV	PTLD; PAL; LCLs; Demais desordens linfoproliferativas oportunistas

Quadro 1: Expressão de genes virais e marcadores fenotípicos *in vivo* conforme o tipo de latência do vírus Epstein-Barr. EBNA, *Epstein-Barr virus nuclear antigen*; EBERs, *Epstein-Barr virus encoded mRNAs*; LMP, *late membrane protein*; TAP, *transporter associated with antigen processing*; LFA, *lymphocyte function-associated antigen*; ICAM, *intercellular adhesion molecule*; HLA, *human leukocyte antigen*; PTLD, *post-transplant lymphoproliferativ disorder*; NK, *natural killers*; CAEBV, *chronic active disorder by Epstein-Barr virus infection*; PAL, *pyothorax-associated lymphoma*. LCLs, *lymphoblastoid cell lines*.

Fonte: adaptado de OGHA *et al.*, 2002.

2.3 PESQUISA DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE COMPOSTOS OBTIDOS DE PRODUTOS NATURAIS

O desenvolvimento de medicamentos antiinflamatórios, imunomodulatórios, antibióticos, antineoplásicos, antivirais, imunossupressores e anticorpos monoclonais tem tido papel fundamental em incursões terapêuticas no tratamento de diversas enfermidades. Nas últimas décadas, avanços importantes em análises de química combinatória e modelagem *in vitro* de sistemas biológicos em larga escala impulsionaram a descoberta de novas moléculas capazes de modificar as respostas fisiológicas de um indivíduo frente as mais diversas condições patológicas (HOUGHTON, 2000; BROCCINI, 2001). Grande parte dos fármacos disponíveis atualmente no mercado derivam de protótipos moleculares obtidos de produtos naturais, dada sua extensa diversidade bioquímica e a possibilidade de alterações estruturais em moléculas isoladas (NIELSEN, 2002; SIMÕES; SCHENKEL, 2002; CALIXTO, 2003). Estratégias de prospecção de substâncias potencialmente bioativas baseiam-se no estudo de extratos brutos obtidos de plantas ou fungos utilizados medicinalmente (PATWARDHAN; GAUTAM, 2005; CHEN; SEAVIOR, 2007). Estes extratos representam 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), além de polissacarídeos constituídos de glucanas não-celulósicas (WASSER, 2002; BROWN *et al*, 2003; VAN *et al*, 2009) A atividade de muitos destes compostos sobre células do sistema imune tem sido demonstrada *in vivo* e *in vitro* (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; CHAVÉZ *et al*, 2005; ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2005; SAVI *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; YOUNES *et al*, 2007).

Embora as células do sistema imune sejam normalmente ativadas por antígenos específicos, existem substâncias que podem modificar a atividade biológica dessas populações celulares inespecificamente (CHIRIGOS, 1992). A modulação da resposta imune através destes compostos, denominados imunomoduladores, é requerida para uma série de distúrbios clínicos. A imunossupressão ou inibição e prevenção integral de respostas imunes é determinante para tratamento

de pacientes transplantados, doenças autoimunes e alergias. Por outro lado, a estimulação do sistema imune é desejável para outras condições como infecções, imunodeficiências e neoplasias. Os imunostimulantes 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).

Os esforços no desenvolvimento de imunoterapias mais eficazes acentuam-se à medida que os medicamentos imunomoduladores tradicionais continuam a exibir sucesso terapêutico limitado e efeitos colaterais indesejáveis (PATWARDHAN; GAUTAM, 2005). A biodiversidade brasileira tem despontado como um importante sítio de prospecção de compostos biologicamente ativos; porém, a carência de técnicas rápidas, sensíveis e reprodutíveis para triagem de grande número de amostras representa um entrave nas pesquisas por novos agentes potencialmente imunomoduladores. (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; SMIT *et al.*, 2009).

As técnicas mais comumente empregadas para avaliação da atividade de células imunes em rotina laboratorial baseiam-se na quantificação de moléculas sinalizadoras, anticorpos ou metabólitos secretados em cultura ou amostra biológica. (DELARCHE; CHOLLET-MARTIN, 1999; EINSENBRAND *et al.*, 2002; VAZ *et al.*, 2007; BLANK; SHOENFELD, 2007). Ensaio colorimétricos direcionados a titulação da atividade mitocondrial ou técnicas de incorporação de radiomarcadores durante a replicação do DNA celular constituem metodologias alternativas para a mensuração da resposta de proliferação e ativação de células imunes *in vitro*. (MOSMANN et al, 1983; CHAVEZ *et al.*, 2005; MACHADO JUNIOR *et al.*, 2006) Recentemente, caracterizações imunofenotípicas através de citometria de fluxo têm sido utilizadas como instrumento de estudo da resposta imunomodulatória de células expostas à ação de diferentes imunomoduladores e extratos de plantas medicinais (MACHADO JUNIOR *et al.*, 2006) A expressão de proteínas e sinalizadores moleculares em eventos de ativação celular na resposta imune 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. (BUDHIA et al., 2006). Contudo, a falta de otimização protocolar, a inadequação e individualização de experimentos conduzidos em sistemas biológicos *in vivo* e *ex vivo* contribuem para a baixa reprodutibilidade e eficiência de metodologias de triagem de compostos

potencialmente inmunomoduladores (DELARCHE; CHOLLET-MARTIN, 1999; FAGUNDES; TAHA, 2004; SMIT *et al*, 2009)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar um ensaio *in vitro* para triagem de substâncias de origem natural e sintética com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a titulação de imunoglobulinas secretadas por células SKW 6.4 em cultura;
- Determinar condições ótimas para estimular/suprimir a secreção de imunoglobulinas por células SKW 6.4 em placas de cultura de 96 micropoços;
- Avaliar a proliferação e viabilidade de células SKW 6.4 em condições de estimulação/supressão através do ensaio de MTT e teste de exclusão por azul de tripan, respectivamente;
- Investigar a secreção de IL-6 por células SKW 6.4 em condições de imunomodulação como parâmetro adicional de avaliação ao ensaio *in vitro* proposto;
- Avaliar, através da metodologia desenvolvida, a potencial atividade imunomodulatória *in vitro* de polissacarídeos obtidos de diferentes extratos do fungo *Agaricus subrufescens* sobre linfócitos B.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA CELULAR

4.1.1 Linhagem celular

A padronização do ensaio proposto empregou como modelo celular *in vitro* a linhagem de linfoblastóides B humanos SKW 6.4 (ATCC TIB-215), imortalizada via EBV, gentilmente cedida pela Dra. Maristela Martins Camargo - Laboratório de Imunorregulação Molecular, Departamento de Imunologia, ICB, USP

4.1.2 Condições de cultura celular

O meio nutriente utilizado baseou-se no descrito por Ralph e colaboradores (1983) para a cultura de células SKW 6.4, com composição suplementar modificada, constituindo-se de: meio RPMI 1640 (Cultilab) adicionado de 20% (V:V) de soro fetal bovino inativado (SFB, Cultilab), 1% (V:V) de solução de 100U/mL penicilina-estreptomicina e 0.125 μ g/mL anfotericina B (PSA, Sigma), 1% (V:V) de solução 2mM de L-glutamina (Sigma) e 1% (V:V) de solução de aminoácidos não-essenciais (Sigma). As células foram repassadas a cada 2-3 dias em alíquotas contendo aproximadamente 5×10^4 células para 10-15mL de meio de cultivo e acondicionadas à temperatura de 37°C e 5% de CO₂ em garrafas de cultura de 10cm³ com filtro (TPP). Para a realização dos experimentos de padronização das condições ideais de ativação/supressão do modelo celular utilizado e demais ensaios de imunomodulação *in vitro*, células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm² com filtro (TPP) 48h antes da distribuição e acondicionamento em placas de cultura de 96 poços.

4.1.3 Despirogenização de vidrarias e demais utensílios utilizados

A fim de evitar a possível ativação celular inespecífica oriunda de contaminação residual por endotoxinas e consequente artefato de técnica, toda a vidraria e utensílios reutilizáveis para cultura celular e realização dos experimentos foram tratados por imersão em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Merck) 30% (V:V) durante 15 minutos, seguida de lavagem em água ultrapurificada por osmose reversa (Milli-Q) e posterior autoclavagem convencional (121°C á 1,2 kgf·cm³ durante 20 minutos), conforme metodologia inicialmente descrita por Pinto (1995) e adaptada por Celmer (2010).

4.2 PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO *IN VITRO* PARA TRIAGEM DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO

4.2.1 Padronização de ensaio imunoenzimático de captura para titulação de imunoglobulinas totais humanas

A padronização da técnica ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) para a titulação de imunoglobulinas secretadas no sobrenadante de culturas das células SKW 6.4 utilizada nesse estudo baseou-se no protocolo descrito por Piza e colaboradores (1999), com as modificações descritas a seguir.

Microplacas de poliestireno para ELISA com 96 poços (Costar) foram sensibilizados com 200µL/poço de anti-Ig humana polivalente (produzida em caprinos, Sigma) diluída em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M pH 9.6, durante 3h à 37° C. Em seguida, a solução de sensibilização foi desprezada e foram adicionados 300 µL/poço de tampão Tris-NaCl com diferentes concentrações de leite desnatado em pó (Molico[®], Nestlé), gelatina em pó (Dr. Oteker) e BSA (*bovine serum albumin*, Sigma) para o bloqueio de ligações inespecíficas, com incubação de 1h à 37°C. Após o descarte da solução de bloqueio, os poços foram lavados 5 vezes com 300µL/poço de solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS)

contendo 0,05% (V:V) de Tween 20 (Nuclear). O mesmo procedimento de lavagem foi repetido entre todas as próximas etapas do protocolo.

As microplacas foram incubadas em seguida com a adição de 100 μ L/poço de sobrenadantes de culturas da linhagem SKW 6.4 durante 1h à 37°C. Após lavagens, 100 μ L de anti-Ig humana polivalente conjugada com peroxidase (produzida em logomorfos, Sigma) diluídos em PBS contendo 0,05% (V:V) de Tween 20 e 2% (V:V) de leite desnatado foram adicionado em cada poço e as placas incubadas por 1h à 37°C. Por fim, seguiu-se a adição de 100 μ L/poço de solução substrato/cromógeno - 1,2-diaminobenzeno (OPD, Sigma) 0.08% (V/V) em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5.6 acrescido de 0,06% (V/V) de H₂O₂ (Merck). Após incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente em câmara escura, a reação enzimática foi parada com a adição de 50 μ L/poço de H₂SO₄ 4N (Nuclear). A absorbância (densidade óptica, DO) foi mensurada à 490nm em espectrofotômetro (BioTek ELx800).

Para a determinação das diluições de anti-anticorpos de captura, anti-anticorpos conjugados e concentrações de proteína no bloqueio, foram empregadas titulações em bloco utilizando sobrenadantes da linhagem SKW 6.4 coletados após 7 dias de cultura como referência positiva e sobrenadantes das linhagens de hibridomas murinos secretores de anticorpos monoclonais anti-rábicos LIA 02 (isótipo IgG2a) e 9C7 (isótipo IgM) como referências negativas. As condições ótimas foram determinadas quando a razão entre as médias dos valores das referências positivas pelas médias dos valores das referências negativas era maior ou igual a 10.

4.2.2 Ensaio de proliferação celular e teste de exclusão por azul de tripan em placas de 96 micropoços

A proliferação celular foi avaliada pelo método originalmente proposto por Mosmann (1983), modificado para sua aplicação em suspensões celulares acondicionadas em placas de cultura de 96 micropoços por Pasetti (2009). Para cada micropoço, 50 μ L de solução MTT (3-[4,5-dimetiazol-2il]-2,5-difenil brometo de tetrazólio, 5mg·mL⁻¹, Sigma) diluídos em RPMI 1640 estéril foram adicionados. Em seguida, células foram incubadas durante 4 horas adicionais à 37° C em

5% de CO₂. Ao término da incubação, células foram centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos e sobrenadantes com solução de MTT cuidadosamente retirados. 100µL de DMSO (dimetilsufóxido, Merck) foram adicionados para cada poço, sendo o conteúdo completamente misturado durante 10 minutos à temperatura ambiente em agitador orbital. A absorbância foi mensurada à 540nm em espectrofotômetro (BioTek ELx800), e os dados obtidos para triplicatas de cada condição experimental analisada expressos como porcentagens calculadas em relação aos grupos controle não tratados.

As análises de viabilidade celular realizadas através do teste de exclusão pelo corante vital azul de tripan seguiram conforme protocolo descrito por Barile (1994). Para tanto, alíquotas de 50µL foram coletadas de cada micropoço e adicionadas ao mesmo volume de solução azul de tripan (Merck) 0,2% (V/V). Alíquotas de 10µL da solução resultante foram imediatamente transferidas para contagem de células em câmara de Neubauer (L-OPTK) por meio de microscópio de luz invertida (Olympus IX51), com contagem mínima de aproximadamente 100 células. Os dados obtidos foram expressos como porcentagens do total de células viáveis para cada micropoço calculadas em relação aos grupos controle não tratados, considerando células coradas em azul como não viáveis. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes para cada condição experimental analisada.

4.2.3 Padronização das condições de ativação e supressão de células SKW 6.4 em placas de cultura de 96 micropoços

4.2.3.1 Determinação do número de células por micropoço e tempo de incubação

Células da linhagem SKW 6.4 cultivadas conforme descrito no item 4.1.2 foram transferidas para tubos cônicos e centrifugadas duas vezes a 1500rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente. Os botões celulares resultantes foram novamente suspensos e o número de células por unidade de volume ajustado para 5×10^5 células/mL através de contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, alíquotas da suspensão celular foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços

(TPP), de modo a se obter 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$, $1,25 \times 10^4$ e $0,62 \times 10^4$ células/poço em volume final de $200 \mu\text{L}$. As placas foram mantidas à 37°C com 5% CO_2 até a coleta de $100 \mu\text{L}$ /poço de sobrenadante em 8, 12, 24, 48, e 72 horas de incubação e amostras imediatamente mensuradas quanto à cinética de secreção de imunoglobulinas através do ELISA previamente padronizado. Análises visuais em microscópio de luz invertido foram periodicamente executadas para a estimativa do estado de viabilidade celular em cada condição experimental avaliada. Os experimentos foram realizados em triplicatas e dados obtidos submetidos a tratamento estatístico descritivo.

4.2.3.2 Determinação das concentrações ótimas de imunomoduladores como referências de ativação/supressão de células SKW 6.4

Para a avaliação da sensibilidade de células SKW 6.4 a estímulos de ativação ou supressão imune nas condições de cultura anteriormente estabelecidas e determinação de condições referenciais de imunomodulação, foram realizadas curvas crescentes de concentração dos seguintes imunomoduladores da resposta imune *in vitro* de linfócitos B: LPS (*E. Coli* 011:B4, Sigma), Forbol-miristato-acetato (PMA - *phorbol-12-miristate-13-acetate*, Sigma), azatioprina (AZA, Sigma), ácido micofenólico (MPA - *micophenolic acid*, Sigma) e rapamicina (RAPA, Sigma). Após incubação, $100 \mu\text{L}$ /poço de sobrenadante de cada condição experimental ensaiada foram coletados e a secreção de imunoglobulinas imediatamente mensurada como anteriormente descrito.

Experimentos paralelos reproduzindo as exatas condições descritas para a avaliação de diferentes moduladores da atividade imune de células SKW 6.4 foram submetidos a ensaios de proliferação e análise de viabilidade celular conforme descrito no item 4.3.2. Concentrações consideradas ótimas apresentaram viabilidade celular não inferior a 90% e produção de imunoglobulinas expressamente maior ou menor comparada ao observado em células não tratadas, quando mensuradas pelo ensaio ELISA previamente padronizado. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada condição ensaiada e dados obtidos submetidos a tratamento estatístico descritivo.

4.3 DOSAGEM DE IL-6 COMO PARÂMETRO ADICIONAL DE AVALIAÇÃO EM EVENTOS DE IMUNOMODULAÇÃO DE CÉLULAS SKW 6.4

Para a análise da capacidade de secreção de IL-6 pelo modelo frente à estímulos de modulação de sua atividade imune, células SKW 6.4 foram acondicionadas em placas de cultura de 96 micropoços conforme anteriormente padronizado e ensaiadas na presença de PMA, LPS e diferentes concentrações de dexametasona (DEX, Decadron®, ACHÉ). Após incubação, sobrenadantes foram coletados e os níveis de IL-6 quantificados por ensaio ELISA utilizando o kit comercial *Human IL-6 ELISA MAX™ Deluxe BioLegend* (BioLegend, Inc, San Diego, USA), conforme instruções do fabricante. Para tanto, 100µL/poço de solução de sensibilização com anticorpo de captura na diluição 1:2000 foram distribuídos em placas para ELISA fornecidas no kit. Após incubação *overnight* à 4°C, as placas foram lavadas 4 vezes com solução tampão PBS contendo 0,05% (V:V) de Tween 20 (Nuclear), procedimento de lavagem repetido entre as etapas subsequentes do protocolo. Em seguida, executou-se o bloqueio de sítios de ligação inespecífica com 300 µL/poço de solução de bloqueio fornecida no kit, durante 1h à temperatura ambiente com agitação orbital em aproximadamente 200rpm. Ao término do período de bloqueio, seguiu-se a adição de 100µL/poço de sobrenadantes de células SKW 6.4 e dos padrões de concentração de IL-6 humana fornecidos no kit, com incubação de 2h sob agitação à temperatura ambiente.

Após o descarte dos sobrenadantes e nova lavagem, foram adicionados 100µL/poço de anticorpos secundários diluídos 1:2000 em solução tampão fornecida pelo kit, com incubação de 1h sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se solução com conjugado HRP-avidina diluído 1:1000 em solução tampão fornecida pelo kit no volume de 100µL/poço, com incubação de 30 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Por fim, a reação foi revelada com adição de 100µL/poço de solução de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, 50mM, pH 5,0), fornecida pelo kit, com incubação em ambiente escuro durante aproximadamente 15 minutos. A leitura foi realizada após adição de 100µL/poço de solução H₂SO₄ 2N (Merck), em espectrofotômetro (Tecan, *Sunrise basic*) à 405 nm. Concentrações de IL-6 nos sobrenadantes analisados foram determinadas através do

cálculo de regressão linear com base nos valores de referência observados em curva padrão estabelecida para cada experimento independente. Os resultados obtidos foram expressos como $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e submetidos a tratamento estatístico descritivo. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada condição ensaiada.

4.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE POLISSACARÍDEOS DE *Agaricus subrufescens* SOBRE LINFÓCITOS B

Nesse estudo foram avaliadas amostras de polissacarídeos do fungo *Agaricus subrufescens* (ASP) quanto à potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B a partir do ensaio *in vitro* padronizado neste estudo. Para tanto, amostras liofilizadas dos extratos brutos de *A. subrufescens* obtidos do corpo de frutificação (ASP-FB), micélio cultivado em grãos de trigo (ASP-MSS) e micélio cultivado em meio líquido (ASP-MLS) foram suspensas em PBS e posteriormente autoclavadas à 120°C , $1,2\text{ kgf/cm}^3$ durante 20 minutos, com soluções resultantes estocadas à 4°C . Células SKW 6.4 foram incubadas com diferentes concentrações não tóxicas de cada extrato nas condições de ensaio anteriormente padronizadas. Ao término do período de incubação, sobrenadantes foram coletados para realização dos ensaios imunoenzimáticos para mensuração de imunoglobulinas totais e dosagem de IL-6, conforme protocolos descritos nos itens 4.2.1 e 4.3, respectivamente.

Em adição, amostras liofilizadas do extrato bruto do corpo de frutificação de *A. subrufescens* fracionado através de membranas de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF1 e UF2) e nanofiltração (NF) foram avaliadas quanto ao seu efeito imunomodulador *in vitro* sobre linfócitos B, a fim de estabelecer o método ideal de purificação deste extrato para futuras aplicações biotecnológicas. Tais amostras foram suspensas, autoclavadas, estocadas e ensaiadas como anteriormente descrito.

Os dados obtidos foram tratados através de estatística descritiva e análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Dunnett para a comparação entre as médias de absorbância registradas em diferentes concentrações ensaiadas e o grupo controle celular não

tratado, com $p < 0,05$ considerado como significativo. Os ensaios foram realizados em triplicatas para cada condição experimental analisada. Todas as amostras de polissacarídeos do fungo *A. subrufescens* foram gentilmente cedidas pela Dra. Carla Maísa Camelini, responsável pela sua extração, purificação e caracterização, sob a orientação da Prof. Dra. Margarida Matos Mendonça (Laboratório de Bioprocessos/MIP/CCB/UFSC).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento experimental sugerido para desenvolvimento do ensaio relatado neste estudo fundamentou-se na utilização de um modelo *in vitro* de linfócitos B humanos, capaz de responder a diferentes estímulos de modulação de sua atividade imune basal; na otimização de um método analítico que permita mensurar a resposta imunitária de células submetidas às condições de ensaio pré-estabelecidas; e na definição de condições experimentais e padrões comparativos que propiciem a avaliação do modelo empregado quanto à ativação ou supressão de suas funções imunes. Foi adotado como parâmetro inicial de avaliação a medida dos níveis de imunoglobulinas secretadas em cultura, sendo esta a abordagem clássica para a caracterização da atividade biológica de linfócitos B *in vivo* e *in vitro* (VAZ *et al.*, 2007). Condições ótimas de cultivo celular e demais variáveis foram determinadas para placas de cultura de 96 micropoços, como descrito a seguir.

5.1 CÉLULAS SKW 6.4 COMO MODELO *IN VITRO*

B-LCLs estabelecidas *in vitro* através da infecção com EBV em geral apresentam cariótipo diplóide e conservam mecanismos moleculares de regulação observados em linfócitos B não transformados (WROBLEWSKY *et al.*, 2002; KURIBAYASHI *et al.*, 2008). A modulação da atividade imune de B-LCLs é comumente descrita e aplicada para uma série de ensaios experimentais na pesquisa imunológica, embora a susceptibilidade e sensibilidade a diferentes agentes imunomoduladores possa variar conforme a linhagem (CHENG *et al.*, 1993; YOUNG *et al.*, 2004; MEYER-WENTRUP, 2007; KURIBAYASHI *et al.*, 2008). Dessa forma, optou-se inicialmente pela utilização de uma linhagem de linfoblastóides B humanos imortalizados via EBV, denominada SKW 6.4, como modelo preditivo da reposta imune de linfócitos B *in vitro*. Células SKW 6.4 secretam imunoglobulinas monoclonais espontaneamente e têm sido frequentemente empregadas em estudos de modulação e diferenciação de linfócitos B humanos independente de células T ou mediados por

citocinas (RALPH *et al.*, 1983; TAMURA *et al.*, 1993; KAMAWOTO *et al.*, 1998; SAKUMA *et al.*, 2001).

5.2 PADRONIZAÇÃO DE ELISA DE CAPTURA PARA TITULAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS SECRETADAS POR CÉLULAS SKW 6.4

A técnica de ELISA destaca-se como uma poderosa ferramenta para detecção e quantificação de moléculas específicas situadas em matriz complexa. Originalmente descrita por Engvall e Perlmann (1971), este ensaio é utilizado no diagnóstico de uma série de distúrbios clínicos e amplamente aplicado em pesquisa biomédica, caracterizando-se pelo curto tempo de realização, reprodutibilidade, baixo custo, utilização de pequeno volume de amostras e natureza quantitativa dos (MIURA *et al.*, 2008). Uma variante deste ensaio, denominado ELISA de captura, consiste na adsorção em fase sólida de anticorpos primários específicos para captura do antígeno de interesse; posterior adição de anticorpos secundários de mesma especificidade, conjugados à enzimas que catalisam reações de óxido-redução em complexos cromógenos; e por fim a análise do sinal colorimétrico observado através de espectofotometria. ELISAs de captura são descritos em literatura como método padrão para pesquisa e titulação de anticorpos específicos em amostras biológicas (MADRUGA *et al.*, 2001). Com isso, considerou-se o ELISA de captura como instrumento analítico adequado para a metodologia *in vitro* de triagem desenvolvida neste estudo.

Para a utilização de um ELISA de captura na mensuração dos níveis de imunoglobulinas secretadas por células SKW 6.4 em condições de cultura determinadas, fez-se necessário a padronização de diferentes etapas protocolares através da titulação de reagentes em blocos casualizados, conforme relatado no item 4.2.1. O conjunto de condições ótimas foi observado nas diluições 1:8000 de anticorpos anti-Ig polivalente humana, 1:1500 de anticorpos anti-Ig polivalente humana conjugados à peroxidase e 4% (V/V) de leite em pó desnatado para o bloqueio de ligações inespecíficas (Figura 1).

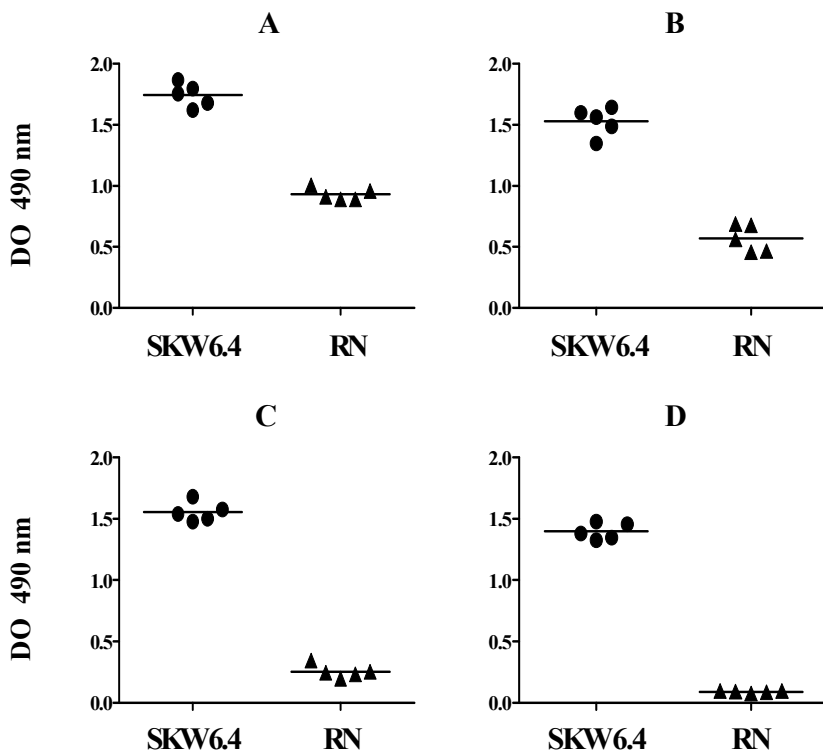


Figura 1: Representação gráfica de resultados obtidos em diferentes diluições de anticorpos anti-Ig polivalente e anti-Ig polivalente conjugados à peroxidase na padronização de ELISA para titulação de imunoglobulinas totais humanas. Pontos circulares representam amostras de sobrenadantes de células SKW 6.4 coletadas após 7 dias de cultura em garrafas de 10cm²; pontos triangulares representam amostras de sobrenadantes de culturas de hibridomas murinos secretores de anticorpos monoclonais anti-rábicos (RN, referências negativas). (A) diluições 1:4000 anticorpo anti-Ig de captura/ 1:750 anticorpo anti-Ig conjugado; (B) diluições 1:8000 anticorpo anti-Ig de captura/ 1:750 anticorpo anti-Ig conjugado; (C) diluições 1:4000 anticorpo anti-Ig de captura/ 1:1500 anticorpo anti-Ig conjugado; (D) diluições 1:8000 anticorpo anti-Ig de captura/ 1:1500 anticorpo anti-Ig conjugado. Bloqueio de ligações inespecíficas realizado com 4% (V/V) de leite em pó desnatado. Demais condições de ensaio inalteradas. Dados apresentados como densidade óptica (DO) à 490nm. Fonte: do autor.

5.3 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVAÇÃO E SUPRESSÃO DE CÉLULAS SKW 6.4 EM PLACAS DE CULTURA DE 96 MICROPOÇOS

Sistemas de cultura em placas de 96 micropoços são comumente empregados em metodologias de avaliação imunotoxicológica de compostos em populações celulares homogêneas, possibilitando a triagem de um grande número de amostras e análise simultânea de diferentes condições experimentais. O cultivo em micropoços proporciona uma área de crescimento celular de aproximadamente $0,32\text{cm}^2/\text{poço}$ para o volume total de $200\mu\text{L}$, resultando em condições de tensão de oxigênio, potencial de hidrogênio iônico e difusão de nutrientes significativamente diferentes ao observado em escalas de cultura celular convencionais. Com efeito, células mantidas nestes microambientes podem apresentar alterações da atividade metabólica basal e perda de viabilidade em curto intervalo de tempo, decorrentes de limitações espaciais, estresse nutricional e/ou saturação do meio; tais implicações acarretam possível erro interpretativo ou baixa sensibilidade analítica em bioensaios aplicados à microcultura celular (EISENBRAND *et al.*, 2002; OLSSON *et al.*, 2006; MINGOIA *et al.*, 2006; COOLINGE *et al.*, 2010). A padronização do conjunto de variáveis referente à concentração celular inicial para cada micropoço e período de incubação constitui, portanto, etapa fundamental no desenvolvimento de um ensaio experimental *in vitro* para a análise de parâmetros celulares específicos conforme proposto neste estudo.

Tendo por base as considerações citadas, células SKW 6.4 foram acondicionadas em placas de cultura de 96 micropoços e experimentos cinéticos conduzidos como descrito no item 4.2.3.1. O monitoramento visual realizado durante as experimentações não revelou queda aparente de viabilidade celular para as diferentes condições experimentais avaliadas. De acordo com a Figura 2, os índices de DO mensurados para as condições ensaiadas em 24 e 48h variaram em função do número inicial de células/poço; em contraponto, os níveis de imunoglobulinas em sobrenadantes coletados após 8 e 72h respectivamente excederam os limites mínimo e máximo de detecção pelo ELISA padronizado. Assumindo uma relação linear entre os níveis absolutos de imunoglobulinas secretadas e as médias de absorbância registradas, considerou-se como adequada a condição correspondente ao

ponto da curva cinética onde a secreção de imunoglobulinas totais é mensurável e imediatamente distante dos limites de detecção do método analítico empregado, possibilitando assim a visualização da resposta celular *in vitro* a estímulos de ativação ou supressão imunológica. Essa situação pôde ser melhor caracterizada na condição de $1,25 \times 10^4$ células/poço para o intervalo de incubação de 48h, sendo esta utilizada para os demais ensaios de imunomodulação experimentados em placas de cultura de 96 poços.

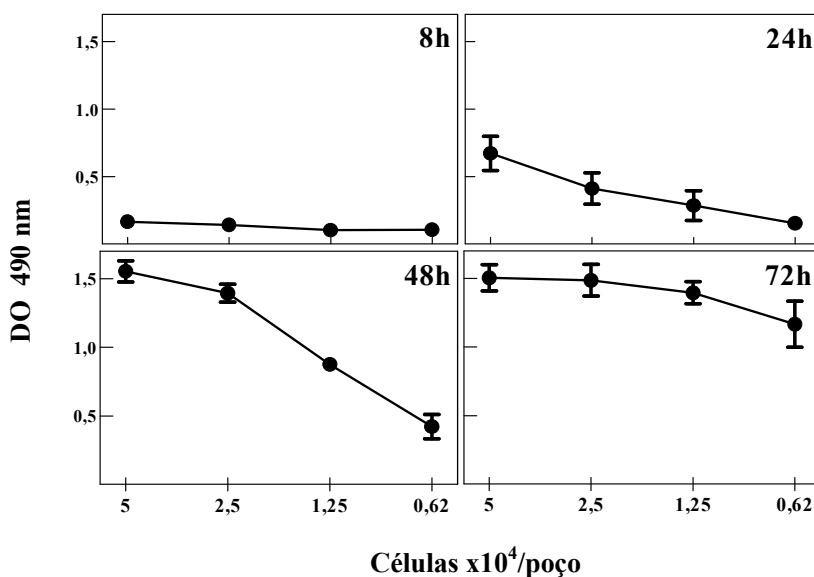


Figura 2: Cinética de produção de imunoglobulinas por células SKW 6.4 ao longo do tempo. Sobrenadantes de poços com diferentes concentrações celulares foram coletados após 8, 24, 48 e 72 horas. Imunoglobulinas secretadas foram mensuradas por ELISA previamente padronizado e resultados apresentados como densidade óptica (DO) à 490nm. Resultados representativos de três experimentos independentes, expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas.

Fonte: do autor.

5.4 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES ÓTIMAS DE IMUNOESTIMULADORES COMO PADRÕES COMPARATIVOS DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS SKW 6.4

Conforme a literatura, populações linfocitárias podem ser induzidas à intensa proliferação e atividade metabólica *in vitro* através da ação de moléculas de sinalização co-estimulatória (KRISTENSEN *et al.*, 1982; KAWAMOTO *et al.*, 1998; CHAPEROT *et al.*, 1998), mitógenos policlonais como lectinas (MANDAL; CHOWDHURY, 1990; BERTRAM *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 1998) e endotoxinas (BJÖRKLUND *et al.*, 1987; VIRCA *et al.*, 1989; MAGES *et al.*, 2008) ou ésteres de forbol capazes de acionar vias intracelulares de ativação transcricional (MOND *et al.*, 1990; KAWAMOTO *et al.*, 1998; KRAUPPMAN, 2001). Pesquisas direcionadas à avaliação da imunocompetência de linfócitos B em cultura comumente empregam constituintes moleculares de parede bacteriana, genericamente denominados de LPS, para a geração de resposta imunitária inespecífica, diferenciação blástica e expansão policlonal (BURGERMEISTER *et al.*, 2003; KOEPER; VOHR, 2009). Outro potente indutor do metabolismo celular, o PMA – um ativador de PKC – tem sido descrito em diversos estudos comparativos de processos imunoestimulatórios em linhagens de células leucêmicas ou transformadas via EBV (ROUSSET *et al.*, 1989; TAMURA *et al.*, 1993; KAWAMOTO *et al.*, 1998; KURIBAYASHI *et al.*, 2008). Dessa forma, como imunomoduladores de primeira escolha para a determinação de padrões de ativação *in vitro* do modelo celular empregado, optou-se pela utilização de formulações liofilizadas de LPS ou PMA comercialmente disponíveis, experimentadas em concentrações seriadas nas condições de ensaio anteriormente estabelecidas.

Os resultados obtidos apontaram o claro aumento nos índices de DO em sobrenadantes de células SKW 6.4 incubadas com concentrações de PMA a partir de $25\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, atingindo valores máximos em 50, 100 ou $200\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ após 48h (Figura 3A). Estes dados concordam com os relatados por Cheng *et al.* (1993), que demonstraram aumentos significativos da secreção de imunoglobulinas por células SKW 6.4 tratadas com 10 à $300\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PMA durante 24h, com concentração ótima estimada em aproximadamente $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. O efeito imunoestimulatório desencadeado por LPS foi observado nas

condições de $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 3B), embora a faixa de concentrações bioativas de LPS descrita em diversos estudos para a ativação de leucócitos humanos ou murinos *in vitro* compreenda de 0,1 à $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (COSTANZO *et al.*, 1999; HAN *et al.*, 2003, CELMER, 2010). Contudo, B-LCLs podem se mostrar hiporesponsivas ao estímulo de LPS devido à baixa expressão de receptores de superfície e moléculas acessórias envolvidos no processo de ativação mediada pela ação de endotoxinas, corroborando a heterogeneidade observada em diferentes linhagens linfoblastóides estabelecidas em cultura (WROBLEWSKY *et al.*, 2002; YOUNG *et al.*, 2004; KURIBAYASHI *et al.*, 2008).

Dado a natureza essencialmente cumulativa da mensuração de moléculas efectoras em cultura, a visualização do aumento dos níveis totais de imunoglobulinas em amostras de sobrenadantes pode não refletir o panorama real da atividade celular ao momento da realização das análises. A fim de investigar o perfil metabólico de células SKW 6.4 nas condições experimentais de imunoestimulação descritas, conduziram-se ensaios paralelos para a análise de proliferação através do método colorimétrico de MTT – que consiste na avaliação semi-quantitativa da redução enzimática de sais tetrazólicos, usualmente correlacionada com o número de células metabolicamente ativas em cultura (ELGIE *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1997) – e verificação de viabilidade celular pela observação da capacidade de efluxo membranal do corante vital azul de tripan (BARILE, 1994). Como ilustra a Figura 3, células SKW 6.4 apresentaram queda nas porcentagens de proliferação celular em proporções aparentemente inversas ao aumento nos níveis de imunoglobulinas totais mensurados por ELISA, embora o surgimento de processos lesivos ou morte celular ocasionado pelos imunoestimuladores selecionados não tenha sido constatado através das análises de viabilidade executadas. Atividade mitótica semelhante pôde ser observada por Splawski *et al* (1989) e Kawamoto *et al* (1998), após o aumento da secreção basal de IgM em microcultivos de células SKW 6.4 induzido pelo tratamento com interleucina-4 (IL-4), IL-6 ou PMA. Estes resultados sugerem que a linhagem linfoblastóide pode, quando deflagrado eventos de ativação imune em condições restritas de cultura, direcionar seu maquinário metabólico para a produção de imunoglobulinas em detrimento das funções envolvidas no crescimento celular, possivelmente consequente de processos terminais de diferenciação blástica. Ainda, a formação de extensos agregados celulares visualmente observados em condições de imunoestimulação *in*

vitro - fenômeno ocasionado pela super-expressão de moléculas de adesão durante a ativação das funções imunes de B-LCLs (ROSSOUT *et al.*, 1989) - pode contribuir sobremaneira para a inibição da resposta proliferativa de células SKW 6.4 em micropoços, limitando a oferta espacial e aporte nutricional às unidades centrais dos grumos celulares ou à células linfoblastóides periféricas não diferenciadas.

Com base nos resultados alcançados neste estudo e em literatura, definiu-se as concentrações de $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para PMA e LPS, respectivamente, como protocolos ao ensaio dos padrões comparativos de imunoestimulação conforme a metodologia *in vitro* sugerida. Por fim, tais resultados demonstram que a linhagem celular selecionada é responsiva a estímulos clássicos de ativação imune, validando sua utilização como modelo experimental na pesquisa de compostos com potencial atividade imunoestimulatória sobre linfócitos B

5.5 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES ÓTIMAS DE IMUNOSSUPRESSORES COMO PADRÕES COMPARATIVOS DE SUPRESSÃO DE CÉLULAS SKW 6.4

Em sequência à padronização das condições referenciais de imunoestimulação acima descrita, seguiu-se a investigação de diferentes agentes supressores da resposta imune com o objetivo de definir padrões comparativos para a avaliação de compostos potencialmente imunossupressores sobre o modelo em estudo. Optou-se pelo ensaio de imunomoduladores prontamente disponíveis em formulações comerciais destinadas à cultura celular, sendo estes: azatioprina (AZA), ácido micofenólico (MPA) e rapamicina (RAPA) - fármacos empregados na terapêutica corrente de distúrbios linfoproliferativos ou rejeição de aloenxertos com atividade *in vitro* anteriormente relatada (EISENBRAND *et al.*, 2002; AL HADITHY *et al.*, 2005; TAYLOR *et al.*, 2005; COOLINGE *et al.*, 2010). Os imunossupressores selecionados foram ensaiados nas condições de microcultura otimizadas e os procedimentos experimentais conduzidos de acordo com o exposto no item 5.4.

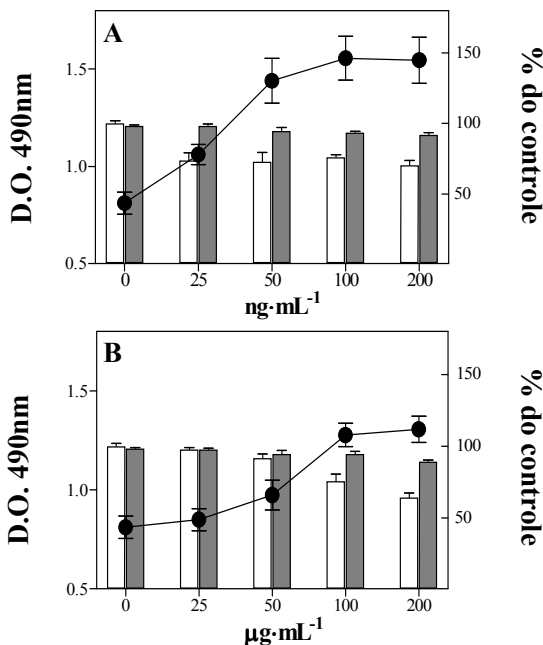


Figura 3: Perfis de secreção de imunoglobulinas totais, proliferação e viabilidade de células SKW 6.4 após tratamento com PMA e LPS. Células SKW 6.4 foram acondicionadas em placas de 96 micropoços na concentração inicial de $1,25 \times 10^4$ células/poço e incubadas com diferentes concentrações de (A) PMA e (B) LPS durante 48h. Sobrenadantes foram coletados e níveis de imunoglobulinas totais mensurados através de ELISA e expressos como DO à 490nm (linha, eixo Y). Proliferação (barras brancas, eixo Z) e viabilidade celular (barras hachuradas, eixo Z) foram avaliadas conforme descrito e expressos como porcentagens do controle celular não tratado (condição $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Resultados representativos de três experimentos independentes, correspondentes à média \pm desvio padrão de triplicatas. PMA, *phorbol-12-miristate-13-acetate*; LPS, lipopolissacarídeo.

Fonte: do autor.

Como apresentado na Figura 4A, células SKW 6.4 tratadas com AZA demonstraram sensível queda nos índices de proliferação e secreção de imunoglobulinas totais de maneira concentração-dependente e aparentemente correlata. Análises quanto à integridade de membrana revelaram perda de viabilidade celular em concentrações experimentais iguais ou superiores a $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, permitindo identificar supressão

imune independente de efeito citotóxico em $6,5$ à $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A imunossupressão mediada por MPA pôde ser claramente observada em condições não citotóxicas ensaiadas a partir de $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, atingindo níveis constantes de atividade proliferativa e humoral entre 100 e $400\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 4B). Estes resultados aproximam-se da faixa de concentrações efetivas *in vitro* estabelecidas para AZA ($1\text{-}20\mu\text{g}/\text{ml}$) e MPA ($\sim 30\text{-}320\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) por Górski *et al.* (1983) e Jonsson e Calrsten (2003), respectivamente, após ensaios de imunossupressão induzida aplicados à cultura de esplenócitos humanos ou murinos imunologicamente ativos, em intervalos de incubação de 24 à 96h . Conforme previamente reportado, o efeito imunossupressor *in vitro* de AZA e MPA decorre do bloqueio de processos subcelulares voltados à biossíntese de nucleotídeos purínicos, inibindo eventos iniciais de replicação gênica, transdução de sinal e síntese protéica (HEINSCHINK *et al.*, 2000; JONSSON; CARLSTEIN, 2003; MALTZMAM; KORETZKY, 2003; AL HADITHY *et al.*, 2005; SCHROLL *et al.*, 2005;); supõe-se, portanto, que a ação inibitória de ambos sobre o modelo em estudo é resultado de uma modulação não específica aos mecanismos relacionados à resposta imune, mas extensa a diferentes aspectos do metabolismo celular.

Similar ao perfil observado para o tratamento com MPA, a secreção de imunoglobulinas e proliferação celular dos microcultivos expostos à RAPA foram expressamente inibidas em todas as concentrações experimentais ensaiadas (Figura 4C), sugerindo mecanismos de imunossupressão igualmente inespecíficos. De fato, a atividade imunomodulatória de RAPA é atribuída à inibição seletiva da enzima mTOR (*mammalian target of rapamycin*), uma serina/treonina quinase de papel central em diversas funções celulares regulatórias, levando primariamente ao bloqueio fase-específico do ciclo celular e consequente supressão mitótica (KRAMS; MARTINEZ, 2008; SHIROUZU *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2009). Contudo, em consoante à sua ação citostática, a RAPA tem sido descrita como capaz de inibir *in vivo* e *in vitro* vias de sinalização constitutivamente ativadas em linhagens neoplásicas linfóides associadas ao EBV, apontando um efeito imunossupressor intrínseco à inativação de mecanismos metabólicos induzidos pela expressão viral (SAKATA *et al.*, 1999; NEPOMUCENO *et al.*, 2003; KRAMS; MARTINEZ, 2008). Vaysberg *et al.* (2007) constataram esta imunossupressão bimodal para diferentes B-LCL relevantes ($5\text{-}10\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 48h , observando a inibição simultânea

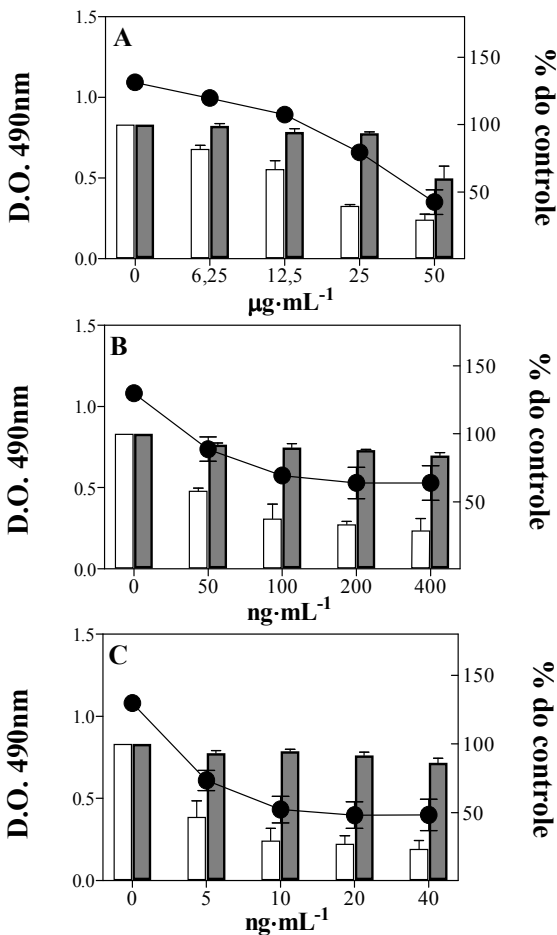


Figura 4: Perfis de secreção de imunoglobulinas totais, proliferação e viabilidade de células SKW 6.4 após tratamento com AZA, MPA e RAPA. Células SKW 6.4 foram acondicionadas em placas de 96 micropoços na concentração inicial de $1,25 \times 10^4$ células/poço e incubadas com diferentes concentrações de (A) AZA, (B) MPA e (C) RAPA durante 48h. Sobrenadantes foram coletados e níveis de imunoglobulinas totais mensurados através de ELISA e expressos como DO à 490nm (linha, eixo Y). Proliferação (barras brancas, eixo Z) e viabilidade celular (barras hachuradas, eixo Z) foram avaliadas conforme descrito e expressos como porcentagens do controle celular não tratado (condição $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Resultados representativos de três experimentos independentes, correspondentes à média \pm desvio padrão de triplicatas. AZA, azatioprina; MPA, *micophenolic acid*; RAPA, rapamicina. Fonte: do autor

cultivadas na presença de RAPA em concentrações clinicamente de vias metabólicas de crescimento autócrino acionadas pelo EBV e da expressão de proteínas regulatórias relacionadas à progressão da fase G1 para o início da fase S do ciclo celular. Estes achados permitem supor que o efeito imunossupressor de RAPA sobre o modelo reflete não só a supressão de eventos proliferativos, mas também a inibição do maquinário celular diretamente modulado pelo EBV para indução de contínua atividade imunológica *in vitro*. Os resultados observados sustentam ainda a possível aplicação da linhagem SKW 6.4 na pesquisa e desenvolvimento de substâncias bioativas com potenciais propriedades antivirais.

Embora o efeito imunossupressor *in vitro* de diferentes imunomoduladores possa variar conforme o modelo experimental empregado (VAYSBERG *et al*, 2007; COOLINGE *et al.*, 2010), os resultados globais obtidos neste estudo indicam que a linhagem linfoblastóide selecionada é sensível à ação dos agentes imunossupressores ensaiados em concentrações previamente referidas na literatura, logo viabilizando sua plena utilização na metodologia de avaliação imunomodulatória proposta. Como condições referenciais de imunossupressão de células SKW 6.4 segundo o protocolo estabelecido, sugere-se o ensaio de AZA, MPA ou RAPA nas concentrações $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $10\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

5.6 DOSAGEM DE IL-6 COMO PARÂMETRO AVALIATIVO ADICIONAL AO ENSAIO *IN VITRO* PADRONIZADO

Uma vez que linfócitos B imunologicamente ativos podem secretar IL-6 – uma citocina pleiotrópica relacionada à diferentes funções regulatórias, incluindo processos inflamatórios sistêmicos e hematopoiese (HIRANO, 2010), investigou-se sua presença em sobrenadantes de células SKW 6.4 submetidas às condições de imunomodulação previamente definidas como parâmetro avaliativo adicional ao sistema experimental *in vitro* desenvolvido. Esta mesma abordagem foi anteriormente utilizada por Tamura *et al* (1993) e Sakuma *et al* (2001) em estudos comparativos de diferentes substâncias imunoativas sobre a linhagem linfoblastóide empregada no presente trabalho. Para tanto, células foram inicialmente ensaiadas nas condições

referenciais de imunoestimulação padronizadas e a secreção de IL-6 quantificada por ELISA comercialmente adquirido após 48h (Figura 5A). Embora B-LCLs possam secretar níveis variáveis de IL-6 espontaneamente como fator autócrino de crescimento (WROBLEWSKY *et al.*, 2002), não verificou-se quantidade detectável da citocina nos sobrenadantes de grupos celulares não tratados mensurados, revogando a possibilidade de expressão constitutiva de IL-6 pela linhagem SKW 6.4. Como esperado, a secreção de IL-6 foi fortemente induzida na presença de LPS em concentração ótima, de modo similar ao observado durante as avaliações quanto à medida de imunoglobulinas totais em microcultura. O mesmo perfil de atividade imunológica é amplamente descrito para diferentes populações leucocitárias expostas à endotoxina *in vitro* e *ex vivo* (CONSTANZO *et al.*, 1999; GUO *et al.*, 2000; GORBET; SELFTON, 2005). Ainda em acordo com a literatura consultada, o tratamento experimental com PMA não foi capaz de induzir a produção de níveis claros de IL-6, divergindo de seu potente efeito imunoestimulatório sobre células SKW 6.4 anteriormente constatado; estes dados são respaldados por estudos prévios que relatam a inibição de cascatas de sinalização molecular requeridas para a expressão de IL-6 ocasionada pela ação *in vitro* de PMA sobre o metabolismo protéico de células imunes (CONSTANZO *et al.*, 1999; TERGENSTEIN *et al.* 2000). Os resultados obtidos evidenciam, a princípio, os distintos mecanismos e rotas de sinalização envolvidos na ativação imunológica mediada por LPS ou PMA sobre o modelo *in vitro* utilizado.

Conforme demonstrado por Cardinal *et al* (2010), a síntese de citocinas pró-inflamatórias por diferentes modelos linfocitários ou leucócitos polimorfonucleares humanos imunoestimulados pode ser negativa e especificamente modulada *in vitro* pelo tratamento com dexametasona (DEX) – um análogo glicocorticóide sintético de uso clínico – em concentrações terapêuticas ($0,1-100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) após períodos de ensaio entre 72-96h. Neste estudo, a secreção de IL-6 por células SKW 6.4 induzida por LPS nas condições experimentais protocoladas foi parcial ou totalmente inibida com a adição de DEX em concentrações de $1 \text{ à } 100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 5B), sem que mudanças sensíveis na atividade proliferativa ou viabilidade celular fossem observadas (dados não apresentados). Tais resultados sugerem que a responsividade do modelo empregado a estímulos de imunomodulação está correlacionada a processos inflamatórios *in vivo*, permitindo

especular a possível utilização desta metodologia na prospecção *in vitro* de substâncias com potencial atividade anti-inflamatória específica.

Assim, conclui-se que a resposta de secreção de IL-6 pela linhagem SKW 6.4 pode ser claramente modulada em condições de ativação ou supressão imune, possibilitando sua quantificação em cultura como recurso investigativo na pesquisa e triagem de compostos potencialmente imunoativos segundo o método estabelecido.

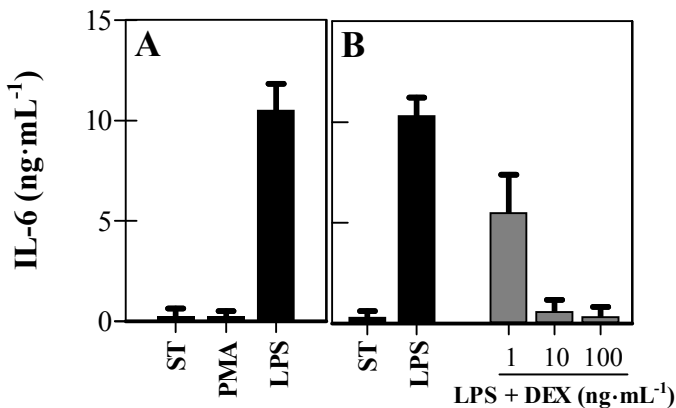


Figura 5: Perfil de secreção de IL-6 por células SKW 6.4 após tratamento com PMA, LPS e DEX. (A) Células SKW 6.4 foram acondicionadas em microplacas de 96 micropoços na concentração inicial de $1,25 \times 10^4$ células/poço e incubadas com $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PMA ou $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de LPS durante 48h. (B) Células SKW 6.4 foram acondicionadas como descrito e incubadas com diferentes concentrações de DEX na presença de $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de LPS durante 48h. Sobrenadantes foram coletados e níveis de IL-6 quantificados através de ELISA. Resultados representativos de três experimentos independentes, correspondentes à média \pm desvio padrão de triplicatas. ST, sem tratamento; PMA, *phorbol-12-miristate-13-acetate*; LPS, lipopolissacarídeo; DEX, dexametasona.

Fonte: do autor.

5.7 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE POLISSACARÍDEOS DE *Agaricus subrufescens* SOBRE LINFÓCITOS B

Polissacarídeos não-celulósicos obtidos de micélios e basidiocarpos de diferentes fungos têm sido descritos como potentes moduladores da resposta imune, sendo seu cultivo e utilização clínica fortemente estabelecidos em países orientais, como China e Japão (CHEN; SAVIOR, 2007; LIU *et al.*, 2007). A atividade biológica destas macromoléculas é mediada por um conjunto de características estruturais, como o peso molecular, o formato do esqueleto carbônico, conformação dos grupos de cadeia lateral e os tipos de ligações β -glicosídicas (BROWN; GORDON, 2003; CHEN; SAVIOR, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). O basidiomicete *Agaricus subrufescens* (também denominado *Agaricus brasilienses*, Kerrigan, 2005) é um dos fungos cultiváveis mais produzidos na região sul do Brasil, comercialmente disponível em suplementos nutricionais ou para uso culinário. As propriedades imunoestimulatórias de ASP foram anteriormente comprovadas através da avaliação *in vitro* dos níveis de secreção de TNF- α (*tumor necrosis factor α*) e expressão de marcadores moleculares de ativação da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 tratados com diferentes frações de polissacarídeos isolados a partir de fermentação batelada ou cultivo em substrato sólido (SHU *et al.*, 2003; CELMER, 2010). No presente estudo, a avaliação da atividade imunomodulatória de polissacarídeos de *A. subrufescens* através do ensaio *in vitro* padronizado foi realizada em caráter de prova conceitual da metodologia de triagem proposta.

5.7.1 Atividade imunoestimulatória de polissacarídeos de *A. subrufescens* sobre a secreção de imunoglobulinas por células SKW 6.4

Em princípio, investigou-se a secreção de imunoglobulinas por células SKW 6.4 tratadas com os extratos brutos de ASP obtidos do corpo de frutificação cultivado *in situ* e micélio cultivado em sistema de imersão (substrato líquido) e em grãos de trigo (substrato sólido). De

acordo com a Figura 6A, células tratadas com $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ASP-FB durante 48h apresentaram um aumento significativo na secreção de imunoglobulinas, enquanto não foram constatadas mudanças nos níveis de secreção no tratamento com ASP-MSS e ASP-MLS em relação ao grupo controle celular, utilizando-se as mesmas condições de estimulação. Para a obtenção dos padrões de referência de ativação para comparação de resultados, optou-se pela utilização de LPS na concentração anteriormente padronizada, uma vez que muitos estudos relatam o uso comum de vias de sinalização na ativação mediada por LPS e polissacarídeos originados de diversas fontes naturais (HAN *et al.*, 2003; BROWN; GORDON, 2003). De fato, observa-se similaridade nos perfis de aumento dos níveis de imunoglobulinas em células tratadas com ASP-FB e LPS, o que indicaria uma possível utilização dos mesmos receptores de superfície celular e rotas de ativação. Por outro lado, estes resultados também poderiam decorrer de contaminação das amostras estudadas com concentrações residuais de LPS. Contudo, ambas as hipóteses podem ser questionadas, como descrito a seguir.

Os resultados apresentados demonstram que o modelo celular empregado é eficientemente e seletivamente ativado por ASP-FB, mas não por ASP-MSS ou ASP-MLS. Essa aparente seletividade de ativação pode ser atribuída às diferenças no peso molecular encontrado em ASP obtidos do corpo de frutificação (~ 630 kDa) em relação aos isolados do micélio em sistemas de cultura (~310 kDa), dado que a atividade biológica de diversos polissacarídeos fúngicos é em geral relacionada à maior massa molar (BROWN; GORDON, 2003; KIM *et al.*, 2005). Xiao *et al.* (2007) relatou a imunocompetência de polissacarídeos obtidos de membros do gênero *Agaricus* em frações de peso molecular médio acima de 100 kDa através de ensaio de proliferação de esplenócitos murinos *in vitro*; no entanto, não foram verificados aumentos significativos de proliferação celular no tratamento com frações de menor peso molecular (≤ 50 kDa). Em contraste, subfrações de ASP com ampla distribuição de peso molecular (8~30 kDa à > 1000 kDa) são capazes de estimular sobremaneira a resposta imune *in vitro* de células RAW 264.7 e macrófagos peritoniais murinos (SORIMACHI *et al.*, 2001; SHU *et al.*, 2003; CELMER *et al.*, 2010). Os dados encontrados na literatura em conjunto com os resultados obtidos neste estudo sugerem que o polissacarídeo de 630 kDa é o constituinte responsável pela atividade imunoestimulatória do extrato bruto de

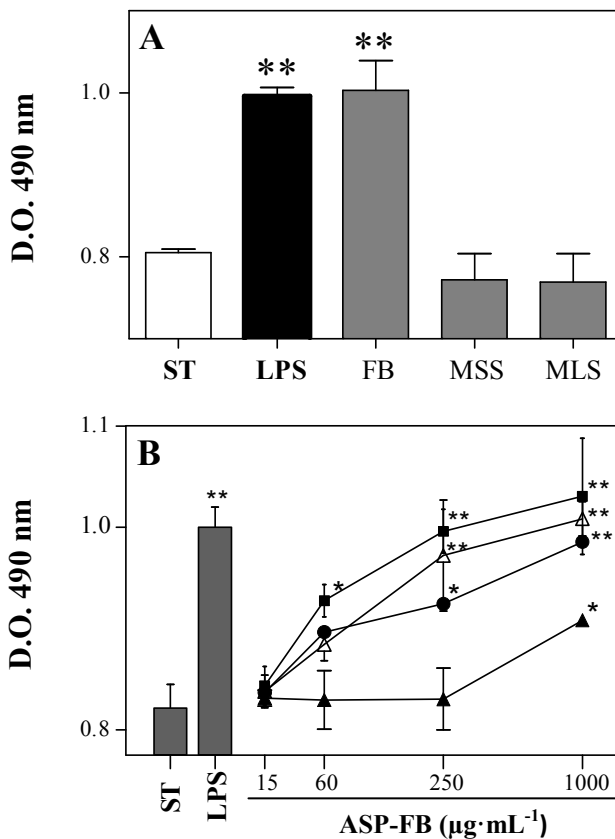


Figura 6. Efeito de ASP sobre a produção de imunoglobulinas em células SKW6.4. (A) Células SKW 6.4 foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração inicial de $1,25 \times 10^4$ células/poço e tratadas com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de LPS e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos extratos brutos de ASP-FB (corpo de frutificação), ASP-MSS (micélio cultivado em substrato sólido) e ASP-MLS (micélio cultivado em substrato líquido), durante 48h. (B) Células SKW 6.4 foram tratadas, nas mesmas condições, com concentrações crescentes de frações de ASP-FB separadas através de membranas de (●) microfiltração (MF), (▲) ultrafiltração (UF), (△) nanofiltração (NF) e extrato bruto (■). ST indica o grupo controle celular não tratado. Imunoglobulinas secretadas foram mensuradas por ELISA e resultados apresentados como densidade óptica (D.O) à 490nm. Resultados representativos de três experimentos independentes, expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas. A significância estatística foi calculada em relação ao grupo controle celular não tratado ($p < 0,05^*$ e $p < 0,01^{**}$).
Fonte: do autor.

ASP-FB na linhagem de linfócitos B *in vitro* utilizada, embora polissacarídeos de menor peso molecular médio possam ativar linhagens de macrófagos murinos de maneira eficaz.

Contudo, diferenças estruturais observadas nos polissacarídeos isolados dos extratos de micélio e corpo de frutificação de *A. subrufescens* podem afetar diretamente a atividade biológica dessas moléculas nos principais subconjuntos de células do sistema imune. Lentinana, uma $\beta(1\rightarrow3)$ -glucana isolada do fungo *L. edodes*, é um potente estimulador de células T e macrófagos, mas não induz a secreção de anticorpos em linfócitos B (BORCHES *et al*, 1999; HAN *et al*, 2003). Outra $\beta(1\rightarrow3)$ -glucana, esquizofilana, obtida a partir de cepas do fungo *S. commune*, assemelha-se à lentinana quanto a sua atividade biológica. Esquizofilana estimula a imunidade celular em pacientes com tumores hepáticos agindo como adjuvante de células T e ativador de macrófagos (OOI, LIU, 2000; SUZUKI *et al*, 1994). Outros tipos de β -glucanas isoladas de membros do gênero *Saccharomyces* também podem induzir a atividade de macrófagos murinos (FIGUERAS *et al*, 1998). Um polissacarídeo isolado do fungo *P. linteus*, composto por glicose, galactose, manose, arabinose, xilose e ácido urônico, ativa de forma direta linfócitos B, linfócitos T e macrófagos murinos *in vitro* e *in vivo*. Polissacarídeos de *P. grandiflorum* e *A. gigas Nakai* também são capazes de ativar linfócitos B e macrófagos em conjunto (JEON *et al.*, 2001; HAN *et al* 2001). Conforme Camelini (2010), ASP-FB possuem estrutura de cadeia principal $\beta(1\rightarrow6)$ -glucana, ramificada por $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanas conectadas, enquanto ASP-MSS e ASP-MLS foram identificados como glucomananas de cadeia principal $\beta(1\rightarrow2)$ -manana e ramificações $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanas. Logo, pode-se especular que a arquitetura e as ligações $\beta(1\rightarrow3)$, $(1\rightarrow6)$ -glucanas encontradas na molécula de ASP-FB podem ser fatores fundamentais para a atividade imunoestimulatória *in vitro* destes polissacarídeos sobre linfócitos B humanos observada neste estudo, e possivelmente possam conferir um espectro de atividade sobre células do sistema imune inato e adaptativo.

A atividade *in vitro* de ASP-FB sobre linfócitos B foi avaliada para diferentes frações do extrato bruto retidas através da utilização de sistemas de filtração com membranas de microfiltração (MF, porosidade de 22 μm , pressão de operação 0,5 bar, composta de acetato de celulose), ultrafiltração (UF, ponto de corte de 100-150 kDa, 2-4 bar, composta de PVDF - *polyvinylidene fluoride*) e nanofiltração (NF, ponto de corte > 10 kDa, 20 bar, composta de poliamida) visando o

estabelecimento de um método de filtração ótimo para estes extratos. Todas as frações analisadas propiciaram o aumento dos níveis de secreção de imunoglobulinas em células SKW 6.4 de maneira concentração-dependente (Figura 6B). As frações retidas por NF, MF e o extrato bruto exibiram perfis de estimulação similares, embora o extrato bruto tenha demonstrado resultados significativos em menores concentrações. Em contraponto, frações retidas por UF não ocasionaram mudanças nos níveis de imunoglobulinas em relação ao grupo celular não tratado, excetuando-se na maior concentração testada. A discrepância na atividade observada para as frações UF pode refletir um menor número de polissacarídeos bioativos em solução, resultante de processos de adsorção, interações soluto-soluto e *fouling* do retido em membranas de filtração eletricamente carregadas. Tais processos representam o maior entrave do método de fracionamento de soluções orgânicas por membranas e estão diretamente relacionados com a composição material da membrana e a concentração da solução submetida (NATARAJ et al., 2007). O permeado obtido da membrana de nanofiltração, devido à sua menor porosidade, provavelmente retém a maior parte dos polissacarídeos bioativos encontrados no extrato bruto de ASP-FB, corroborando a similaridade nos resultados experimentais quantitativos observados entre as duas frações. Em suma, os resultados alcançados pelo ensaio *in vitro* padronizado neste estudo permitem concluir que o fracionamento do extrato bruto de ASP-FB pelas membranas de nanofiltração empregadas constitui um método eficaz de purificação destes compostos para futuras aplicações biotecnológicas, conservando suas propriedades imunoestimulatórias *in vitro* sobre linfócitos B humanos.

5.7.2 Análise da secreção de IL-6 induzida por ASP em células SKW 6.4

A quantificação dos níveis de IL-6 secretados pelo modelo celular utilizado foi empregada como ferramenta para a investigação das possíveis rotas de ativação de ASP-FB em linfócitos B humanos. Como esperado, a secreção de IL-6 por células tratadas com LPS nas condições estabelecidas foi marcadamente estimulada, enquanto grupos celulares sem tratamento não apresentaram níveis claros de secreção (Figura 7).

Da mesma forma, não foi constatado índices significantes de IL-6 em sobrenadantes de células estimuladas com as frações de ASP-FB avaliadas. Esses resultados sugerem que a atividade imunoestimulatória de ASP-FB pode ocorrer através de vias de sinalização e receptores celulares diferentes dos utilizados na ativação desencadeada por LPS. Além disso, a ausência de IL-6 em sobrenadantes de células tratadas com frações de ASP-FB refuta a possibilidade de contaminação das amostras avaliadas com quantidades significativas de LPS, descartando a eventual necessidade do pré-tratamento com inibidores de endotoxinas.

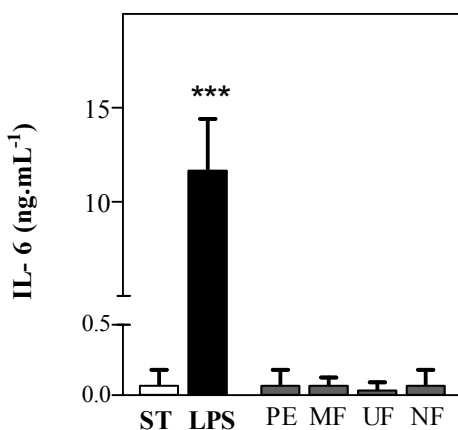


Figura 7. Efeito de ASP-FB na secreção de IL-6 por células SKW 6.4. Células foram tratadas com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de LPS ou $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ASP-FB fracionados por membranas de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF) durante 48h nas condições anteriormente padronizadas e a produção de IL-6 quantificada por ELISA. Resultados representativos de três experimentos independentes, expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas. A significância estatística foi calculada em relação ao grupo controle celular não tratado ($p < 0,001$ ***).

Fonte: do autor.

Uma vez que ASP-FB não podem transpor a membrana celular devido à sua massa molecular, presume-se que a atividade imunoestimulatória observada seja desencadeada por ligante(s) específico(s) expressos na superfície de células do sistema imune.

Diversos estudos têm descrito receptores da família TLR como os principais candidatos a mediadores da atividade imunológica induzida por polissacarídeos em macrófagos e linfócitos B, levando à ativação do fator transcricional NF- κ B e sinalização via MAP quinases (HAN *et al*, 2003; GUO *et al*, 2009; LI, XU, 2010; VOLMANN *et al*, 2010). Como antes mencionado, ASP-FB apresenta um perfil de estimulação semelhante ao observado na ativação de células SKW 6.4 por LPS, mediada por receptores semelhantes a *Toll 4* (*Toll-like receptor-4*, TLR-4). Sugere-se ainda a participação de receptores semelhantes a *Toll 2* (*Toll-like receptor-2*, TLR-2) na ativação da resposta imune de macrófagos e linfócitos B por LPS ou polissacarídeos fúngicos. (OGATA *et al*, 2000; HAN *et al*, 2003). Contudo, a constatação de que células SKW 6.4 tratadas com ASP-FB não secretam quantidades detectáveis de IL-6, diferente do tipicamente observado em leucócitos estimulados *in vitro* por LPS via TLRs (COSTANZO *et al*, 1999), refuta a hipótese do envolvimento de TLR-4/TLR-2 no reconhecimento e ativação desencadeada por ASP-FB no modelo celular utilizado. Essa conclusão é ainda sustentada por dados da literatura que sugerem que células SKW 6.4 não expressam TLR-2 (YOUNG *et al*, 2004). Assim, a atividade de ASP-FB em linfócitos B pode requerer rotas de sinalização independentes de TLRs.

Dentre os possíveis ligantes de moléculas de polissacarídeos relatados para linfócitos B alternativos aos TLRs, dectina-1 - um receptor de lectinas do tipo C - é descrito como específico para polímeros glicídicos com ligações $\beta(1\rightarrow3)/\beta(1\rightarrow6)$ e amplamente expresso em APCs. A sinalização por dectina-1 recruta proteínas envolvidas na cascata de fosforilação de PLC γ 2 e PKC, culminado na translocação de NF- κ B e consequente ativação celular refletida na produção de anticorpos e/ou citocinas (BROWN, GORDON, 2003; GUO *et al*, 2009; MAKARALALA *et al.*, 2010). No entanto, a interação de dectina-1 com as proteínas tetraspaninas CD37 na superfície celular pode inibir a secreção de IL-6 citosólica de linfócitos B e macrófagos ativados *in vitro* (MEYER-WENTRUP, 2007). Uma vez que CD37 é fortemente expresso em linfomas e outras desordens neoplásicas de linfócitos B (ZHAO *et al*, 2007), pode-se inferir que a ativação induzida por ASP-FB no modelo de linfócitos B *in vitro* utilizado é mediada fundamentalmente por dectina-1.

6 CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se neste estudo uma metodologia *in vitro* voltada à triagem e pesquisa de compostos com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B como possível alternativa ao uso de animais de experimentação;
- Os polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação do fungo *Agaricus subrufescens* apresentaram efeito imunoestimulatório significativo sobre o modelo empregado, indicando sua potencial atividade sobre linfócitos B *in vivo*;
- Conclui-se que o fracionamento do extrato bruto dos polissacarídeos bioativos obtidos de *A. subrufescens* por membranas de nanofiltração constitui um método eficaz de purificação destes compostos para futuras aplicações biotecnológicas, conservando suas propriedades imunoestimulatórias *in vitro*;

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a hipotética correlação entre o modelo celular utilizado e culturas primárias de linfócitos B humanos quanto à responsividade a diferentes estímulos de imunomodulação, conforme padronizado neste estudo;
- Aprofundar os estudos quanto à atividade imunoestimulatória de polissacarídeos isolados de *A. subrufescens* e sua possível aplicação biotecnológica;
- Realizar a prospecção de diferentes compostos de origem natural ou sintética com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B;
- Implementar estudos de citometria de fluxo sobre o modelo experimental empregado para a análise de possíveis variações na expressão imunofenotípica frente à estímulos de imunomodulação como parâmetro de avaliação alternativo;

REFERÊNCIAS

ABBAS, A., LICHTMAN, K. ANDREW, H; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**, 6th. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 566p, 2010.

AL HADIHTY, A. Y. F.; DE BOER. N. F. K.; DERIJKS, L.J.J.; ESCHER, J. C.; MULDER, C.J.J.; BROUWERS, J.R.B.J. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, p. 282-297, 2005.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R., SINCERO, T. C. M., SILVA, A. C., SAVI, L. A., GAIDO, C. M., BETTEGA, J. M. R., FARIAS, M. R., BARARDI, C. R. M., SIMÕES, C. M. O. Antiviral evaluation of Brazilian medicinal plants from Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, p.374-378, 2005.

BARILE, F. A. **In vitro cytotoxicology**: mechanisms and methods, 1st ed. Florida: CRC Press, 222p. 1994.

BARTEM, M.K.; DHEIN, S.; CHANG, H.; BITTNER, H.; TARNOK, A.; RHAMEL, A.; MOHR, F.; GUMMERT, J.F. Assessment of immunosuppressive drug interactions: inhibition of lymphocyte function in peripheral human blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, p.

BERTRAM, E. M.; JILBERT, A. R.; KOTLARSKI, I. An homologous in vitro assay to detect lymphokines released by PHA-activated duck peripheral blood lymphocytes and spleen cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 1-2, p. 163-174, 1997.

BISHOP, G. A.; HOSTAGER, B.S. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 278-295, 2001.

BJÖRKLUND, M.; FORNI, L.; COUTINHO, A. T-cell-dependent modulation of the polyclonal_B-lymphocyte responses in normal spleen

cell cultures stimulated by lipopolysaccharide. **Annales de l'Institut Pasteur / Immunologie**, v. 138, n. 2, p. 181-199, 1987.

BLOON, B.; SPITS, H. Development of human lymphoid cells. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p.287–320, 2006.

BOOTH, J.; WILSON, H.; JIMBO, S.; MUTWIRI, G. Modulation of B cell responses by Toll-like receptors. **Cell Tissue Research**, v. 10, p. 1031-1041, 2010.

BORCHES, A. T.; STEMS, J. S.; HACKMAN, R. M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Mushrooms, tumors, and immunity. **Proc. Soc. Experimental Biological Medicine**, v. 221, n. 4. p. 281– 93, 1999.

BOSSON, C.; SCHNEIDER, P. BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling. **Seminars in Immunology**, v.18 p. 263–275, 2006.

BROCCHINI, S. Combinatorial chemistry and biomedical polymer development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 53, p. 123-130, 2001.

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.

BURGERMEISTER, E.; ENDL, E.; SCHEUER, W., V. Activation of cytosolic phospholipase A2 in human T-lymphocytes involves inhibitor-kappaB and mitogen-activated protein kinases. **European Journal of Immunology**, v. 466 n. 1-2, p. 169-80, 2003.

BLANK, M. ; SHOENFELD, Y. B cell targeted therapy in autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 28, p. 62 – 68, 2007.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMELINI, C. M. **Produção de biomassa do fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólido e submerso para obtenção de polissacarídeos bioativos.** 2010, 145p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CARDINAL, J.; PRETORIUS, C.J.; UNGERER, J. P. J. Biological and diurnal variation in glucocorticoid sensitivity detected with a sensitive *in vitro* dexamethasone suppression of cytokine production assay. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 8, p. 001-007, 2010.

CELMER, A. J. **Padronização de técnica de RT-PCR para triagem de *in vitro* de compostos com potencial atividade imunomodulatória em macrófagos.** 2010, 82p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CHAPEROT, L.; PLUMAS, J.; JACOB, M.; BOST, F.; MOLENS, J.; SOTTO, J.; BENZA, J. Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas. **Experimental Hematology**, v. 27, p. 479–488, 1998.

CHAVÉZ, J. H. **Avaliação da atividade anti-rábica *in vitro* de compostos fenólicos sintéticos.** 2005, 112p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycological Research**, v.111 p. 635 – 652, 2007.

CHENG, P. P. J.; SREEDHARAN, S. P.; KISHIYAMA, J. L.; GOETZL, E. J. The SKW 6.4 line of human B lymphocytes specifically binds and responds to vasoactive intestinal peptide. **Immunology**, v. 79, p. 64-68, 1993.

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

COLLINGE, M.; COLE, S.H.; SCHNEIDER, P. A.; DONOVAM, C. D.; KAMPERSCHOER, C.; KAWABATTA, T.T. Human lymphocyte activation assay: an in vitro method for predictive immunotoxicity testing. **Journal of Immunotoxicology**, v. 7, n. 4, p. 357-366, 2010.

CONTANZO, C.; PIACENTINI, G.; VICENTINI, L. ; ARMENANTE, F.; MAZZI, P.; SAVIO, C.; FAGGIOLI, L.; BONER, A.; PALMIERI, M. Cell-Specific Differences in the Regulation of IL-6 Expression by PMA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, p. 577–581, 1999.

DELARCHE, C.; CHOLLET-MARTIN, S. Plasma cytokines: what we are measuring. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v. 2, n. 6, p. 475-9, 1999.

DONO, M.; CERUTTI, G.; ZUPO, S. Cells in focus: The CD5+ B-cell. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 2105–2111, 2004.

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.

ENGVALL, E. PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

FAGUNDES, D., J.; TAHA, M., O. Animal disease model: choice's criteria and current animals specimens. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol.19, n.1, p. 59-65, 2004.

FIGUERAS, A.; SANTAREM, M. M.; NOVOA, B.. Influence of the sequence of administration of beta-glucans and a *Vibrio damsela*

vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus L.*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 1, p. 59 – 68, 1998.

GOLDSBY, R., A.; KINDT, T.; J.; OSBORNE, B., A.; KUBY, J. **Imunologia de Kuby**, 6. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2008.

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

GRIMALDI, C.M. ; HILL, L. ; XU.X. ; PEEVA, E. ; DIAMOND, B. ; Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. **Molecular Immunology**, v.42, p 811–820, 2005.

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

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. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 3, p. 399-405, 2009.

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

HARNETT, M. M.; KLATZ, E.; FORD, C. Differential signalling during B-cell maturation. **Immunology Letters**, v. 98, p. 33–44, 2005.

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

HIRANO, T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 86, n. 17, p. 717-730, 2010.

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

JONSSON, C. A.; CARLSTEN, H. Mycophenolic acid inhibits inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and suppresses immunoglobulin and cytokine production of B cells. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 31-37, 2003.

KAWAMOTO, T.; GHODA, E.; IJI, H.; FUJIWARA, M.; YAMAMOTO, I. SKW 6.4 cell differentiation induced by interleukin 6 is stimulated by butyrate. **Immunopharmacology**, v. 40, p. 119-130, 1998.

KLEIN, G.; KLEIN, E.; KASHUBA, E. Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 67-73, 2010.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom and its synonyms. **Mycologia**, v. 97, p. 12-24, 2005.

KIM, Y. O.; HAN, S. B.; LEE, H. W.; AHN, H. J.; YOON, Y. D.; JUNG, J. K.; Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. **Life Sciences**, v. 77, p. 2438-2456, 2005.

KOEPER, M., L.; VOHR, H., W.. Functional assays are mandatory for a correct prediction of immunotoxic properties of compounds *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 110-118, 2009.

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.

KONKZ, G.; BODOR, C.; KÖVESDI, D.; GATI, R.; SÁRMARI, G. BCR mediated signal transduction in immature and mature B cells. **Immunology Letters**, v. 82, p. 41-49, 2002.

KRAJ, M.; KOPÉC-SZŁĘZAK, J.; POGLÓD, R.; KRUK, B. Flow cytometric immunophenotypic characteristics of 36 cases of plasma cell leukemia. **Leukemia Research**, 2010, *In Press*.

KRAMS, S. M.; MARTINEZ, O. M. Epstein Barr Virus, Rapamycin, and Host Immune Responses. **Current Opinions in Organ Transplantation**, v. 13, n. 6, p. 563–568, 2008.

KRAUPPMANN, D.; PATKE, A.; HEISSMAYER, V.; SCHEIDREIT, C. B-Cell Receptor- and Phorbol Ester-Induced NF- κ B and c-JunN-Terminal Kinase Activation in B Cells Requires Novel Protein Kinase C's. **Molecular and Cellular Biology**, v.21, n. 19, p. 6640–6650, 2001.

KRISTENSEN, F.; KRISTENSEN, B.; LAZARY, S. The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 3, n. 1-2, p. 203-277, 1982.

KUBOTA ,N.; WADA, K.; ITO, Y.; SHIMOYANA, Y.; NAKAMURA, N.; NISHIYAMA, Y.; KIMURA, H. One-step multiplex real-time PCR assay to analyse the latency patterns of Epstein-Barr virus infection. **Journal of Virology Methods**. v. 147, n. 1, p. 26-36, 2008.

KURIBAYASHI, J.; BOMBARDIERI, C. R.; BARAVACHO, G. V.; ALIBERTI, J.; MACHADO, F. S.; KALIL, J.; GUILHERME, L.; KOKRON, C. M.; RIZZO, L. V.; CAMARGO, M. M. Slower rescue of ER homeostasis by the unfolded protein response pathway associated with common variable immunodeficiency. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 2990–2997, 2008.

KUROZAKI, T. Regulation of B cell fates by BCR signaling components. **Current Opinion in Immunology**, 14, p. 341–347, 2002.

LI, X.; XU, W. TLR4-mediated activation of macrophages by the polysaccharide fraction from *Polyporus umbellatus*(pers.)Fries. **Journal of Ethnopharmacology**, *In Press*, 2010.

LIMA, J. E.; SAMPAIO, A.; HENRIQUES, M.; BARJA-FIDALGO, C. Lymphocyte activation and cytokine production by *Pisum sativum* agglutinin (PSA) in vivo and in vitro. **Immunopharmacology** v. 41, p. 147–155, 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.

LIU, G. Q.; WANG, X. L. Biotechnological products and process engineering: Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 78-83, 2007

MACHADO JUNIOR, J.C.; FLORÃO, A.; MATTANA, F.; ROCHA, F. H.; SANTOS, C.A.M.; WELLFORT-SANTOS, A. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 645-655, 2006.

MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., SOARES, C.O.. Princípios , padronização e validação de provas sorológicas. In: **Imunodiagnóstico em medicina Veterinária**, EMBRAPA (Campo Grande- Mato Grosso do Sul- Brasil), p. 145-175, 2001

MANET, E.; BOURILLOT, P.; WALTZER, L.; SERGEANT, A. EBV genes and B cell proliferation. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, p. 129–137, 1998.

MANJARREZ-ORDUNO, N.; QUACH, T. D.; SANZ, I. B cells and immunological tolerance. **Journal of Investigative Dermatology**, v.129, p. 278-288, 2009.

MALTZMAN, J. S.; KORETZKY, G. A. Azathioprine: old drug, new actions. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, n. 8, p. 1122-1124, 2003.

MANDAL C.; CHOWDHURY, M. The polyclonal activation of lymphocytes and T cell mitogenicity by a unique sialic-acid-binding lectin from the hemolymph of *Achatina fulica* snail.

Immunopharmacology, Volume 20, n. 2, September-October 1990, Pages 63-72.

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.

MARAKALALA, M. J.; KERRIGAN, A. M.; BROWN, G. Dectin-1: a role in antifungal defense and consequences of genetic polymorphisms in humans. **Mammalian Genome**, v. 22, n.1-2, p.55-65, 2010.

MAYER-WENTRUP, F.; FIDGOR, C. G.; AMSENS, M.; BROSSART, P.; WHITE, M. D.; ADEMA, J. G.; VAN SPRIEL, A. Dectin-1 Interaction with Tetraspanin CD37 Inhibits IL-6 Production. **Journal of Immunology**, v. 178, p. 154-162, 2007.

MIGOZUSHI, M.; BHAN, A. K. A case for regulatory B cells. **Journal of Immunology**, v.176, p. 705–710, 2006.

MINGOIA, R.T.; NABB, D.; YANG, C.; HAN, X. Primary culture of rat hepatocytes in 96-well plates: Effects of extracellular matrix configuration on cytochrome P450 enzyme activity and inducibility, and its application in *in vitro* cytotoxicity screening. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 165–173, 2006.

MIURA, K.; ORCUTT, A.C.; MURATOYA, O. V.; MILLER, L. H.; SAUL, A.; LONG, C.A. Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 193-200, 2008.

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.

MOND, J. J.; FEUERSTEIN, S.; JUNELL, C. H.; BALAPURE, S.; GLARZELL, R.; WHITERSPOON, K.; BRUNSWIK, M. Bimodale Effect of phorbol ester on B Cell activation: implication for role of protein kinase C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 7, p. 4458-4463, 1991

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

NATARAJ, S.; SHCOMÄCKER, R.; KRAUME, M.; MISHRA, I. M.; DREWS, A. Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during crossflow membrane filtration. **Journal of Membrane Science**, v. 308, p. 152–161, 2007.

NEPUMOCENO, R. R.; BALATONI, C.; NATKUNAN, Y.; MARTINEZ, O. M. Rapamycin inhibits the interleukin 10 signal transduction pathway and the growth of Epstein Barr virus B-cell lymphomas. **Cancer Research**, v. 63, p. 4472–4480, 2003.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 3, p. 297-305, 2002.

OGHA, S.; NOMURA, S.; TAKADA, H.; HARA, T. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 203-215, 2002.

OLLILA, J.; VIHINEM, M. Cells in focus: B cells **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 518–523, 2005.

OLSSON, I.; JOHANSSON, E.; BERTNSSON, M.; ERIKSSON, L.; GOTTFRIES, J.; WOLD, S. Rational DOE protocols for 96-well plates. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 83, p. 66–74, 2006.

OOI, V. E.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide – protein complexes. **Current Medical Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 715-729, 2000.

PASETTI, G. Triagem *in vitro* de compostos naturais ou sintéticos com potencial atividade imunomodulatória em células Jurkat:

padronização da reação de RT-PCR para detecção da expressão do mRNA da interleucina-2. 2009, 87p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

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.

PIZA, A. T. ; SANTOS, J. L. ; CHAVES, L. B. ; ZANETTI, C. R. . An Elisa Test Suitable For The Detection Of Virus Neutralizing Antibodies In Serum Samples From Human Vaccinated With Either Cell-Culture Vaccine Or Suckling Mouse Brain Vaccine. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 39-43, 1999.

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.

RALPH, P.; SAIKI, O.; MAURER, D., H.; WELTE, K. IgM and IgG secretion in human B-cell lines regulated by B-cell-inducing factors (BIF) and phorbol ester. **Immunology Letters**, v. 7, n. 1, p. 17-23, 1983.

SAIKI, O.; RALPH, P. Clonal differences in response to T cell replacing factor (TRF) for IgM secretion and TRF receptors in a human B lymphoblast cell line. **European Journal of Immunology**, v. 13, p. 31-34, 1983.

SAKATA, A.; KUWAHARA, K.; OHMURA, T.; INUI, S.; SAKAGUCHI, N. Involvement of a rapamycin-sensitive pathway in

CD40-mediated activation of murine B cells *in vitro*. **Immunology Letters**, v. 68, p. 301–309, 1999.

SAKATA, A.; KUWAHARA, K.; OHMURA, T.; INUI, S.; SAKAGUSHI, N. Involvement of a rapamycin-sensitive pathway in CD40-mediated activation of murine B cells *in vitro*. **Immunology Letters**, v. 68, p. 301–309, 1999.

SAKUMA, S.; KATO, Y.; NIHSIGAKI, F.; MAGARI, K.; MIYATA, OHKUBO, Y.; GOTO, T. Effects of FK506 and other immunosuppressive anti-rheumatic agents on T cell activation mediated IL-6 and IgM production *in vitro*. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 749–757, 2001.

SAMITAS, K.; LÖTVALL, J.; BOSSIOS, A. B cells: from early development to regulating allergic diseases. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 58, p. 209-225, 2010.

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.

SCHROLL, S.; SARLETTE, A.; AHRENS, K.; MANNS, M. P.; GÖKE, M. Effects of azathioprine and its metabolites on repair mechanisms of the intestinal epithelium *in vitro*. **Regulatory Peptides**, v. 131, p. 1-11, 2005.

SHU, C. H.; WEN, B. J.; LIN, K. J. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- α release capability of macrophage cell line RAW 264.7. **Biotechnology letters**, v. 25, p. 2061-2064, 2003.

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.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; IKEHARA, Y.; INAFUKU, K.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 2, p. 103-8, 2001.

SPLAWSKI, J.B.; JELINEK, D. F.; LIPSKY, P. E. Immunomodulatory role of IL-4 on the secretion of Ig by human B cells. **Journal of Immunology**, v. 142, p. 1569–1575, 1989.

SUSUKI, M.; IWASHIRO, M.; TAKATSUKI, F.; KURIBAYASHI, K.; HAMURO, J. Reconstitution of anti-tumor effects of lentinan in nude mice: roles of delayed-type hypersensitivity reaction triggered by CD4-positive T cell clone in the infiltration of effector cells into tumor. **Journal of Cancer Research**, v. 85, n. 4, p. 409– 17, 1994.

TAKACS, M.; BANATTI, F.; KOROKNAI, A.; SEGESDI, J.; SALAMOM, D.; WOLF, H.; NILLER, H. H.; MIRANOVITS, J. Epigenetic regulation of latent Epstein–Barr virus promoters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1799, p. 228–235, 2010.

TAMURA, K.; WOO, J.; BARKI, M.T.; THOMPSON, A.W. Brequinar sodium inhibits interleukin-6-induced differentiation of a human B-cell line into IgM-secreting plasma cells. **Immunology**, v. 79, p. 587-593, 1993.

TARGENSTEIN, L.; MASSEEN, B. G.; RADTKE, S. Differential inhibition of IL-6-type cytokine-induced STAT activation by PMA. **FEBS Letters**, v. 478, p. 100-104, 2000.

TAYLOR, A.L.; WATSON, C.J.E.; BRADLEY, J.A.

Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Critical reviews in Ontology Hematology**, v.56, n. 1, p. 23-46, 2005.

VALE, A.M.; SHROEDER, H. W. Clinical consequences of defects in B-cell development. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 125, n. 4, p. 778-787, 2010.

VAYSBERG, M.; BALATONI, C. E.; NEPUMOCENO, R.R.; KRAMS, S.M. Rapamycin inhibits proliferation of Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas through modulation of cell-cycle protein expression. **Transplantation**, v. 83, p. 1114-1121, 2007.

VAN, Q.; NAYAK, B.M.; REIMER, M.; JONES, P. J. H.; FULCHER, R.G.; REMPEL, C.B. Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus*, *Polygala senega* L., and *Viburnum trilobum* in a cell screening assay. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 487-493, 2009.

VAZ, A. J.; TAKEI, K. ; BUENO, E. C. **Imunoensaios**: Fundamentos e aplicações. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2007.

VITALE, G.; MION, F.; PUCILLO, C. Regulatory B cells: Evidence, developmental origin and population diversity. **Molecular Immunology**, 2010, *In Press*.

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

VOLMANN, J.J.; HELSPER, J. P.; WEI, S.; BAARS, J.; Effects of mushroom-derived β -glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor- κ B transactivation in Caco-2 reporter cells: Can effects be explained by structure? **Molecular Nutrition Food Research**, v. 54, p. 268-276, 2010.

XIAO, Y.; HONGMEI, L.; HONG, Y.; RUGANG, Z. Extraction immunocompetent sections of *Agaricus blazei* Murill polysaccharides by membranes technology. *In: International Conference on Complex Medical Engineering*, 2007.

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.

WALL, F.; HENKEL, R. .D.; STERN, M. P.; JENSON, H. B.; MOYER, M.P. An efficient method for routine Epstein-Barr virus immortalization of human B lymphocytes. *In Vitro Cell Development Biology*, v. 31, p. 156-159, 1995.

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

WILSON, H. M.; WALBAUM, D.; REES, A. J. Macrophages and the kidney. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 13, n. 3, p. 285-90, 2004.

WROBLEWSKI, J.M.; COOPLE, A.; BATSON, L. P.; LANDERS, C. D.; YANNELLI, J. R. Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). *Journal of Immunological Methods*, v. 264, p. 19– 28, 2002.

YOUNG, S. L.; LYDDON, T. D.; JORGENSON, R. L.; MITSFIELD, L. M. Expression of Toll-like Receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 52, n. 1, p. 67–73, 2004.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. *Journal of Pathology*, v. 214, n. 2, p. 161-78, 2007.

ZHAO, X.; LAPALOMBELLA, R.; TRUPTI, J. Targeting CD37-positive lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical. *Blood*, v. 110, n.7, p. 2569–2577, 2007.