

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Modulação da Ativação de Células B Através de
Abordagem Imunofarmacológica e Bioquímica

Débora Decote Ricardo de Lima

Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo
de Góes, visando à obtenção do grau
de Doutor em Ciências
(Microbiologia).

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Débora Decote Ricardo de Lima

Modulação da Ativação de Células B Através de Abordagem Imunofarmacológica e Bioquímica



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientadora: Lígia Maria Torres Peçanha

Co-orientadora: Luciana Barros de Arruda Hinds



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
MAIO DE 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Débora Decote Ricardo

**Modulação da Ativação de Células B Através de Abordagem
Imunofarmacológica e Bioquímica**

Débora Decote Ricardo de Lima. Rio de Janeiro, UFRJ/IMPPG, 2008.

xix, 124f

Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)]

Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2008.

Orientadora: Lígia Maria Torres Peçanha

Referências bibliográficas: 9 f

1- Células B; 2-TAPP2; 3- Curcumina; 4- Warifteina; 5- Receptores tipo Toll; 6- Sinalização intracelular.

I. Peçanha, Lígia Maria Torres

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia).

III. Modulação da Ativação de Células B Através de Abordagem Imunofarmacológica e Bioquímica.

Débora Decote Ricardo de Lima

Modulação da Ativação de Células B Através de Abordagem Imunofarmacológica e Bioquímica

Rio de Janeiro 14 de maio de 2008

Aprovada por:

Profa. Lígia Maria Torres Peçanha, professora adjunto, IMPPG/UFRJ (Orientadora)

Profa. Elvira Saraiva, professora adjunto, IMPPG/UFRJ

Profa. Maria Bellio, professora adjunto, IMPPG/UFRJ

Prof. George Alexandre dos Reis, professor titular, IBCCF/UFRJ

Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, pesquisador titular, Fisiologia e Farmacodinâmica/Fiocruz

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro e no National Jewish Medical and Research Center, sob a orientação da Professora Lígia Maria Torres Peçanha.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter criado em mim a persistência para recomeçar e a alegria de poder realizar alguns projetos.

A minha mãe e minha irmã que me deram suporte nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo Célio, companheiro de todas as horas.

Ao meu filho amado Matheus, que contribuiu para esse trabalho abrindo mão do meu convívio por vários meses e que muitas vezes dormiu chorando de saudade.

A Professora Lígia Maria Torres Peçanha pela orientação segura ao longo desse trabalho, pelo exemplo de profissionalismo ético, por ter me ensinado a gostar de células B, pelo apoio e acima de tudo pela amizade e consideração.

Ao Dr John Cambier que me recebeu em seu Laboratório e me deu todo suporte necessário para a realização de parte dos experimentos, por ter me ensinado a gostar de sinalização intracelular, pelo carinho e consideração.

A Professora Luciana Barros de Arruda Hinds pela amizade de tantos anos e pelo convívio no Laboratório de Imunoparasitologia onde aprendemos muito não só sobre ciência, mas também sobre a vida.

Ao Dr Kevin Merrell que foi fundamental na parte bioquímica desse trabalho e por ter me ensinado que o sucesso da amizade entre pessoas extremamente diferentes é o respeito.

A Mark, Flávia, Daniela e Cristina Kuta que foram minha família por vários meses em Denver e encheram de alegria minha solidão.

Ao Sidney Gomes da Costa pelo cuidado no preparo de todo material para os experimentos e pela amizade sincera.

A Karla Chagas que foi muito importante nos experimentos iniciais com a curcumina.

A Juliana Dutra Barbosa da Rocha que é a pessoa mais próxima a mim na bancada, que realizou importantes experimentos sem os quais esse trabalho não teria chegado a termo.

A todos os alunos que são ou estão no Laboratório de Imunoparasitologia: Aline Miranda, Ana Carolina Berbel, Andreza Moura, Carol Lucas, Naiara Rust, Rodrigo Godinho e Thaline Farias pelo carinho e por estarem sempre a volta da minha mesa.

A todos os Professores do Departamento de Imunologia do IMPPG que contribuíram muito com a minha formação científica e a todos os funcionários pelo convívio agradável.

A Professora Thais Souto Padron coordenadora da Pós Graduação do IMPPG que fez o possível para atender as nossas solicitações.

A todas as pessoas (e não são poucas) que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho, o meu sincero agradecimento.

Ao suporte financeiro dado pela: CAPES, CNPq e FAPERJ.

RESUMO

Débora Decote Ricardo de Lima

Modulação da Ativação de Células B Através de Abordagem Imunofarmacológica e Bioquímica

Orientadora: Lígia Maria Torres Peçanha

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

No presente estudo nos propomos a avaliar a modulação negativa da resposta de células B utilizando abordagens experimentais diferentes: investigamos o envolvimento da proteína adaptadora TAPP2 na modulação da ativação de células B e avaliamos o efeito modulador das substâncias curcumina e warifteina na sinalização após ativação. Demonstramos que TAPP2 foi recrutada para a membrana e fosforilada após co-agregação de receptores para Fc de IgG (F γ cRII) e receptor para antígeno de células B (BCR). Essa fosforilação foi diminuída em animais deficientes da molécula SHIP e aumentada em animais anérgicos, sugerindo seu envolvimento na modulação da ativação de células B. A análise da ação moduladora da curcumina em células B ativadas por LPS e outros ligantes de receptores do tipo Toll (TLR) revelou bloqueio da resposta proliferativa e da secreção de imunoglobulinas. Observamos que a translocação do fator de transcrição NF κ B foi bloqueado, provavelmente, pela diminuição da fosforilação de I κ B e que as MAPK ERK e

p-38 apresentam fosforilação diminuída após o tratamento com a curcumina. Apesar da inibição marcante da resposta induzida por LPS, a curcumina inibiu de forma mais branda a resposta induzida por ligação a imunoglobulinas de superfície. Estes dados sugerem que a curcumina é um inibidor importante da resposta de células B e que a sinalização via TLR é mais sensível a esta substância. A avaliação do efeito da warifteina no estudo da resposta de células B mostrou que células ativadas por anti-IgM ou ligantes de Toll apresentam inibição da resposta proliferativa. A secreção de imunoglobulinas induzida por ligantes de receptores do tipo Toll também foi diminuída. Algumas moléculas envolvidas na sinalização intracelular apresentam-se afetadas, como o fator de transcrição NFκB, que teve sua translocação para o núcleo bloqueada e a MAPK ERK, que apresentou fosforilação reduzida. Um possível mecanismo de indução desses efeitos parece ter sido a elevação de cAMP intracelular produzido pelo tratamento com a warifteina. Nosso trabalho caracteriza novas moléculas que podem ser utilizadas como reagentes para o estudo dos mecanismos de modulação da ativação de células B e, possivelmente, para regular a ativação excessiva que muitas vezes leva ao surgimento de patologias. Além disso, nossos estudos caracterizam uma nova via de modulação negativa da resposta de células B mediada por TAPP2.

Palavras-chave: 1- Células B; 2-TAPP2; 3- Curcumina; 4- Warifteina; 5- Receptores tipo Toll; 6- Sinalização intracelular.

Rio de Janeiro
Maio de 2008

ABSTRACT

Débora Decote Ricardo de Lima

Modulation of B Cells Activation Through of Approaches Immunopharmacological and Biochemical

Orientadora: Lígia Maria Torres Peçanha

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

In the present study we proposed the evaluation of the negative modulation of B cell response using different experimental approaches: we investigated the involvement of the adaptor protein TAPP2 in modulation of B cell activation and investigated the effect of curcumin and warifteine in activation-induced signaling. We demonstrated that the TAPP2 protein was recruited to the membrane and phosphorylated after FcRII/BCR co-aggregation. This phosphorylation was decreased in SHIP knockout mice and increased in anergic mice, suggesting the involvement of TAPP2 in modulation of B cell activation. The modulatory effect of curcumin in B cell response induced by LPS and others TLR ligands was investigated and were observed that this substance blocked proliferative response and the immunoglobulin secretion. The translocation of NF κ B was blocked. In curcumin treated cells probably drive to a decrease in the phosphorylation of I κ B. The phosphorylation of the MAPK ERK and p-38 was also decreased after curcumin treatment. Besides the

significant decreased in LPS-induced response, curcumin produced a small decrease in the response inducible by BCR ligation. These data suggest that curcumin is an important inhibitor of the B cell response and that the signaling induced by TLR is more sensitive to this substance. The investigation of the warifteine effect in B cell response showed an inhibition of the response of B cells by anti-IgM or TLR ligands. The immunoglobulin secretion induced by TLR ligands was also decreased. The NFκB factor translocation to the nucleus was blocked by warifteine and this substance also decreased the phosphorylation of the MAPK ERK. The possible mechanism for the induction of these effects could be the intracellular cAMP elevation induced by warifteine treatment. Our results characterize new molecules that can be used as reagents to study the mechanism of modulation of B cell response, possibly these substances could be used to regulate the exaggerated activation of B cells during several pathologies. Moreover, our studies characterized a new pathway of the negative modulation in B cell activation by TAPP2.

Key words: 1- B cell; 2- TAPP2; 3- Curcumin; 4- Warifteine; 5-Toll like receptor; 6- Intracellular signaling.

Rio de Janeiro
Maio de 2008

ÍNDICE

	Páginas
1-INTRODUÇÃO	22
1.1 - Receptor para antígenos de células B e seu papel no reconhecimento do antígeno	22
1.2 - Sinalização via BCR	23
1.3 - Ativação via receptores do tipo Toll	26
1.4 - Modulação da ativação de células B	30
1.5 - Proteínas adaptadoras e o envolvimento de TAPP1 e TAPP2 na ativação de células B	35
1.6 – Fitoterápicos	37
1.6.1 - Efeitos imunomodulatórios da curcumina	38
1.6.2 - Efeitos imunomodulatórios da <i>Cissampelos sympodialis</i> e de seu composto wariteína	43
2 – OBJETIVO GERAL	46
2.1 – JUSTIFICATIVA	46
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 – Reagentes	49
3.2 – Animais	50
3.3 – Linhagens celulares	50
3.4 – Produção de TAPP2 recombinante	50
3.5 - Imunização e purificação de anticorpos específicos anti-TAPP2	51
3.6 - Isolamento de células B	51
3.7 - Avaliação do efeito citotóxico de produtos naturais	52
3.8 - Análise da expressão de CD86 por citometria de fluxo	52
3.9 – Mobilização de cálcio intracelular	53
3.10 - Medida da atividade proliferativa de células B	53
3.11 - Dosagem de imunoglobulinas no sobrenadante de culturas	54
3.12 – Imunofluorescência	54

3.13 - Dosagem de adenosina monofosfato cíclico	55
3.14 - <i>Western blotting</i>	55
3.15 – Preparação de anticorpo anti-TAPP2 ligado a sefarose	57
3.16 – Imunoprecipitação de TAPP2 e coloração direta em gel por Sypro Ruby	57
3.17 - Dosagem de NFκB em extratos nucleares por EMSA	58
3.18 - Análises estatísticas	58
4 – RESULTADOS	59
4.1 - PARTE I – Caracterização do envolvimento de TAPP2 na modulação da ativação de células B	59
4.1.1 - Preparo de TAPP2 recombinante	59
4.1.2 – Reconhecimento de uma única banda de aproximadamente 50 kDa em lisados e imunoprecipitados de células A20	59
4.1.3 - Avaliação da eficiência de retirada de TAPP2 de lisados de células A20	60
4.1.4 - Proteínas obtidas por eluição de imunoprecipitados com anti-TAPP2	60
4.1.5 - Fosforilação de TAPP2 em células A20 estimuladas com anti-IgM intacta	60
4.1.6 - Fosforilação de TAPP2 em células B purificadas de animais deficientes em SHIP	61
4.1.7 - Fosforilação de TAPP2 em células B de animais anérgicos ARS	61
4.1.8 – Recrutamento de proteínas TAPP2 para a membrana após a co-agregação de receptores FcγRII/BCR	62
4.2 - PARTE II – Efeitos imunomoduladores da curcumina em células B	62
4.2.1 – Verificação da citotoxicidade da curcumina em células B	62
4.2.2 - Efeito da curcumina na resposta de células B estimuladas por	

ativadores policlonais	63
4.2.3 – Efeito da curcumina na transdução de sinal em células estimuladas por LPS ou anti-IgM	64
4.3 - PARTE III – Efeito imunomodulador da warifteina em células B	65
4.3.1 – Verificação da citotoxicidade da warifteina em células B	65
4.3.2 – Efeito da warifteina na ativação induzida por ativadores policlonais de células B	66
4.3.3 – Efeito da warifteina na sinalização intracelular em células B ativadas	67
4.3.4 – Efeito da warifteina na concentração intracelular de cAMP	67
5 – FIGURAS	69
6 – DISCUSSÃO	97
7 – CONCLUSÕES	108
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
9 – ANEXOS – Artigos submetidos	120

SIGLAS E ABREVIATURAS

- A20 – Linfoma de células B de camundongos BALB/c
- AC – Adenilatociclase
- AFL – Fração aquosa do extrato hidroalcoólico de folhas de *Cissampelos sympodialis*
- Ag – Antígeno
- AP-1 – Ativador de proteína 1
- bcl-XL - gene supressor de tumor *p53*
- BCR – Receptor da célula B
- BJAB - Linfoma humano de células B
- Blk – Membro da família das proteínas quinases Tec
- BLNK – *B-cell linker*
- Btk - Bruton tirosina quinase
- BKS-2 - Células B imaturas oriundas de linfoma
- cAMP - Adenosina 3', 5'- monofosfato cíclica
- C57BL/6 SHIP -/- – Camundongo isogênico da linhagem C57BL/6 desprovido da molécula SHIP
- C57BL/6 ARS – Camundongo isogênico da linhagem C57BL/6 anérgicos por possuírem BCR que reconhecem peptídeos endógenos, além de reconhecerem o hapteno azofenil arsonato
- CD80 – Molécula co-estimulatória B7.1
- CD86 – Molécula co-estimulatória B7.2
- Cdc25C – Gene associado à divisão do ciclo celular com homologia 25C
- Cdk – Quinase dependente de ciclina
- c-myc – Fator de transcrição de oncogene
- Con A - Concanavalina A
- CpG – Oligodeoxinucleotídeo com sequências CpG, ligante de Toll 9
- Csk - Proteína da família Src quinase
- DAG – Diacilglicerol
- DAUDI – Linfoblasto humano
- DNA – Ácido desoxirribonucléico

EL4 – Linfoma de células T de camundongos C57BL/6
erg-1 – *Immediate early growth response factor*
ERK- MAP quinase ERK
Fc γ RII – Receptor para porção Fc de IgG
Fyn – Proteína quinase associada à família Src
GEF – Fator de troca de nucleotídeos guanina
GM-CSF – Fator estimulador de crescimento de granulócito e monócito
HSP – Proteína de choque térmico
HTLV-1 – Vírus T linfotrópico humano 1
ICER - Repressor precoce induzido por cAMP
Ig – Imunoglobulina
IgM – Imunoglobulina M
IgG – Imunoglobulina G
IgG F(ab')₂ – Fragmento Fab de imunoglobulina G
IL – Interleucina
I κ B – Proteína inibidora do NF κ B
INF - Interferon
IP₃ - Inositol 1,4,5 trifosfato
IRAK - Proteína quinase associada ao receptor IL-1
IRF3 - Fator regulador de interferon
JNK – MAP quinase JNK
LPS – Lipopolissacarídeo
ITAM - Padrão de ativação baseado em tirosina de imunoreceptores
ITIM - Padrão de inibição baseado em tirosina de imunoreceptores
Lyn – Proteína quinase associada a família Src
MHC II – Molécula do complexo principal de histocompatibilidade classe II
MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MyD88 – Proteína adaptadora associada ao TLR
NFAT – Fator nuclear de ativação da célula T
NF κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B
NKTL - Linfoma de *natural killer*/células T

Nrf2 - Fator redutor nuclear
p38 – MAP quinase p38
Pam3CysSerLys4 – Ligante de Toll 2
PCR – Reação em cadeia de polimerase
PDE – Proteína da família das fosfodiesterases
PDZ – Domínios que auxiliam na ancoragem de proteínas transmembranares ao citoesqueleto
PGE2 - Prostaglandina E2
PH - Domínios de homologia com *pleckestrins*
PHA - Fitohemaglutinina
PI3K - Fosfatidilinositol 3 quinase
PI(4,5)P₂ - Fosfatidilinositol 4,5, difosfato
PI(3,4,5)P₃ - Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PKA – Proteína quinase A
PKC - Proteína quinase C
PKR - Proteína quinase R
PLC γ - Fosfolipase C γ
PMA – Acetato miristático forbólico
PTB – Domínio de ligação a fosfotirosina
Raji – Linfoma de células B humanas
SH – Domínio com homologia a Src
SHP - Proteína que apresenta domínio SH2 com atividade tirosina fosfatase
SHIP - Proteína que apresenta domínio SH2 com atividade inositol fosfatase
Src – Proteínas tirosinas quinases associadas aos receptores
STAT – Tradutor de sinal e ativadores da transcrição
Syk – *Spleen tyrosine kinase*
ROS - Espécies reativas do oxigênio
TAK – Quinase ativada por TGF β
TAPP – *Tandem PH domain containing protein*
TBSM - Moléculas transdutoras de sinal via sinalização baseada em padrões de tirosina
TD – Timo dependente

TGF β - Fator transformador de crescimento beta

TI – timo independente

TIR - Receptor Toll-IL-1

TIRAP- Receptor Toll-IL-1 contendo proteína adaptadora

TRIF- Proteína adaptadora com domínio TIR induzida por INF- β

TRAM – Molécula adaptadora associada a TRIF

TRAF – Fatores associados aos receptores de TNF

TLR - Receptor do tipo Toll

V79 – Fibroblastos de hamster

WW – Domínios com resíduos de triptofano

YAC-1 – Linfoma de camundongos A/Sn

XIAP – Proteína inibidora da apoptose ligada ao cromossoma X humano

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Seleção de colônias positivas para a proteína TAPP2	69
Figura 2. Avaliação da especificidade do anticorpo para a proteína TAPP2 em lisados e imunoprecipitados de células A20	70
Figura 3. Avaliação da eficiência da retirada de TAPP2 de lisados de células A20 estimuladas utilizando esferas de sefarose ligadas ao anticorpo anti-TAPP2	71
Figura 4. Proteínas ligadas a anticorpos anti-TAPP2 ligados a sefarose obtidas por eluição possuem peso molecular de aproximadamente 50kDa	72
Figura 5. Fosforilação de TAPP2 em células A20 estimuladas	73
Figura 6. Fosforilação de TAPP2 em animais deficientes de SHIP	74
Figura 7. Fosforilação de TAPP2 em células B de animais anérgicos ARS após co-agregação FcγRII/BCR	75
Figura 8. Recrutamento de TAPP2 para a membrana após co-agregação FcγRII/BCR	76
Figura 9. Avaliação da citotoxicidade da curcumina em células B	77
Figura 10. Efeito da curcumina na resposta proliferativa de células B estimuladas por ativadores policlonais	78
Figura 11. Efeito da curcumina na secreção de IgM por células B estimuladas com LPS	79
Figura 12. Efeito da curcumina na expressão de moléculas co-estimulatórias em células B estimuladas por LPS ou anti-IgM	80
Figura 13. Efeito da curcumina no perfil de fosforilação em resíduos de tirosinas de proteínas totais de células B estimuladas com ligantes de receptores do tipo Toll e anticorpo anti-IgM	81
Figura 14. Efeito da curcumina na mobilização de cálcio intracelular em células B estimuladas com anti-IgM	82
Figura 15. Efeito da curcumina na fosforilação de MAPKs em células B estimuladas com ligantes de receptores do tipo Toll e anticorpo anti-IgM	83
Figura 16. Efeito da curcumina na translocação do fator NFκB para o	

núcleo de células B estimuladas com LPS	84
Figura 17. Efeito da curcumina na fosforilação de I κ B em células B ativas	85
Figura 18. Avaliação da citotoxicidade da warifteina em células B	86
Figura 19. Avaliação da citotoxicidade da warifteina em células DAUDI	87
Figura 20. Efeito da warifteina na resposta proliferativa de células B estimuladas com LPS	88
Figura 21. Efeito da warifteina na proliferação de células B estimuladas por ligantes de receptores do tipo Toll	89
Figura 22. Cinética do efeito da warifteina na ativação de células B estimuladas por ativadores policlonais	90
Figura 23. Efeito da warifteina na expressão de moléculas co-estimulatórias em células B estimuladas por LPS ou anti-IgM	91
Figura 24. Efeito da warifteina na secreção de imunoglobulinas de células B estimuladas por ligantes de receptores do tipo Toll	92
Figura 25. Efeito da warifteina no perfil de fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas totais de células B estimuladas com LPS ou anti-IgM	93
Figura 26. Efeito da warifteina na fosforilação de ERK em células B estimuladas por LPS ou anti-IgM	94
Figura 27. Efeito da warifteina na translocação de NF κ B para o núcleo de células B estimuladas com LPS	95
Figura 28. Análise dos níveis de cAMP em células B estimuladas com LPS e tratadas com warifteina	96

LISTA DE ESQUEMAS

	Páginas
Esquema 1. Sinalização de célula B.	25
Esquema 2. Via de sinalização mediada por TLR3 e TLR4	29
Esquema 3. Modulação da sinalização via Fc γ RII.	32
Esquema 4. Estrutura química da curcumina	39
Esquema 5. Estrutura química da warifteina	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Receptor para antígenos de células B e seu papel no reconhecimento do antígeno

As células B apresentam como receptor para antígenos moléculas de imunoglobulinas (Ig) de superfície (BCR). Esse receptor apresenta, além da Ig de superfície, duas cadeias acessórias denominadas de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (Kurosaki *et al.*, 1998). Este receptor permite o reconhecimento antigênico por células maduras e imaturas e induz sinalização intracelular após este reconhecimento.

Os sinais propagados pelo receptor para antígenos da célula B (BCR) são cruciais para a sobrevivência, maturação e resposta a antígenos. Defeitos na transdução de sinais via BCR podem resultar no comprometimento da maturação, estados de imunodeficiências e predisposição a autoimunidade (Gauld *et al.*, 2002).

A interação do antígeno com o BCR pode induzir ativação das células B. Após esta ativação ocorre aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC II), mobilização de cálcio, fosforilação de proteínas por proteínas tirosina quinases e, dependendo da intensidade do estímulo, proliferação (Mills *et al.*, 2004). O BCR é rapidamente internalizado logo após a ligação ao antígeno e degradado. No caso da ligação de antígenos protéicos estes são metabolizados e os peptídeos gerados são apresentados na membrana ligados a moléculas de MHC de classe II. Esses peptídeos serão reconhecidos por células T que, através de uma interação cognata com as células B, fornecerão o contato com moléculas importantes para ativação e produzirão fatores solúveis indispensáveis ao processo de ativação. Células B assim ativadas podem, então, proliferar e se diferenciar em células produtoras de imunoglobulinas e células de memória. Para que estes eventos sejam possíveis, é indispensável à participação efetiva das células T (Mills *et al.*, 2004). Devido a esse requerimento, os antígenos protéicos são chamados de antígenos timo-dependente (TD).

Na sinapse formada entre as células B e T ocorre a interação entre as moléculas CD40 presentes na célula B e o ligante do CD40 (CD156) expresso nas células T ativadas e são secretadas citocinas que atuam sobre células B (Banchereau *et al.*, 1994). Vem sendo postulado por longo tempo que a ligação do BCR ao antígeno seria o primeiro sinal para a ativação. A interação com as células T funcionaria como o segundo sinal, e esses eventos

seriam suficientes para a proliferação e diferenciação das células B em plasmócitos secretores de imunoglobulinas (Parker, 1993).

O BCR é também capaz de interagir com antígenos não protéicos, como é o caso dos polissacarídeos. Nesse caso, no entanto, não há a necessidade de contato direto com células T. Por isso esses antígenos são denominados antígenos timo-independente (TI). Os antígenos TI que ligam ao BCR e induzem resposta antígeno específica são denominados antígenos TI do tipo 2 (TI-2). Estas moléculas são, em geral, polissacarídeos que possuem estruturas altamente repetitivas e promovem extensas ligações ao BCR na superfície da célula (Gavin *et al.*, 2004). A resposta a antígenos TI-2 desempenha um importante papel na defesa do organismo contra patógenos cujos antígenos de superfície desencadeiam respostas que independem da participação direta das células T.

1.2 - Sinalização via BCR

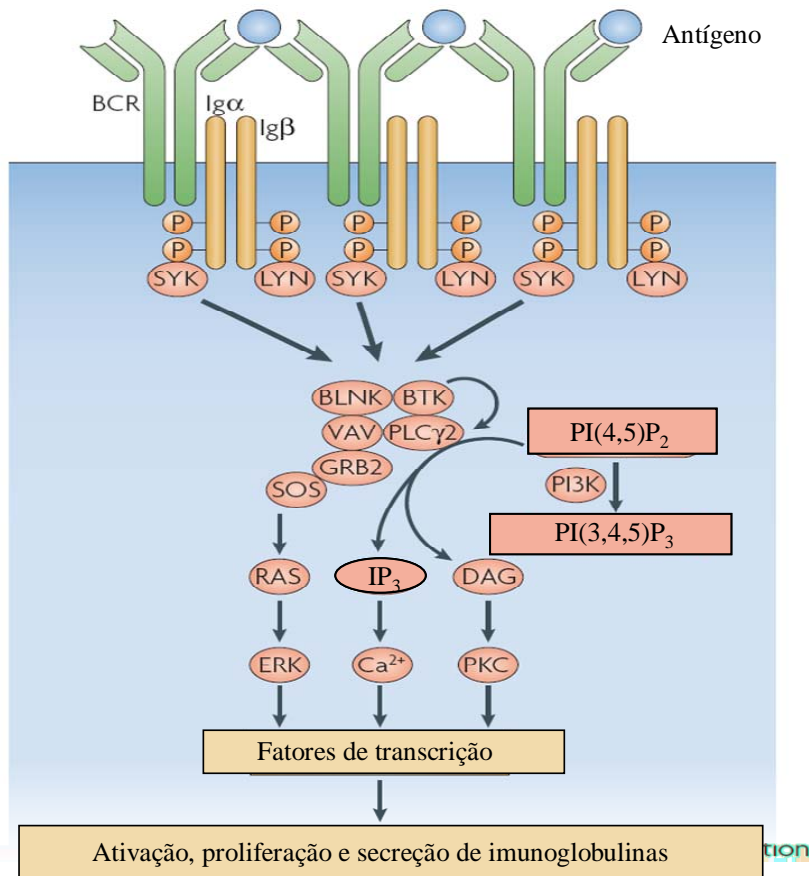
A sinalização via BCR é iniciada após a agregação e posterior fosforilação de resíduos de tirosina localizados nas cadeias acessórias $Ig\alpha$ e $Ig\beta$. Estas cadeias acessórias apresentam dois resíduos de tirosina com espaçamentos característicos denominados padrão de ativação baseado em tirosina de imunoreceptores (ITAM), que sofrem fosforilação por proteínas tirosinas quinases ativadas após ligação do antígeno ao BCR. Tanto a $Ig\alpha$ quanto a $Ig\beta$ possuem uma seqüência ITAM (Pao *et al.*, 1998). A fosforilação simultânea dos dois resíduos de tirosina por proteínas da família de proteínas quinases Src (como Lyn, Fyn ou Blk) resulta no recrutamento de outra proteína tirosina quinase conhecida como Syk (Kurosaki *et al.*, 1995). O recrutamento de Syk pelas cadeias acessórias facilita sua fosforilação, ativação e o início tanto de eventos positivos quanto da regulação da ativação. Esses eventos constituem as etapas iniciais da sinalização que serão seguidas de várias outras etapas em cascata, levando a ativação de diversos fatores de transcrição. Após a fosforilação das proteínas quinases citadas acima ocorre a ativação da enzima fosfolipase $C\gamma$ (PLC γ). Esta enzima catalisa a quebra do fosfolipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5, difosfato (PIP $_2$) em inositol 1,4,5 trifosfato (IP $_3$) e diacilglicerol (DAG). O DAG está envolvido no processo de ativação da proteína quinase C, processo este que pode levar a translocação do fator de transcrição NF κ B do citoplasma para o núcleo. O IP $_3$ desempenha

uma função fundamental na liberação de cálcio do retículo endoplasmático, levando ao aumento do cálcio intracitoplasmático. Esse aumento induz a defosforilação do fator nuclear NFAT pela Calcineurina. Após esse processo o NFAT é translocado para o núcleo (De Franco, 1994; Campbell, 1999).

A ativação de duas vias de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases), também é resultante dos eventos iniciais da sinalização. Uma destas vias inicia-se com a fosforilação da proteína trocadora de nucleotídeos (GEF) Vav, induzindo a ativação da proteína G de baixo peso molecular Ras. A outra se inicia pela fosforilação de GEF denominada Sos. Essas GEF ligam-se as moléculas adaptadoras Rac (Crespo *et al.*, 1997) e Ras (Boriack-Sjodin *et al.*, 1998). Esse evento culmina com a ativação das MAP quinases ERK e JNK e, conseqüentemente, com a formação do fator de transcrição AP-1. A translocação dos fatores nucleares para o núcleo da célula dá início a síntese de proteínas indispensáveis a manutenção do estado de ativação e proliferação (Esquema 1).

A sinalização via receptor de células B pode ser aumentada pela mobilização do co-receptor formado pelo complexo de moléculas CD19, CD21 e CD81 (Carter & Barrington, 2004). Esse complexo pode ser coagregado por antígenos que ativam o sistema complemento. O CD21 é um receptor que se liga ao fragmento C3d do complemento. Antígenos que tenham ativado o sistema complemento podem fazer uma ligação cruzada entre o complexo formado por CD21 e as proteínas associadas a ele e o BCR, levando a fosforilação de tirosinas quinases associadas a esse segundo receptor, como as proteínas da família Src. O CD19 é uma molécula expressa desde as etapas iniciais do desenvolvimento da célula B, antes mesmo do CD21 e CD81 serem expressos, e parece contribuir para a sinalização mesmo na ausência de coagregação com o CD21. O CD19 pode associar-se com o receptor de célula B tanto constitutivamente como após ativação do receptor, e contribuir para a sinalização mesmo quando o co-receptor não foi engajado pela ligação de CD21 com fragmentos formados após a ativação do sistema complemento. A importância fisiológica do CD19 foi demonstrada em camundongos deficientes dessa molécula. Esses animais produzem respostas fracas para a maioria dos antígenos (Tedder *et al.*, 1994).

Além da fosforilação em resíduos de tirosina de seqüências ITAMs, a ativação via BCR leva a alteração no padrão de fosforilação de fosfolipídeos da membrana. A enzima



(Modelo adaptado de Cambier *et al.*, 2007)

Esquema 1. Sinalização de célula B. A resposta a estimulação via BCR é seguida pela fosforilação dos resíduos de proteínas quinases localizados nos ITAMs da Ig α e Ig β por proteínas quinases da família SRC. Isso resulta no recrutamento e ativação de SYK, que se torna fosforilada e substrato para BLNK e BTK. Isso leva a ativação da fosfolipase C γ que cliva o fosfolípido de membrana PI(4,5)P $_2$ em inositol trifosfato (IP $_3$) e diacilglicerol (DAG), iniciando, assim, as duas das três principais vias de sinalização para o núcleo. O IP $_3$ libera cálcio (Ca $^{2+}$) das fontes intra e extracelulares, ao passo que DAG ativa a proteína quinase C (PKC) com o auxílio de Ca $^{2+}$. A terceira via é iniciada por fatores de troca de nucleotídeos (GEF) que ativam pequenas proteínas de ligação como Rãs levando a ativação da MAPK ERK. Dessa maneira são ativados os fatores de transcrição para que a célula possa proliferar e secretar imunoglobulinas.

fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) representa um importante regulador do crescimento e diferenciação de células B. A PI3K é mobilizada após a ligação a vários receptores de superfície como, por exemplo, o complexo CD19/CD21. A ativação deste complexo leva a ativação da proteína Bruton tirosina quinase (BTK) que, por sua vez, liga PI3K que, ao ser ativada, gera um segundo mensageiro denominado fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato [PI(3,4,5)P3]. Este PI(3,4,5)P3 será alvo de ligação de outras proteínas solúveis e de proteínas adaptadoras que apresentem domínios PH (domínios de homologia com *pleckestrins*, que apresentam uma seqüência de aminoácidos capaz de ligar a fosfolipídios) (Dowler *et al.*, 2000).

1.3 - Ativação via receptores do tipo Toll

O receptor Toll (TLR) foi descrito inicialmente como um receptor essencial para a defesa contra fungos em *Drosophila melanogaster* (Lemaitre *et al.*, 1996). No ano seguinte seu homólogo em mamíferos foi descrito (denominado de TLR4) e observou-se que esta molécula está envolvida na indução da expressão de genes associados à resposta inflamatória (Medzhitov *et al.*, 1997). Os TLR de mamíferos compreendem uma família de 12 membros descritos até o momento e estão presentes em diferentes tipos celulares (Takeda & Akira, 2005). Estruturalmente são proteínas transmembranares que podem estar localizadas na membrana plasmática (TLR2, TLR4) ou no compartimento endossomal (TLR3, TLR9).

O TLR é estruturalmente uma glicoproteína de membrana que possui uma porção intracitoplasmática com domínio rico em prolina denominado TIR (Receptor Toll-IL-1), similar a porções encontradas em receptores de IL-1 (Takeda & Akira, 2004). A ativação é iniciada quando os domínios TIR recrutam uma proteína adaptadora denominada MyD88. A partir do recrutamento e associação com proteínas da família IRAK (proteína quinase associada ao receptor IL-1) ocorre a expressão de fatores de transcrição como o NFκB e o AP-1, que levarão a síntese de proteínas pró-inflamatórias e o início do ciclo celular (Rhee & Hwang, 2000).

O modelo mais estudado para a sinalização via TLR4 é o que utiliza o LPS. Após a interação do LPS com o TLR4 associado à molécula MD2, ocorre a homodimerização do TLR4 ou a dimerização com a molécula RP105 associada a MD1 (Peng, 2005). Em seguida, podem ser iniciadas duas vias de sinalização: uma mediada pela associação de TRIF-TRAM (que é independente de MyD88) ou outra mediada pela associação de TIRAP-MyD88 (que é, dessa maneira, dependente de MyD88). Na via dependente de MyD88 ocorre a ativação de três proteínas quinases: IRAK (proteína quinase associada ao receptor IL-1), TRAF6 e TAK1 (quinase ativada por TGF β), levando a translocação do NF κ B para o núcleo. Na via MyD88 independente são recrutados TRAM e Trif que interagem com TBK1. TBK1 junto com IKKi leva a fosforilação de IRF3 que é translocado para o núcleo e participa da indução de INF α e INF β (Kawai & Akira, 2006).

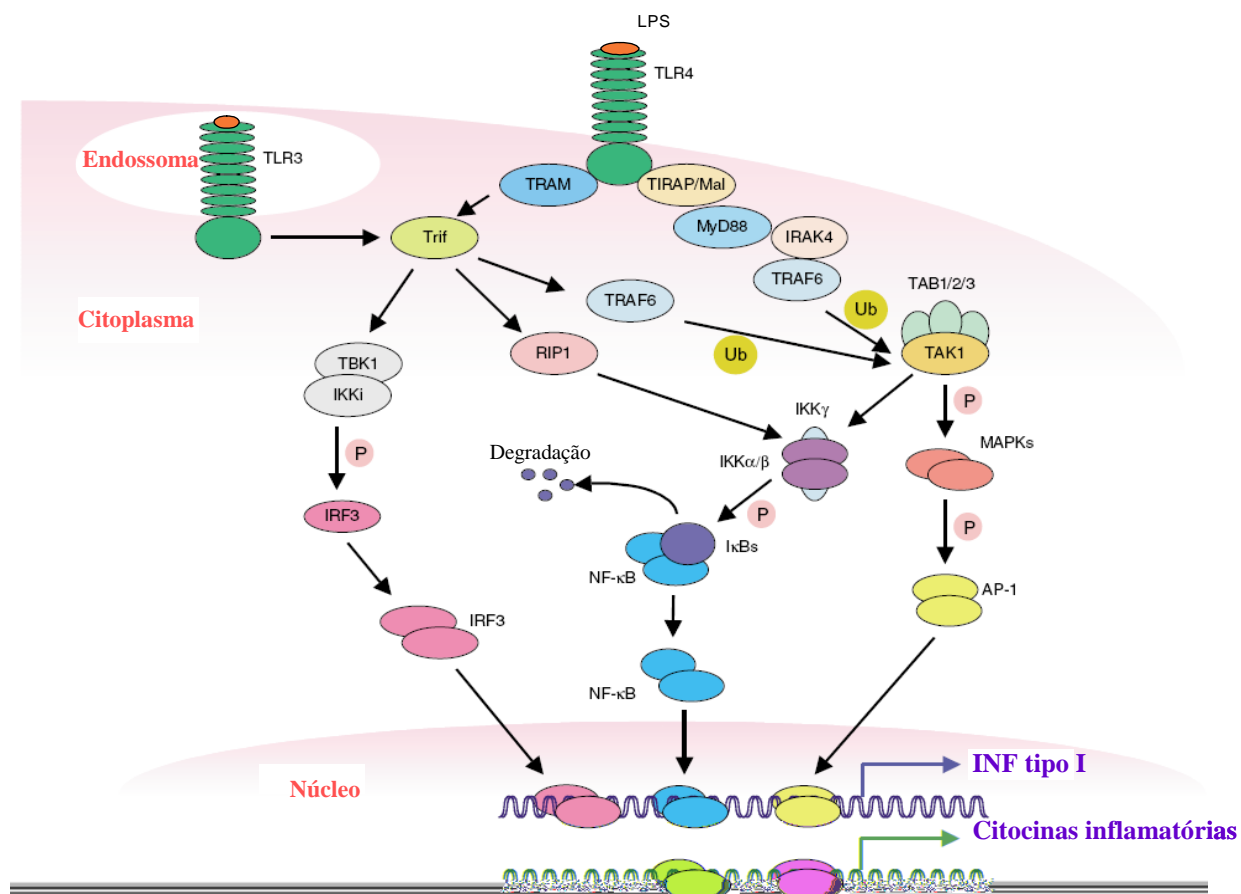
A via de sinalização dependente de MyD88 é utilizada pela maioria dos TLR. No entanto, foi descrito que TLR3 utiliza a molécula TRIF (proteína adaptadora com domínio TIR induzida por INF- β), usando, assim, apenas a via independente de MyD88. Essa via pode levar a produção de interferon do tipo 1 e ativação do NF κ B (Krasowska-Zoladek *et al.*, 2007). Na resposta ao TLR4 pode ser utilizada tanto a via dependente quanto a independente de MyD88 (Esquema 2). O TLR2 utiliza a via de sinalização dependente de MyD88, seguindo a mesma seqüência de eventos ocorridos na sinalização de TLR4 (Takeda & Akira, 2005). O TLR9 sinaliza quando oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG associam-se a este receptor. Esse complexo é então endocitado diretamente ou após a ligação ao BCR. Seguindo a endocitose, as moléculas irão se localizar em lisossomos tardios acidificados onde se ligarão ao TLR9 e iniciará a sinalização pela via dependente de MyD88 (Peng, 2005).

O TLR2 reconhece uma variedade de componentes microbianos, que incluem lipoproteínas/lipopeptídeos de diferentes patógenos, peptideoglicanas e ácido lipoteicoico de bactérias Gram-positivas, lipoarabinomananas de micobactérias, glicosilfosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi*, zimosan de fungos e glicolipídeos de *Treponema maltophilum* (Takeda *et al.*, 2003). O TLR9 é um receptor intracelular capaz de reconhecer oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG. O DNA bacteriano contém estas seqüências CPG não metiladas (o que confere ao complexo atividade imunoestimulatória). Em vertebrados estas seqüências são reduzidas e os resíduos de cisteínas são altamente

metilados, não permitindo a estimulação (Takeda & Akira, 2005). O TLR 9 é capaz, ainda, de reconhecer seqüências CpG de vírus em células dendríticas plasmocitóides (Krug *et al.*, 2004). Além do reconhecimento de seqüências CpG de DNA bacteriano e viral pelo TLR9, a sinalização através deste receptor parece estar associada a patogênese de algumas doenças autoimunes. A ligação de complexos IgG2a-cromatina ao BCR e ao TLR9 é suficiente para mediar a efetiva produção de fator reumatóide por células B autorreativas (Leadbetter *et al.*, 2002).

O TLR4 foi o primeiro receptores do tipo Toll descrito (Rock *et al.*, 1998). Este receptor é essencial para o reconhecimento do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Hoshino *et al.*, 1999). Além disso, o TLR4 está envolvido no reconhecimento de ligantes endógenos como as proteínas de choque térmico (HSP60 e HSP70), o domínio A da fibronectina, oligossacarídeos de ácido hialurônico, heparan sulfato e fibrinogênio. Esses ligantes endógenos só induzem ativação de TLR4 em altas concentrações. Já o LPS é um potente ativador de TLR4, mesmo em pequenas concentrações. Foi demonstrado que a contaminação pelo LPS em preparações de HPS70 conferiu a habilidade para ativar TLR4 (Gao & Tsan, 2003).

As células B possuem uma variedade de receptores do tipo Toll (Dassari *et al.*, 2005). Entretanto, há diferenças marcantes quando comparamos as células B humanas e



(Modelo adaptado de Kawai & Akira, 2006)

Esquema 2. Via de sinalização mediada por TLR3 e TLR4. A ligação do LPS ao TLR4 leva a ativação de TIRAP/MAL e TRAM que são requeridas para a ativação da via dependente de MyD88 e Trif respectivamente. MyD88 recruta IRAK4 e TRAF6 após a estimulação com ligante. TRAF6 ativa o complexo TAK1/TAB1/TAB2/TAB3. O complexo TAK1 ativa o complexo IKK que consiste de IKK α , IKK β , IKK γ /NEMO, que cataliza I κ Bs. Os I κ Bs são fosforilados e liberam o NF κ B que é translocado para o núcleo. Simultaneamente TAK1 ativa a via das MAPk, que resulta na fosforilação e ativação de AP-1. NF κ B e AP-1 controlam a indução de citocinas inflamatórias. TLR4 também recruta TRAM e Trif, que interagem com TBK1. TBK1 junto com IKKi medeiam a fosforilação de IRF3. IFR3 fosforilado é translocado para o núcleo e liga-se ao DNA. Trif também interage com TRAF6 e RIP1, que medeia a ativação de NF κ B. A ativação de IRF3, NF κ B e AP-1 é requerida para a indução de INF α e INF β . TLR3 que reside em vesículas endossomais, utiliza Trif, TBK1 e IRF3 que é translocado para o núcleo.

via TLR para proliferação e diferenciação. Baseado nestes estudos foi sugerido que a sinalização via TLR representaria o terceiro sinal para a ativação.

Vários trabalhos têm mostrado que células B murinas não ativadas respondem a estimulação com LPS e CpG com intensa proliferação e diferenciação, mesmo na ausência de sinalização via BCR ou interação com células T (Bernasconi *et al.*, 2002). Essa resposta decorre, provavelmente, do fato de células B expressarem constitutivamente TLR4 e TLR9, que são receptores para LPS e CpG respectivamente (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Os dados citados, assim, sugerem um importante papel do TLR na ativação das células B.

1.4 - Modulação da ativação de células B

A modulação da ativação de células B é um componente fundamental para o funcionamento normal e sobrevivência dessas células. Assim como existem muitas moléculas que atuam como cofatores para incrementar a ativação, existem outras envolvidas em regular a intensidade dessa ativação.

A associação do BCR com proteínas transmembrana como o CD22, CD72 e CD5 criam uma diversidade de sinais adicionais. A fosforilação de resíduos de tirosinas presentes nestes coreceptores cria sítios de ligação para proteínas que regulam de forma negativa o sinal inicial (Fruman *et al.*, 1999).

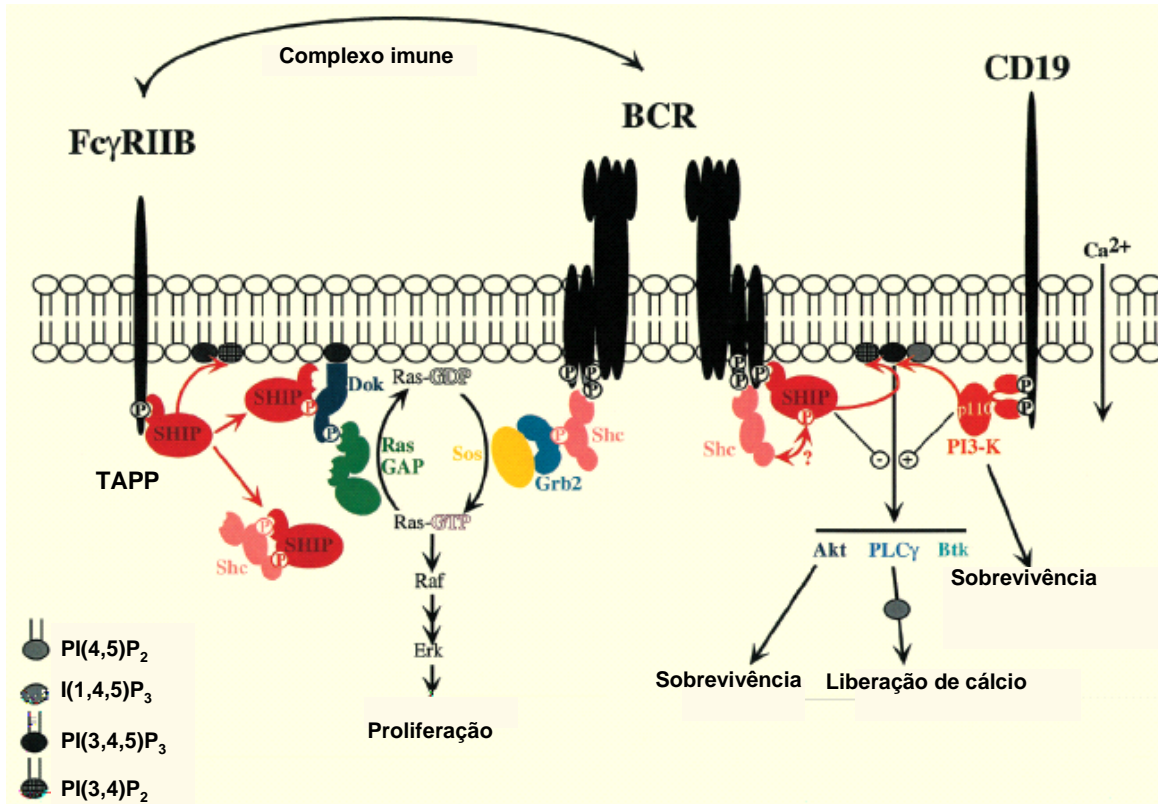
A fosforilação e conseqüente ativação de proteínas tirosina quinases após a ligação do antígeno ao BCR é contrabalanceada pela ação de fosfatases que atuam defosforilando estas moléculas e cessando, assim, o processo de ativação. O papel central na transdução de sinais da inserção de resíduos de tirosinas em proteína e polipeptídeos (que é modulada por proteínas e lipídios quinases) fazem com que este processo esteja sujeito à regulação pelas fosfatases. Estas defosforilam os substratos das proteínas tirosinas quinases ou o produto da fosfatidilinositol 3-quinase, o PI(3,4,5)P₃. A defosforilação desses mediadores essenciais é catalisada por duas enzimas: a SHP (proteína que apresenta domínio SH2 e possui atividade tirosina fosfatase) (Mathews *et al.*, 1992) e SHIP (proteína que apresenta domínio SH2 e possui atividade inositol fosfatase) (Damen *et al.*, 1996a). Tanto SHIP quanto SHP são capazes de se associarem a fosfopeptídios sintéticos com seqüências de aminoácidos similares as seqüências ITIM (padrão de inibição baseado em tirosina de imunoreceptores)

do FcγRII (Damen *et al.*, 1996b). Essas seqüências são encontradas em diversos receptores que modulam os sinais de ativação nos linfócitos. O ITIM atua pelo recrutamento de uma das fosfatases inibidoras SHP e SHIP. Essas fosfatases possuem um domínio SH2 que liga, preferencialmente em tirosinas fosforiladas nos domínios ITIMs.

A fosfatase SHIP inibe o aumento de Ca^{2+} citoplasmático mediado pelo BCR através do bloqueio da ativação de proteínas da família das quinases Tec. A ativação de Tec requer a fosforilação de tirosinas, assim como a fosforilação de fosfoinosítídeo pela fosfatidilinositol 3-quinase, que leva a geração de $PI(3,4,5)P_3$ (Schaeffer & Schwartzberg, 2002). Células B estimuladas pela coagregação do receptor de antígenos e o FcγRII exibem diminuição na formação de $PI(3,4,5)P_3$ e redução na ativação de BTK (Scharenberg *et al.*, 1998), com conseqüente redução da proliferação. Esta diminuição na formação de $PI(3,4,5)P_3$ é mediada diretamente pela ação da fosfatase SHIP.

O FcγRII é um receptor de baixa afinidade para IgG expresso em células B em todos os estágios de desenvolvimento (De Andres *et al.*, 1998). A coagregação de FcγRII com o BCR em células B maduras ou imaturas leva ao bloqueio de várias etapas da resposta, incluindo proliferação, produção de anticorpos, ativação e desvio da resposta celular para a apoptose (Coggeshall, 1998). A perda da regulação negativa através de alterações genéticas que afetam o FcγRII pode resultar em produção de autoanticorpos e autoimunidade (Raveth & Lanier, 2002).

O passo inicial na sinalização inibitória mediada pelo FcγRII é a fosforilação de seqüências ITIMs presentes na porção intracitoplasmática desse receptor (Muta *et al.*, 1994). Esta fosforilação é mediada por proteínas da família de quinases Src ativadas após sinalização via BCR, requer coagregação BCR- FcγRII e leva ao recrutamento de SHIP que liga via domínios SH2 a seqüências ITIM no FcγRII. Após a coagregação do BCR com FcγRII, SHIP é recrutada de forma bastante significativa quando comparado com células ativadas apenas pela ligação do BCR (Ono *et al.*, 1997). O recrutamento e ativação de SHIP leva a hidrólise de $PI(3,4,5)P_3$ dando origem a $PI(3,4)P_2$ (Brauweiler *et al.*, 2000a). Esta hidrólise causa um bloqueio na translocação para a membrana de importantes moléculas com domínio PH que estão envolvidas na transdução de sinais. Estas incluem Btk e fosfolipase C (Bolland *et al.*, 1998), dois mediadores fundamentais para a mobilização de Ca^{2+} e ativação de proteína quinase C (Esquema 3).



(Modelo adaptado de Ott *et al.*, 2001)

Esquema 3. Modulação da sinalização via FcγRII. A co-agregação dos receptores BCR/FcγRII tem como consequência a fosforilação dos ITIMs localizados na porção intracelular do receptor FcγRII, esta fosforilação é mediada por proteínas da família de quinases Src ativadas após sinalização via BCR. Em seguida ocorre o recrutamento para a membrana de SHIP. O recrutamento e ativação de SHIP leva a hidrólise de PI(3,4,5)P₃ dando origem a PI(3,4)P₂. Esta hidrólise causa um bloqueio na translocação para a membrana de importantes moléculas com domínio PH que estão envolvidas na transdução de sinais.

Além da ativação de fosfatases a modulação negativa pode ser induzida pela produção de mensageiros secundários. A adenosina 3', 5'- monofosfato cíclica (cAMP é um mensageiro secundário gerado a partir do ATP pelas proteínas da família da adenilato ciclase (AC). A degradação do cAMP é feita por proteínas da família das fosfodiesterases (PDE) (Torgersen *et al.*, 2002). O cAMP pode atuar de diferentes maneiras em diferentes tipos celulares. No entanto, foram descritos apenas três substratos para o cAMP: canais de íons dependentes de cAMP, proteínas quinases dependentes de cAMP (PKA) e proteínas trocadoras de guanidinas (GEF) dependentes de cAMP (Skalhegg *et al.*, 2005). A ação desta molécula sobre o sistema imunológico é mediada, principalmente, pela ativação da proteína quinase dependente de cAMP (PKA). No entanto já foi descrito que as GEF EPAC 1 e 2 também podem atuar como substrato do cAMP em linhagens de células T (Cambier & Julies, 1987 e Fuld *et al.*, 2005).

O aumento dos níveis de cAMP em células do sistema imunológico, em modelos de aumento farmacológico dos níveis deste nucleotídeo cíclico, leva a um estado de desativação celular. A adição de agentes farmacológicos que ativam diretamente as AC ou que inibem a ação das PDE, como, por exemplo, fosfokolin e rolipran, levam a inibição da proliferação de células T e B, a inibição da atividade citotóxica de células *natural killer* e a indução de secreção de imunoglobulinas pela célula B (Muraguchi *et al.*, 1984; Skalhegg *et al.*, 1994; Torgensen *et al.*, 1997; Irvin *et al.*, 2001). Foi descrito que esses efeitos seriam conseqüências do bloqueio da passagem dessas células da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Irvin *et al.*, 2001).

É possível que fisiologicamente cAMP esteja associado à regulação fina dos processos de sinalização celular envolvidos na ativação das células do sistema imunológico. Vários trabalhos têm descrito vias de sinalização celular reguladas pelo aumento de cAMP como, por exemplo, as vias que culminam na formação dos fatores de transcrição NF-AT, AP-1 e NFκB (Skalhegg *et al.*, 2005).

O cAMP parece ter um papel muito importante na modulação das células do sistema imunológico e já foram demonstrados vários níveis de ação dessa molécula, desde proteínas presentes no início da via de sinalização, até efeito em moléculas tardias no processo de transdução de sinal. Com relação a inibição dos níveis iniciais da sinalização, já foi descrito que a PKA ativada pelo acúmulo de cAMP leva a ativação da proteína da família Src

quinase Csk. Essa proteína, quando ativada, fosforila resíduos de tirosina na porção carboxi-terminal de outras enzimas da família Src, levando a inibição destas proteínas, que são fundamentais para o início do processo de transdução de sinal (Skalhegg *et al.*, 2005 e Torgensen *et al.*, 2002). Além disso, estudos realizados para avaliar a localização da PKA em células T, mostraram que esta proteína se co-localizava com o TCR, estando ambos presentes em regiões ricas em colesterol e esfingolipídios, indicando necessidade de proximidade física para que essa interação aconteça (Skalhegg *et al.*, 1994 e Torgensen *et al.*, 2002).

Outros estudos demonstraram a presença de uma proteína capaz de inibir a ligação dos fatores de transcrição NF-AT e NFκB ao DNA. A expressão dessa proteína era dependente do acúmulo de cAMP. A proteína ICER (repressor precoce induzido por cAMP) faz parte da família de proteínas de ligação ao elemento de resposta do cAMP (CREB) que se ligam a região cre do DNA. As proteínas CREB, entre elas a ICER, são dependentes da ação da PKA (Della Fazia *et al.*, 1997 e Bordor *et al.*, 2001). A expressão de ICER pode ser observada em células do sistema imunológico (células T, *natural killer* e em menor quantidade em células B) após estimulação com agentes que levam ao acúmulo de cAMP (Bordor *et al.*, 2001).

Tem sido descrito que um aumento intracelular nos níveis de cAMP tem efeito inibitório sobre a resposta proliferativa de células B em repouso quando essas células são estimuladas via MHC de classe II, via CD23, via receptor de prostaglandina E2 (PGE2) e durante a interação entre células T (Roper *et al.*, 1994 e Minguet *et al.*, 2005).

A sinalização via BCR pode ser influenciada pela concentração intracelular de cAMP. Estudos mostraram que o acúmulo desse nucleotídeo cíclico inibe a fosforilação de IκB (impedindo a translocação do NFκB para o núcleo) e a fosforilação da MAPK ERK (Minguet *et al.*, 2005). Foi demonstrado ainda, que a inibição da resposta de células B após ligação ao BCR estaria relacionada com a modulação da ativação de PLCγ e a mobilização de cálcio e esses efeitos seriam dependentes da ativação da PKA (Venkataraman *et al.*, 1998). A molécula PKA participa na modulação da resposta induzida por ligantes de receptores do tipo Toll, mais especificamente TLR4, através da diminuição da fosforilação de IκB (Minguet *et al.*, 2005).

A ação da PKA, ativada pelo cAMP, em células B, induz mecanismos pró-apoptóticos e inibe o crescimento celular através da modulação de fatores de sobrevivência como Bcl-XL. Foi relatado que essa inibição da resposta via BCR dependente de PKA pode ser revertida pela adição da citocina IL-4, que atuaria de forma protetora durante a ativação da PKA (Venkataraman *et al.*, 1998 e Smith *et al.*, 2005).

Apesar do papel do cAMP na modulação negativa de células B, outras vias de sinalização mais complexas como a induzida pelo CD40 e pelo CD72 parecem não ser afetadas pelo aumento do cAMP (Minguet *et al.*, 2005).

1.5 - Proteínas adaptadoras e o envolvimento de TAPP1 e TAPP2 na ativação de células B

Nos últimos anos tem sido identificado um grande número de moléculas que regulam a ativação de linfócitos. Muitas dessas moléculas pertencem a um grupo de polipeptídios denominados de proteínas adaptadoras.

Proteínas adaptadoras orquestram os eventos de sinalização intracelular facilitando as interações entre proteínas de maneira a proporcionar ligações reguladas em tempo e espaço. Esta classe de sinalizadores não contém domínios enzimáticos ou transcripcionais, mas são caracterizadas por ligarem a outras proteínas por possuírem vários sítios de ligação. Proteínas adaptadoras permitem a interação de proteínas com outras moléculas transdutoras de sinal via sinalização baseada em padrões de tirosina (TBSM) ou modulam interações proteína/proteína pela interação com domínios SH2, SH3, PH, WW, PTB e PDZ. A principal função das proteínas adaptadoras é facilitar a formação de multicomponentes sinalizadores que permitem que o sinal inicial seja levado da membrana para o meio intracelular (Togni *et al.*, 2004). As proteínas adaptadoras podem ser encontradas no citoplasma de células em estado de repouso, e são fisicamente recrutadas para receptores ativados ou complexos sinalizadores após a ativação celular (Togni *et al.*, 2004). Outra classe importante de proteínas adaptadoras são as proteínas integrais de membrana, que frequentemente apresentam inúmeros sítios para fosforilação de tirosinas quinases (Janssen & Zhang, 2003).

Recentemente foram caracterizadas duas proteínas adaptadoras que são recrutadas para a membrana após ativação que foram denominadas TAPP1 e TAPP2. Essas proteínas apresentam semelhanças em vários aspectos, incluindo o pequeno peso molecular (32 a 47 kDa), alta conservação em humanos e camundongos, e a presença de domínios PH um localizado na região C terminal e outro na região N terminal. TAPP1 e TAPP2 são expressas em vários tecidos incluindo o tecido linfóide. Foi demonstrado em células B de linfoma humano BJAB que TAPP1 e TAPP2 são recrutadas para a membrana após ativação via BCR e que o domínio PH da porção C terminal é necessário e suficiente para o recrutamento. O bloqueio da PI3K é capaz de abolir o recrutamento de TAPP1 e TAPP2, enquanto que a expressão de PI3K ativa é suficiente para direcioná-las para a membrana (Bolland *et al.*, 1998.). TAPP1 e TAPP2 podem se ligar através da sua porção C terminal ao PI(3,4)P₂, mas não ao PI(3,4,5)P₃ (Dowler *et al.*, 2000). Assim, é possível que, após a geração de PI(3,4,5)P₃ mediada por PI3K, a hidrólise feita por SHIP em PI(3,4,5)P₃ produzindo PI(3,4)P₂, forneça ao sistema concentrações adequadas deste produto a fim de que haja a ligação e ativação de TAPP1 e TAPP2. Em modelos de células humanas, o recrutamento via BCR de TAPP2 é relativamente lento e duradouro, ao contrário do recrutamento pelo domínio PH da Btk que é rápido e transitório (Marshall *et al.*, 2002). A cinética de recrutamento de TAPP2 esta diretamente relacionada à cinética de produção de PI(3,4)P₂ após ativação via BCR, enquanto que ativação de Btk está relacionada a produção de PI(3,4,5)P₃ (Krahn *et al.*, 2004). Em células T ativadas com anti-CD28, o recrutamento de TAPP1 esta relacionado com o aumento da concentração de PI(3,4)P₂ e não de PI(3,4,5)P₃ (Freeburn *et al.*, 2002). Um estudo mais recente mostrou a localização de TAPP1 na membrana de células NIH3T3 pelo método de imunomarcagem em microscopia eletrônica após estimulação por peróxido de hidrogênio e ligação a PI(3,4)P₂ (Watt *et al.*, 2004). Estes dados reforçam a idéia de que PI(3,4)P₂ é um ligante fisiológico para o domínio PH de TAPP e pode mediar seu recrutamento para a membrana.

SHIP hidrolisa PI(3,4,5)P₃ para produzir PI(3,4)P₂, o que torna essa proteína uma boa candidata para regular diferencialmente a cinética de produção e quantidade desse segundo mensageiro. A expressão aumentada de SHIP abole o recrutamento de Btk e aumenta o recrutamento de TAPP1 e TAPP2 para a membrana (Krahn *et al.*, 2004). O recrutamento e ativação de SHIP podem ser aumentados pela coagregação do FCγRII (Ono

et al., 1997). O efeito da coagregação de FC γ RII mediado pelo domínio PH leva ao bloqueio do recrutamento de Btk enquanto que o recrutamento de TAPP2 é intensificado. Esses resultados podem ser explicados pelo fato da molécula SHIP agir bloqueando o recrutamento de Btk, efeito esse não observado em TAPP2. (Krahn *et al.*, 2004).

Tomados em conjunto, os dados atualmente existentes sugerem que TAPP1 e TAPP2 são ligantes específicos de PI(3,4)P₂ e que essas moléculas são preferencialmente recrutadas para a membrana quando SHIP é ativado simultaneamente a PI3K. Levando-se em conta que SHIP funciona como regulador negativo da ativação de linfócitos (Brauweiler *et al.*, 2000), há a possibilidade de que TAPP funcione como um regulador negativo, auxiliando no bloqueio da sinalização desencadeada por mitógenos. No entanto, alguns estudos tem identificado funções de sinalização positiva dependentes de SHIP e/ou PI(3,4)P₂, como a proteção contra a apoptose induzida por FC γ RII em células B (Bolland *et al.*, 1999), proliferação de células mielóides em resposta a IL-4 (Giallourakis *et al.*, 2000) e fosforilação de Akt em mastócitos estimulados por ligante de c-Kit (Scheid *et al.*, 2002). TAPP1 e TAPP 2 são acumuladas preferencialmente em locais da membranas ricos em F actina, sugerindo possível participação na reorganização do citoesqueleto. Além disso, a capacidade da indução prolongada do influxo de cálcio em células BJBA com expressão estável de TAPP2 são evidências adicionais da participação de TAPP na sinalização positiva (Marshall *et al.*, 2002). Os dados que envolvem a participação de TAPP na sinalização (seja ela positiva ou negativa) não são ainda suficientes para elucidar seu verdadeiro papel dentro dos eventos biológicos da ativação das células B. Entretanto é inquestionável que as proteínas TAPP devem ser importante elemento na regulação da fina rede de sinalização intracelular.

1.6 - Fitoterápicos

Por centenas de anos os produtos naturais têm sido utilizados com relativo sucesso para cura e prevenção de doenças. A descoberta que se tornou o marco mais importante no desenvolvimento dos fármacos derivados de produtos naturais foi a caracterização dos salicilatos obtidos de *Salix alba*. Essa descoberta (feita por Edward Stone) ocorreu em 1757

quando foram feitas observações clínicas mostrando as propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato daquela planta (Weissman, 1991).

O desenvolvimento de drogas derivadas de plantas com maior impacto em tempos recentes foi, sem dúvida, na área dos antitumorais. Drogas como o Taxol, Vinblastina, Vincristina e Captotecina têm impactado efetivamente o sucesso da quimioterapia para diferentes tipos de câncer (Balandrin, 1993).

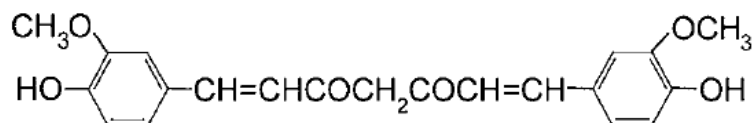
O século XX foi a época de grande desenvolvimento da indústria farmacêutica com o domínio da síntese de fármacos, substituindo extratos naturais por moléculas sintéticas. Entretanto, esses avanços ainda estão restritos a países desenvolvidos, deixando de lado os países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. Cerca de 75% da população mundial continua sem acesso aos produtos farmacêuticos modernos (Newman & Cragg, 2007).

Diversos sistemas do organismo podem ser regulados pela ação de fitoterápicos. Entre eles o sistema imunológico. A atuação desse sistema depende da interação entre diversas células e moléculas que são alvos de atuação de produtos naturais (Geissler & Weth, 2002). Muitos desses produtos são capazes de induzir, suprimir ou regular a atividade imunológica. Esses efeitos podem ser direcionados sobre muitas moléculas de uma mesma via ou ter como alvo uma molécula chave em uma determinada cascata de eventos (Patwardhan & Gautam, 2005). De um modo geral o uso dos fitoterápicos tem sido bastante eficaz em quadros de inflamação, infecções e cancer. Os produtos naturais conferem citoproteção, ação antitumoral, antiinflamatória e imunoregulatória (Tan & Vanitha, 2004). Associado a essas qualidades, geralmente é de fácil aquisição e baixo custo. Todos esses aspectos reforçam a necessidade da descoberta de novos produtos e descrição detalhada dos alvos moleculares, a fim de que novas terapias sejam desenvolvidas no intuito de resolver quadros patológicos ou simplesmente manter o sistema imunológico atuando de forma homeostática através da imunorregulação.

1.6.1 - Efeitos imunomodulatórios da curcumina

A *Curcuma longa* é uma planta da família Gingeberaceae largamente cultivada no Sul e Sudeste da Ásia. O rizoma dessa planta é a parte mais utilizada na culinária e para fins medicinais. Seu componente mais ativo é a curcumina, que compõe 2,5% do rizoma. A

curcumina um pó cristalino de cor amarelo-alaranjado praticamente insolúvel em água foi isolada pela primeira vez por Vogel em 1842. Sua estrutura química (C₁₂H₂₀O₆) foi descrito em 1910 por Lampe e Milobedeska e foi mostrado que esta substância é um diferuloilmetano (Esquema 4) (Aggarwal *et al.*, 2003).



Esquema 4. Estrutura química da curcumina (Tangapazham *et al.*, 2006)

As raízes da *Curcuma longa* têm sido usadas na dieta pelo seu sabor apimentado, como corante para alimentos e tecidos e no tratamento de uma variedade de doenças. Seu uso é muito difundido na medicina tradicional indiana para o tratamento de desordens biliares, anorexia, tosse, doenças alérgicas, alterações hepáticas, reumatismo, e sinusite (Shishodia *et al.*, 2005. Estudos clínicos indicaram que humanos são capazes de utilizar doses superiores a 12 g por dia sem nenhum efeito adverso (Cheng *et al.*, 2001). A maioria dos efeitos atribuídos a curcumina está relacionada à sua habilidade em diminuir a resposta inflamatória. Foi observado que esta substância tem efeito tanto em modelos de inflamação aguda quanto crônica. Outro campo promissor para a utilização da curcumina é o tratamento de diferentes tipos de câncer. Além disso, a curcumina possui propriedades antimicrobiana, antiviral e antifúngica (Araújo & Leon, 2001).

Vários estudos têm mostrado que a curcumina é um potente antioxidante, tendo efeito 10 vezes maior que a vitamina E (Khopde *et al.*, 1999). A atividade antioxidante da curcumina pode ser mediada por ação sobre enzimas oxidativas como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. A curcumina parece servir como um acceptor *Michael* reagindo com glutathione e toredoxina 1 (Adams *et al.*, 2005). A reação da

curcumina com esses agentes reduz a glutathione no interior das células. A supressão da peroxidação de lipídios pela curcumina poderia levar a supressão da inflamação.

O potencial efeito anticâncer da curcumina tem sido descrito em vários modelos. Ela é capaz de bloquear a transformação, início do tumor, progressão do tumor, invasão, angiogênese, metástase e induzir apoptose (LoTempio *et al.*, 2005). *In vivo* suprime neoplasias da pele, estômago, cólon e fígado em camundongo. Foi mostrada também a efetiva supressão da carcinogênese mamária. Esta substância inibe a proliferação de uma variedade de células tumorais, incluindo células B e células T (Aggarwal *et al.*, 2003).

A curcumina modula a função de diferentes tipos celulares que formam o sistema imunológico. De uma forma geral, esse composto exerce um efeito supressor na atividade proliferativa e produção de fatores pró-inflamatórios (Shishodia *et al.*, 2005).

Muitos estudos têm mostrado a capacidade da curcumina em modular a função de macrófagos. Ratos tratados por duas semanas com uma dieta diária de 30 mg/kg apresentam diminuição na capacidade dos macrófagos em produzirem ROS (espécies reativas do oxigênio) (Joe & Lokesh, 1994) e secretar colagenase, elastase e hialuronidase (Joe & Lokesh, 2000). Muitos outros efeitos anti-inflamatórios têm sido atribuídos ao tratamento de macrófagos com essa substância, dentre eles modulação da ativação de NFκB, alteração na estrutura da cromatina, inibição da biosíntese de glutathione, ativação do fator redutor nuclear (Nrf2), ação direta em ROS ou via atividade glutathione peroxidase e consequente regulação de genes relacionados a inflamação já foram descritos (Rahman *et al.*, 2006).

As células dendríticas são células fundamentais na apresentação de antígenos a células T para a indução de respostas específicas contra patógenos microbianos, tumores e inflamação (Crowley *et al.*, 1990). Células dendríticas periféricas são geralmente imaturas fenotípica e funcionalmente (Cella *et al.*, 1997), apesar de aparentemente terem potencial clínico como células adjuvantes no tratamento de doenças infecciosas crônicas e tumores (Banchereau & Steinman, 1998). Existe apenas uma citação sobre a modulação da função de células dendríticas murinas pela curcumina (Kim *et al.*, 2005a). Foi mostrado que a curcumina diminui significativamente a expressão de CD80, CD86 e MHC de classe II em células dendríticas estimuladas com GM-CSF/IL-4 sem afetar a expressão de MHC de classe I. Observou-se, também, que a curcumina bloqueia a produção de IL-12 e citocinas

pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α em células dendríticas estimuladas com LPS. O tratamento com curcumina aumentou a captura de antígenos por receptores de manose. O tratamento prévio de células estimuladas com LPS com curcumina bloqueou a fosforilação de MAPK e a translocação de NF κ B para o núcleo (Kim *et al.*, 2005a). Os efeitos da curcumina em células dendríticas podem refletir diretamente na sua função de auxiliar a ativação de células T tornando-as ativadoras ineficientes.

Em relação à produção de anticorpos, foi observado que ratos tratados com curcumina na dose de 20 mg/kg não apresentaram alteração nos níveis de IgG produzidos, enquanto que os animais tratados com 40 mg/kg os níveis de IgG estavam aumentados. Nenhuma alteração foi observada na resposta de hipersensibilidade tardia ou atividade de células *natural killer*. No entanto, quando foram testadas linhagens tumorais YAC-1 e EL4, ficou evidente que a curcumina exerce efeito inibitório na resposta proliferativa dessas células quando é feita a comparação com células normais (South *et al.*, 1997). Em outros estudos a curcumina retardou a proliferação de linfócitos esplênicos, células T citotóxicas e macrófagos (Gao *et al.*, 2004). Em nenhum dos estudos realizados foi observado o aumento da citotoxicidade de células *natural killer* após tratamento com curcumina (Cipriani *et al.*, 2001). Adicionalmente, a curcumina também aumentou a morte celular de linfomas de *natural killer*/células T (NKTL) que são resistentes a outras terapias. Este efeito parece estar diretamente ligado à supressão da ativação do NF κ B (Kim *et al.*, 2005b).

Vários estudos mostraram que a curcumina modula tanto a proliferação quanto a ativação de células T. A ativação induzida por concanavalina A (Con A), fitohemaglutinina (PHA) e forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) é inibida em células T retiradas de baço humano (Rajan *et al.*, 2004). No decorrer desses estudos a curcumina foi capaz de suprimir a síntese de IL-2 e a proliferação induzida por IL-2. Em outro estudo feito pelo mesmo grupo foi relatado que a curcumina também inibiu a proliferação de células T humanas induzida por PMA, PHA e anti-CD28 (Rajan *et al.*, 1998). Em comparação com a ciclosporina A, que inibe a proliferação de células T induzida por PMA, a curcumina apresentou efeito inibitório superior, já que foi capaz de suprimir também a estimulação induzida por PMA e anti-CD28. O efeito inibitório da curcumina foi observado também na ativação de NF κ B (Rajan *et al.*, 1998).

Em timócitos de ratos o tratamento com curcumina inibiu completamente a proliferação induzida por Con A e também suprimiu a indução de apoptose por dexametasona. A inibição da apoptose foi acompanhada por uma supressão parcial ou completa da geração de AP-1 em células estimuladas ou não por Con A (Sikora *et al.*, 1997). Em células T infectadas com HTLV-1 e tratadas com curcumina o crescimento viral foi diminuído. O efeito antiviral da curcumina em células infectadas com HTLV-1 foi correlacionada com o bloqueio de duplicação celular, diminuição da expressão da ciclina D1, Cdk1 e Cdc25C, e favorecimento da apoptose pela redução da expressão de XIAP. Além disso, houve também a diminuição do nível de AP-1 ligado ao DNA e a supressão da atividade transcricional (Tomita *et al.*, 2006a e Tomita *et al.*, 2006b).

Em células B a curcumina pode também influenciar a proliferação e funções efetoras. Alguns desses efeitos parecem ser mediados pela diminuição do estresse oxidativo induzido por ciclosporina e peróxido de hidrogênio. (Rajan *et al.*, 1998). Já foi mostrado que a curcumina reduz a proliferação de células B imaturas oriundas de linfoma (BKS-2), induzindo sua apoptose, mas não em células B normais. Este efeito estaria associado à diminuição de *erg-1*, *c-myc*, *bcl-XL*, gene supressor de tumor *p53* e, na maioria das vezes, da inibição quase que total da atividade de NFκB (Han *et al.*, 1999). A apoptose observada em linhagens de células B pode estar associada à capacidade da curcumina em deacetilar histonas. Estudos realizados em células Raji mostraram inibição da proliferação, indução de apoptose e acentuada redução na acetilação de histonas em células tratadas com curcumina (Liu *et al.*, 2005). Um trabalho recente mostrou que Syk é um alvo da curcumina, uma vez que linhagens de células tumorais humanas e murinas tratadas com curcumina apresentaram redução da fosforilação de Syk. Sendo assim, a função de sobrevivência de Syk que é fosforilar Akt para que essa por sua vez fosforile a proteína proapoptótica Bad, deixaria de atuar, facilitando a indução da apoptose (Guarurajan *et al.*, 2007).

Os estudos citados acima indicam que a curcumina desempenha diferentes efeitos nas funções imunes em células normais e transformadas, conferindo vantagens em estudos terapêuticos. Entretanto, ainda continuam desconhecidos os alvos moleculares da curcumina em células B normais.

1.6.2 - Efeitos imunomodulatórios da *Cissampelos sympodialis* e de seu composto warifteina

A infusão da raiz e das folhas da *Cissampelos sympodialis* é largamente utilizada no Nordeste e Sudeste do Brasil para o tratamento de asma, reumatismos e outras doenças inflamatórias (Barbosa-Filho *et al.*, 1997).

Estudos prévios mostraram que a fração aquosa do extrato hidroalcoólico (AFL) de *Cissampelos sympodialis* atua sobre a musculatura lisa. Observou-se a indução de relaxamento da musculatura lisa brônquica e inibição de broncoespasmos induzidos por histamina em cobaios sensibilizados com ovalbumina (Thomas *et al.*, 1997a). Estudos posteriores mostram também que os níveis intracelulares de cAMP eram aumentados em células de músculo de traquéia e que ocorreria inibição das enzimas fosfodiesterase nucleotídeo cíclico (PDE) IV e V em músculo de pulmão de cobaios (estas enzimas são responsáveis pela degradação de cAMP). Tomando em conjunto, os dados existentes sugerem que a AFL possa inibir essas enzimas aumentando os níveis intracelulares do mensageiro secundário cAMP (Thomas *et al.*, 1997b). Outro efeito relatado em cobaios tratados com AFL foi o aumento de células mononucleares no lavado broncoalveolar (Ferreira *et al.*, 1996).

A AFL parece ter efeito inibidor em células diretamente envolvidas com a resposta inflamatória e esse talvez seja um dos motivos do seu sucesso no tratamento de doenças inflamatórias. A AFL produz uma diminuição na degranulação de neutrófilos isolados de sangue periférico estimuladas por Formyl-Met-Phe-Pro. Este efeito é mediado pela ativação da PKA (proteína-quinase A) induzida por cAMP (Thomas *et al.*, 1999). A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal também foi inibida pela AFL em ratos (Batista-Lima *et al.*, 2001). Estudos recentes em modelos de asma sugerem que os efeitos antialérgicos são conseqüências dos efeitos anti-leucotrienos e anti-eosinofílicos do extrato (Bezerra-Santos *et al.*, 2006).

A AFL também apresenta efeitos imunomodulatórios. Estudos realizados utilizando células T murinas ativadas com concanavalina A mostraram que há uma diminuição na resposta proliferativa e na secreção das citocinas IL-2 e INF- γ e aumento na produção das citocinas IL-4 e IL-10. No entanto, animais sensibilizados com ovalbumina e tratados com

AFL modularia a
AFL por via oral apresentaram diminuição nos níveis de IgE circulante e indução de secreção de citocinas

Ensaio de caracterização da toxicidade da warifteína foram realizados em linhagens de hepatócitos e de fibroblastos V79, revelando que o IC₅₀ da warifteína varia entre 10 µM e 35 µM nestes tipos celulares (Melo *et al.*, 2003).

Estudos anteriores demonstraram que a warifteína exerce um efeito espasmolítico em músculo cardíaco, traquéia e útero de cobaias. Outro dado importante mostrado neste estudo foi a observação de que a warifteína pode ter ação efetiva na modulação de eventos que regulam a liberação de cálcio (De Freitas *et al.*, 1996). Foi sugerido neste estudo que a diminuição na liberação de cálcio seria devido a um possível aumento intracelular de cAMP, aumento esse decorrente do efeito inibitório da warifteína sobre as fosfodiesterases (Thomas *et al.*, 1997b e Thorpy 1994).

Recentemente, foi evidenciado o efeito antialérgico da warifteína em modelo de asma e pleurisia alérgica. Esse estudo mostrou que a warifteína induziu uma potente inibição da eosinofilia alérgica e da produção de cisteinil leucotrienos (Bezerra-Santos *et al.*, 2006).

Tomados em conjunto, os estudos utilizando warifteína sugerem que este composto isolado da *Cissampelos sympodialis* teria uma série de efeitos similares aos observados nos estudos utilizando a AFL, o que sugere que este seria o princípio ativo do extrato. Estudos adicionais são necessários para caracterizar se a warifteína teria efeito sobre células B e qual o seu mecanismo de ação nestas células.

2 – OBJETIVO GERAL

No presente trabalho tivemos como objetivo geral avaliar o processo de modulação da ativação de células B. Duas abordagens distintas foram utilizadas. Avaliamos, por um lado, o papel da proteína adaptadora TAPP2 na modulação da resposta de células B. Uma outra abordagem utilizada foi a caracterização de dois compostos químicos isolados de produtos naturais (curcumina e warifteina) como moduladores da resposta de células B e a caracterização de seu mecanismo de ação.

2.1 - JUSTIFICATIVA

Para que ocorra a ativação das células B são necessários vários eventos que culminam com a ativação, diferenciação, proliferação e secreção de imunoglobulinas, que são cruciais no combate de algumas infecções. No entanto, o estado de ativação precisa ser finamente controlado para que não perdure indeterminadamente ou leve a produção de anticorpos autoreativos, como pode ser observado em diversas doenças autoimunes. Várias moléculas moduladoras podem participar na modulação da ativação. Muitas delas estão presentes no citoplasma, e podem ser recrutadas após indução da resposta. A análise detalhada de algumas moléculas inibidoras tem mostrado que o equilíbrio entre os sinais de ativação e modulação é de extrema importância para a resposta imunológica (Healy & Goodnow, 1998).

Com o intuito de avaliar o papel de proteínas intracelulares na resposta de células B e estimulados pela idéia de que TAPP1 e TAPP2 possam participar de forma direta ou indireta na cascata de fosforilação em células B, nos propusemos a estudar seu envolvimento no modelo de ativação de células B após coagregação do BCR com FcR. Para tal a proteína TAPP2 recombinante produzida em bactérias *E. col.*, foi purificada e injetada em coelhos para a produção de anticorpos específicos. Estes anticorpos foram purificados e utilizados como ferramentas para avaliar a participação de TAPP na fosforilação de células B estimuladas com anti-IgM intacta (ou seja, na ativação gerada por coagregação do BCR/FcγRII). Além disso, utilizamos os anticorpos anti-TAPP para o estudo do seu recrutamento para a membrana e do seu envolvimento em alterações de citoesqueleto celular durante a ativação.

Uma série de drogas sintéticas ou não são capazes de exercer efeito modulatórios em eventos como ativação, proliferação e produção de imunoglobulinas. Muitas moléculas têm sido empregadas no controle da proliferação e indução de apoptose em células tumorais (Ringshausen *et al.*, 2006) e modulação da ativação e bloqueio da produção de imunoglobulinas em doenças autoimunes (Spertini, 2007).

A curcumina, principal composto do rizoma da planta *Curcuma longa*, já está em estudos clínicos de fase I para o tratamento de diferentes tipos de câncer e existe vasta descrição de seus efeitos imunomoduladores em diversas populações celulares (Hsu & Cheng, 2007). A warifteina, o composto encontrado em maior quantidade na fração hidroalcoólica da *Cissampelos sympodialis*, foi caracterizado como uma substância promissora no controle da asma e resposta inflamatória. Numa segunda parte deste estudo investigamos o efeito da curcumina e warifteina na resposta de células B induzida por ativadores policlonais *in vitro*. Investigamos, ainda, os efeitos destas substâncias nas principais vias de transdução de sinal induzidas por ativação de células B. Finalmente, a partir destes estudos de sinalização intracelular, caracterizamos o mecanismo de ação destas drogas.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para desenvolver o objetivo geral de avaliar o processo de modulação da resposta de células B, nosso trabalho foi dividido em três partes e teve os seguintes objetivos específicos:

Parte I – Caracterização do envolvimento de TAPP2 na modulação da ativação de células B

- 1- Produção de TAPP2 recombinante em bactérias *E. coli* transformadas.
- 2- Obtenção de anticorpos específicos anti-TAPP2.
- 3- Avaliação, por *Western blotting*, da atividade de fosforilação dessas proteínas em linhagens de células B e em células primárias provenientes de camundongos C57BL/6 e na linhagem geneticamente deficiente de SHIP.

4- Avaliação, através de imunofluorescência, da localização e das condições necessárias ao recrutamento de TAPP2 para a membrana após ativação.

Parte II – Estudo dos efeitos imunomoduladores da curcumina em células B ativadas

1- Verificação da toxicidade da curcumina quando adicionada a culturas de células B primárias.

2- Avaliação dos efeitos da curcumina sobre a proliferação de células B murinas estimuladas com ligantes de receptores do tipo Toll e anti-IgM.

3- Avaliação dos efeitos da curcumina sobre a secreção de imunoglobulinas em células B murinas estimuladas com ligantes de receptores do tipo Toll.

4- Verificação do efeito da curcumina na expressão de moléculas co-estimulatórias.

5- Investigação das possíveis vias de sinalização onde a curcumina encontre alvos moleculares: fosforilação de MAPK e ativação do fator nuclear NFκB.

Parte III – Caracterização dos efeitos imunomoduladores da warifteina em células B ativadas

1- Verificação da toxicidade da warifteina quando adicionada a culturas de células B primárias e em cultura de linhagem de células B humanas DAUDI

2- Avaliação dos efeitos da warifteina sobre a proliferação de células B murinas estimuladas com ligantes de receptores do tipo Toll e pela ligação de Ig de superfície (anti-IgM).

3- Verificação do efeito da warifteina na expressão de moléculas co-estimulatórias.

4- Avaliação dos efeitos da warifteina sobre a secreção de imunoglobulinas em células B murinas estimuladas com ligantes de receptores do tipo Toll.

5- Investigação das possíveis vias de sinalização alteradas pela warifteina, fosforilação de MAPK e ativação do fator nuclear NFκB.

6- Investigação da indução de aumento intracelular de cAMP pela warifteina.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Reagentes

Foram utilizados os seguintes meios de cultura RPMI 1640 GIBCO (Gibco BRL, Grand Island, NY,EUA) e IMDM (Hyclone, Logan,EUA). Suplementos para cultura (hepes, bicarbonato de sódio, glutamina e β -mercaptoetanol) foram obtidos da SIGMA Chem. Co. (St Louis, MO, EUA). Soro fetal bovino e o antibiótico gentamicina a foram obtidos da GIBCO (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA).

A curcumina foi obtida da SIGMA Chem. Co. (St Louis, MO, EUA).

A warifteina foi isolada das folhas secas da planta *Cissampelos sympodialis*. Na preparação do extrato de *Cissampelos sympodialis* folhas foram secas a 40 °C em estufa e pulverizadas. O material seco foi submetido extração com etanol 70% (v/v) a 70 °C por 5 dias. O extrato hidroalcoólico da planta foi então passado em coluna e submetido à cromatografia de camada fina (TLC), dessa maneira obteve-se o alcalóide warifteina como previamente descrito por Lira *et al* (2002). O composto isolado warifteina foi gentilmente cedido pela Dra Márcia Regina Piuvezam do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba.

Lipopeptídeo bacteriano sintético Pam3CysSerLys4 foi obtido da EMC micro-collections (Tubingen, Alemanha). Os oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Parte desses dois reagentes foi gentilmente cedido pelo Dr Alberto da Nóbrega do Departamento de Imunologia do IMPPG da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O LPS (extraído de *E. coli*, sorotipo 0111:B4) foi obtido da SIGMA Chem. Co. (St Louis, MO, EUA).

O Rolipran (que é inibidor de fosfodiesterase) e o Forskolin (ativador da adenilato cilase) foram gentilmente cedidos pela Dra Patrícia Silva (IOC, FIOCRUZ).

3.2 - Animais

Utilizamos camundongos BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas de idade de ambos os sexos. Os animais eram provenientes do biotério do Departamento de Imunologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Camundongos C57BL/6, C57BL/6 deficientes na molécula SHIP e C57BL/6 ARS de ambos os sexos com idade entre 6 e 8 semanas foram oriundos do biotério do National Jewish Medical and Research Center, Denver Colorado, USA. Para imunização e produção de anticorpos anti-TAPP2 foram utilizados coelhos fornecidos também pelo biotério do National Jewish Medical and Research Center.

3.3 – Linhagens celulares

Foram utilizadas células A20 (Tamir *et al.*, 2000), que foram cultivadas em IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) acrescido de 10% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, EUA), β -mercaptoetanol 50 μ M, L-glutamina 2 μ M, bicarbonato de sódio 2 mg/ml, gentamicina (50 μ g/ml). O linfoma B humano DAUDI (ATCC, Rockville, MD, EUA) foi mantido em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e os suplementos já citados. Para a produção de anticorpos anti-Thy, anti-CD4, anti-CD8 e anti-cadeia *kappa* de Ig de rato foram utilizados, respectivamente, os hibridomas H3012, GK 1.5, 356.7 e MAR 18.5 (ATCC, St Louis, MO, EUA). Todas as linhagens celulares foram mantidas em estufa a 37 °C com 7% de CO₂.

3.4 – Produção de TAPP2 recombinante

Vetores PGEX-3X contendo seqüências de TAPP2 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, EUA) foram utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli* seguindo protocolo anteriormente descrito (Smith, 1991). Após a transformação as bactérias foram crescidas em meio Agar-LB. Algumas colônias foram selecionadas e então testadas por PCR para a confirmação da expressão da proteína TAPP2 como previamente descrita (Kimber *et al.*, 2002).

A confirmação da transformação com TAPP2 em bactérias *E. coli* foi feita por PCR onde foram consideradas positivas as bactérias que possuíam a seqüência complementar

aos *primers* de oligonucleotídeos de TAPP2. O *primer* usado para TAPP2 foi: senso, GATGTGAGCAGAGCCCAGGAATGCC e o antisenso, AGGGCTGGAGGAGCTGCTAAGCTC. A técnica foi realizada baseada em protocolo previamente descrito (Marshall *et al.*, 2000).

As colônias de bactérias que se mostraram positivas para TAPP2 foram, então, crescidas em larga escala em meio 2x dYT composto de 16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl dissolvidos em 1 L de água Milli-Q. Após a obtenção de massas de bactérias, essas foram lisadas por congelamento e descongelamento e, em seguida, a proteína TAPP2 foi purificada com esferas de glutathione Sepharose (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, EUA). Os lisados das bactérias transformadas foram incubadas a 4 °C por 16 horas. Em seguida foi feita a eluição com solução de competição (solução de glutathione solúvel) para a obtenção das proteínas TAPP2. Finalmente foi dosada a concentração de proteínas como descrito previamente (Kimber *et al.*, 2002).

3.5 - Imunização e purificação de anticorpos específicos anti-TAPP2

Coelhos foram injetados com 200 µg de proteína TAPP2 purificada em dois pontos de inóculo subcutâneo, na região dorsal e na região lombar. Os coelhos receberam inóculos mensais e após os três primeiros meses iniciou-se a avaliação dos soros quanto à presença de imunoglobulinas específicas para TAPP2. Os soros retirados dos coelhos imunizados foram passados em coluna de afinidade para a obtenção de anticorpos específicos como descrito previamente (Aatsinkia & Rajaniemi, 2005).

3.6 - Isolamento de células B

Células B foram obtidas de baço de camundongos. Para a purificação as células de baço foram submetidas à depleção de células T com a utilização de coquetel de anticorpos específicos para moléculas de superfície dessas células (Thy-1, CD4 e CD8). Além disso, após tratamento com os anticorpos citados, as células foram tratadas com anticorpos anti-cadeia *kappa* de Ig de rato (MAR 18.5) e complemento de coelho (Low Tox Rabbit Complement, Cedarlane Inc., Canada).

Na etapa seguinte as células foram submetidas a fracionamento em gradiente de Percoll descontínuo contendo soluções de Percoll (SIGMA Chem Co; St Louis, MO, EUA) diluídas em meio RPMI 1640 ou salina de Hank's nas concentrações de 50%, 60%, 65% e 70%. Foram retiradas apenas as células de alta densidade (encontradas entre as frações de 65% e 70%) que representam as células B não ativadas.

Após o isolamento, as células foram colocadas em placas de cultura contendo meio RPMI suplementado com β -mercaptoetanol 50 μ M, L-glutamina 2 μ M, bicarbonato de sódio 2 mg/ml, gentamicina (50 μ g/ml) e 10% de soro fetal bovino.

3.7 - Avaliação do efeito citotóxico de produtos naturais

Foram realizados experimentos que visaram evidenciar um possível efeito tóxico da curcumina ou warifteína sobre as células B purificadas de camundongos. O método escolhido foi a análise do acúmulo de iodeto de propídeo avaliada por citometria de fluxo. A excitação desse composto por luz branca leva a emissão de fluorescência no comprimento de onda de 630 nm, que pode ser medida por citometria de fluxo (FACSCalibur – Becton & Dickinson). Para esse experimento foram utilizadas células purificadas estimuladas com LPS ou não, tratadas ou não com curcumina (10 μ M) ou warifteína (10 μ g/ml) e marcadas com anticorpo anti-B220 conjugado a fluoresceína. Estas células receberam a adição de iodeto de propídeo no momento da análise (concentração final de 5 μ g/ml).

Para os testes de viabilidade com a linhagem DAUDI utilizamos o corante vital azul de Trypan. As células DAUDI foram mantidas em cultura por 24 horas na presença ou ausência de warifteína nas concentrações de 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml e 10 μ g/ml. Em seguida foi adicionado azul de Trypan e foram contadas as células viáveis e mortas em câmara de Neubauer com o auxílio do microscópio óptico.

3.8 - Análise da expressão de CD86 por citometria de fluxo

Células B purificadas de camundongos BALB/c (1×10^6 /ml) foram estimuladas com LPS (10 μ g/ml), oligodeoxinucleotídeo com seqüências CpG (1 μ g/ml), Pam3cys (1 μ g/ml). Simultaneamente estas foram tratadas ou não com curcumina 10 μ M ou warifteína

10 µg/ml. Após 48 horas, as células foram lavadas e incubadas com PBS contendo 1% de soro normal de camundongo (para bloquear as ligações inespecíficas). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos anti-B220 (FITC) e anti-CD86 (PE). Terminada a incubação, as mesmas foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 2%. As amostras foram então analisadas em FACSCALIBUR Becton & Dicknson (Mountain View, CA, EUA). Os dados foram posteriormente analisados utilizando o software Cell quest.

3.9 – Mobilização de cálcio intracelular

Células B purificadas pelo isolamento anteriormente descrito foram adicionadas à cultura na concentração de 5×10^6 /ml e foram incubadas com Indo-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) na concentração de final de 1 µM. Em seguida as células foram marcadas com anticorpo anti-B220 FITC e a concentração foi ajustada para 1×10^6 /ml. As amostras foram, então, analisadas por citometria de fluxo utilizando o citômetro LSR (BD Bioscience, Mountain View, CA, EUA). No momento da análise as células foram estimuladas com anticorpo anti-IgM (5 µg/ml) e tratadas simultaneamente com curcumina (10 µM). O programa utilizado para a análise foi o FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA, EUA). A média do cálcio intracelular foi determinada pela medida da proporção de fluorescência do Indo-AM (390 nm/490 nm).

3.10 - Medida da atividade proliferativa de células B

A atividade proliferativa foi avaliada através do método de incorporação de timidina tritiada previamente descrito (Brunswick *et al*, 1988). As células B purificadas pelo isolamento anteriormente descrito foram adicionadas à cultura na concentração de $2,5 \times 10^5$ células por poço com os estímulos descritos. Após 72 horas de incubação a 37 °C com 7% de CO₂, foi adicionado 0,5 µCi de timidina tritiada e as culturas incubadas por mais 18 horas, foram recolhidas em papel de filtro Whatmam, para a retenção do DNA. Os filtros foram lavados, secos e adicionados a tubos com líquido de cintilação. A incorporação de timidina foi medida através de um espectrômetro de cintilação líquida da Beckman Coulter,

modelo LS6500. O tempo de contagem de cada amostra foi de 1 minuto e os resultados obtidos foram expressos em contagem por minuto (cpm).

3.11 - Dosagem de imunoglobulinas no sobrenadante de culturas

Células B (5×10^4 por poço) foram estimuladas com LPS 10 $\mu\text{g/ml}$, Pam3cys 1 $\mu\text{g/ml}$ e curcumina nas concentrações de 1, 3 e 10 μM . Nos experimentos com warifteína a mesma foi utilizada nas concentrações de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$. As culturas foram incubadas por 7 dias a 37 °C com 7% de CO₂. Foram feitas culturas em triplicatas e os sobrenadantes foram reunidos em um “pool”. Placas de poliestireno de fundo (modelo Costar 3590, Corning, NY, EUA) foram cobertas com anticorpo de cabra anti-IgM de camundongo (SIGMA Chem. Co., St. Louis, MO, EUA) e incubadas por cerca de 20 horas. Após lavagem com PBS as mesmas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com PBS contendo 1% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA). Após o bloqueio das ligações inespecíficas, foram adicionadas as amostras (nas diluições de 1:1, 1:5, 1:25, 1:125) e as diluições do padrão de IgM purificada (ICN, Biomedicals, Irvine, CA, EUA) usada para a elaboração da curva padrão. Depois de 6 horas de incubação, e lavagem, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgM marcado com fosfatase alcalina (Southern Biotechnology Ass. Inc., Birmingham, AL, EUA) e foi feita incubação de 16 horas. A visualização da ligação do anticorpo secundário foi realizada pela adição do substrato cromogênico p-nitrofenolfosfato (SIGMA Chem. Co., St. Louis, MO, EUA) diluído em tampão Tris-MgCl₂ pH 9,5. A leitura de A405 foi feita em leitor de microplacas (BIORAD modelo 550).

3.12 - Imunofluorescência

Células A20 foram aderidas a lâminulas previamente revestidas com poly-L-lysina (SIGMA Chem. Co., St. Louis, MO, EUA) e estimuladas com anticorpo anti-IgM (5 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos. As lâminas foram então lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 2% e lavadas novamente. Em seguida foram permeabilizadas com saponina 0,1% lavadas e incubadas por 30 minutos com anticorpo anti-TAPP2. O anticorpo secundário empregado

foi IgG de burro anti-Ig de coelho acoplado a Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc, PA, USA). Finalmente, as lamínulas foram montadas em lâminas com a utilização do meio de montagem composto de orto-fenilenediamina (OPDA) 2 mg/ml, 0,1 M de Tris (pH 8,5) em glicerol. Em seguida foram analisadas em microscópio de fluorescência.

3.13 - Dosagem de adenosina monofosfato cíclico

Células B (1×10^6 /ml) foram purificadas no dia anterior e incubadas por 16 horas a 37°C em estufa com 7% de CO_2 . No dia do ensaio, as células foram estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), Rolipran (3-Isobutyl-1-methylxanthine) (inibidor de fosfodiesterase) e Fosfokolin (que é ativador da proteína quinase A). O Rolipran e Fosfokolin foram gentilmente cedidos pela Dra Patrícia Silva (IOC, FIOCRUZ) e foram utilizados na concentração de 10 μM . As células foram lisadas após duas horas de incubação e o cAMP foi quantificado por ELISA de competição, utilizando o Kit comercial cAMP Enzymeimmunoassay BiotrakTM (EIA) System (dual range) (Amersham Biosciences, UK) de acordo com as especificações do fabricante. Algumas culturas foram tratadas com warifteina, adicionada na dose de 1 ou 10 $\mu\text{g/ml}$.

3.14 - Western Blotting

Para avaliar o perfil de fosforilação total e a fosforilação de MAPKs foram feitas culturas de células B purificadas (1×10^7 /ml) que foram tratadas com curcumina ou warifteina simultaneamente à adição dos estímulos. Nos experimentos utilizando curcumina as células foram estimuladas com anti-IgM (5 $\mu\text{g/ml}$) por 5 minutos, LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), oligodeoxinucleotídeo com seqüência CpG (1 $\mu\text{g/ml}$) ou Pam3cys (1 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos. Nos experimentos com warifteina, as células foram estimuladas com anti-IgM (5 $\mu\text{g/ml}$) por 5 minutos e LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos.

Nos experimentos para a verificação de fosforilação de TAPP2 foram utilizadas células A20 (6×10^6 /ml) estimuladas com IgG intacta de coelho anti-IgM de camundongo (RAMIG) 5 $\mu\text{g/ml}$ ou IgG F(ab') (RAMIG Fab) 7 $\mu\text{g/ml}$ por 5 minutos.

Após a estimulação e respectivos tratamentos, as células foram lisadas com tampão NP-40 (Gibco, Grand Island, NY, EUA), contendo inibidores de proteases (Calbiochem, San Diego, CA, EUA). As amostras foram incubadas por 20 minutos a 4 °C. Foram, então, centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e aos sobrenadantes foi adicionado tampão de amostra (SDS 4x).

As amostras foram separadas em SDS-PAGE (15%) com 100 V e posteriormente transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore) previamente ativada com metanol para realização do western blotting.

Após a transferência as membranas foram bloqueadas com TBS com 2% de BSA (SIGMA Chem. Co., St. Louis, MO, EUA) e incubadas com anticorpos primários por 16 horas.

Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes: a) anti-TAPP2 (diluído 1:500; obtido no decorrer desse trabalho), b) 4G10 (anticorpo que reconhece resíduos de tirosina fosforilados; diluído 1:10000 (ATCC, Rockville, MD, EUA), c) anti-p38 e anti-p-p38 (que reconhecem a MAPK p38 na sua forma total e fosforilada, respectivamente; diluídos 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), d) anti-IκB e anti-p IκB (que reconhecem a forma total e fosforilada da proteína IκB, respectivamente; diluídos 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), e) anti-ERK e anti-pERK (que reconhecem a forma total e fosforilada da MAPK ERK; diluídos 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).

Após incubação com os anticorpos as membranas foram lavadas com TBS Tween 20 (3X) e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário. Nos experimentos onde o anticorpo primário foi o anti-TAPP2 utilizou-se anti-Ig de coelho (1:5000; Jackson Immunoresearch, PA, EUA). Nos demais experimentos foi usado anti-Ig de camundongo (1:3000; Jackson Immunoresearch, PA, EUA). As membranas foram novamente lavadas e reveladas utilizando um sistema de quimioluminescência (SuperSignal, Kodak) e papel fotográfico (Kodak).

3.15 – Preparação de anticorpo anti-TAPP2 ligado a sefarose

Esferas de glutathione sefarose (0.29g) foram hidratadas com 10 ml de HCl 1 mM por 15 minutos em agitação contínua. Em seguida as mesmas foram lavadas em filtro de vidro por decantação por 3 vezes intercalando o uso de HCl 1mM e PharmaLink Coupling Buffer (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA). As esferas lavadas foram gentilmente recolhidas do filtro e colocadas em uma solução contendo anticorpos anti-TAPP2 diluído em tampão de ligação. Incubadas por 16 horas em rotação contínua a 4 °C. Após a incubação o material foi centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos, lavadas com PharmaLink Coupling Buffer e então incubadas com Tris 100 mM pH 8 por 16 horas a 4 °C em agitação contínua para a retirada dos anticorpos não ligados. Em seguida as esferas foram lavadas 6 vezes intercalando o uso dos tampões de ligação e tampão acetato. Finalmente as esferas foram ressuspensas em PBS com 0,02% de azida onde foram guardadas a 4 °C até o momento do uso.

3.16 – Imunoprecipitação de TAPP2 e coloração direta em gel por Sypro Ruby

Para os ensaios de imunoprecipitação foram utilizadas células B na concentração de 6.0×10^6 /ml que foram estimuladas com IgG intacta de coelho anti-IgM de camundongo (5 µg/ml) ou IgG F(ab')₂ (anti-IgM Fab) 7 µg/ml por 5 minutos. Após a estimulação as células foram lisadas com tampão NP-40 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) contendo inibidores de proteases (Calbiochem, San Diego, CA, EUA) e incubadas por 20 minutos a 4 °C. As amostras foram, então, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e aos sobrenadantes foi adicionado tampão de amostra (SDS 4x). Essas amostras foram incubadas por 16 horas em agitação constante com anti-TAPP2 ligados a esferas de sefarose. Após esse período as esferas foram centrifugas 3 vezes a 1200 rpm por 5 minutos a 4 °C, ressuspensas em tampão de amostra (SDS 4x) e estocadas -80 °C até o momento do uso.

Para a coloração por Sypro Ruby células A20 (6.0×10^6 /ml) foram estimuladas com 5µg/ml de IgG intacta de coelho anti-Ig de camundongo por 5 minutos. As culturas foram lisadas com o mesmo tampão citado acima por 20 minutos a 4 °C e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram incubados com esferas de sefarose ligadas a anti-TAPP2 por 16 horas a 4 °C, seguido de centrifugação a 1200 rpm por 5

minutos. As esferas foram recolhidas e eluídas 3 vezes em tampão ácido conforme instruções do fabricante do corante (Invitrogen detection Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As amostras eluídas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida a 10% e coradas com Sypro Ruby conforme especificações do fabricante.

3.17 - Dosagem de NFκB em extratos nucleares por EMSA

Células B purificadas (1×10^7 /ml) foram estimuladas com LPS (10 µg/ml) e tratadas com curcumina (10 µM) ou warifteína (10 µg/ml) por 16 horas. Após a incubação as células foram lisadas seguindo protocolo descrito anteriormente (Sheinman *et al*, 1995). Para a realização do EMSA os lisados celulares foram incubados com 40.000 cpm de ^{32}P associado à seqüência dupla-fita consenso de oligonucleotídeos de NFκB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), e incubados por 30 minutos a 25 °C. A mistura incluiu 1 µg de poly(dI-dC):poly(dI-dC) em tampão de ligação (10 mM Hepes, pH 7,9, 4% de glicerol, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 0,1 mg de BSA).

O complexo proteína-DNA foi separado das seqüências livres em gel de poli-acrilamida nativa (4%) e, após secagem, foi visualizado pelo Phosphoimage analysis (Molecular Dynamics, Amersham, Piscataway, NJ, EUA). Um oligonucleotídeo dupla-fita mutante (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) foi utilizado para verificar a especificidade da ligação do DNA com o NFκB.

3.18 - Análises estatísticas

Foi realizado o teste t de *Student* para amostras não pareadas através do assistente gráfico PrismaGraphPad 4. Os resultados com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 – RESULTADOS

4.1 - PARTE I – Caracterização do envolvimento de TAPP2 na modulação da ativação de células B

4.1.1 - Preparo de TAPP2 recombinante

A primeira etapa do nosso trabalho foi o preparo da proteína TAPP2 recombinante. Para isso, foi feita a transformação de bactérias *E. coli*. utilizando o vetore PGEX-3X contendo seqüências da proteína como descrito na seção Materiais e Métodos. As bactérias transformadas foram crescidas e as colônias selecionadas e testadas pela técnica de PCR para comprovação da eficiência da transformação. Obtivemos duas colônias transformadas e selecionamos a de número 13 (Figura 1). Essas bactérias foram crescidas em larga escala para purificação das proteínas TAPP2.

4.1.2 – Reconhecimento de uma única banda de aproximadamente 50 kDa em lisados e imunoprecipitados de células A20

De posse das proteínas purificadas, iniciamos a fase de imunização de coelhos para a produção de anticorpos específicos. Os coelhos foram imunizados e, após três meses, obtivemos os anticorpos purificados que foram testados quanto a sua capacidade de reconhecer a proteína TAPP2 em lisados de células A20 estimuladas ou não com anti-IgM. Os anticorpos anti-TAPP2 purificados reconheceram uma única banda de aproximadamente 50 kDa nos lisados celulares (Figura 2a), que corresponde ao peso molecular de TAPP2. Avaliamos a possibilidade de ligação inespecífica do anticorpo secundário incubando as membranas apenas com esse anticorpo, porém nenhuma ligação foi observada.

Avaliamos, também, a utilização do anticorpo anti-TAPP2 para a análise de imunoprecipitados. Anticorpos anti-TAPP2 ligados a esferas de sefarose mostraram-se capazes de ligar a proteínas existentes nos lisados celulares e estes não se ligam inespecificamente, visto que a incubação das esferas apenas com o anticorpo secundário não revelou nenhuma marcação (Figura 2b). Nossos resultados demonstram que o

anticorpo produzido reconhece uma única banda de aproximadamente 50 kDa, e pode ser utilizado tanto para análise de lisados totais quanto de imunoprecipitados.

4.1.3 - Avaliação da eficiência de retirada de TAPP2 de lisados de células A20

Sabendo que o anticorpo obtido do soro de animais imunizados se ligava a TAPP2 nos lisados celulares, realizamos a seguir experimentos para verificar a eficiência da imunoprecipitação. Dessa forma verificamos se, após a imunoprecipitação, ainda restava TAPP2 nos lisados. Para isso, comparamos o imunoprecipitado nas esferas com os lisados restantes após a incubação. Constatamos que as esferas foram capazes de retirar a maior parte das proteínas existentes nos lisados celulares (Figura 3).

4.1.4 - Proteínas obtidas por eluição de imunoprecipitados com anti-TAPP2

Como mais uma comprovação da especificidade do anticorpo produzido, utilizamos a técnica de coloração Sypro Ruby, que cora diretamente no gel as proteínas retiradas de imunoprecipitados por eluição com tampão ácido. Esta técnica foi utilizada com o intuito de demonstrar que as proteínas ligadas a anti-TAPP2 não eram grandes agregados proteicos. Nossos resultados mostraram mais uma vez que essas proteínas constituem uma única banda de aproximadamente 50 kDa (Figura 4).

4.1.5 - Fosforilação de TAPP2 em células A20 estimuladas com anti-IgM intacta

A seguir realizamos estudos funcionais testando se a ativação celular levava à fosforilação de TAPP2. Para isso, células A20 foram estimuladas com IgG de rato anti-IgM de camundongo na sua forma intacta ou IgG F(ab`) por 5 minutos. Os lisados dessas células foram analisados pela técnica de *Western blotting* usando anticorpo anti-fosfotirosina. Observamos que ocorreu fosforilação de proteínas em ambas as situações, no entanto a fosforilação da banda de 50 kDa foi maior quando utilizamos o anticorpo intacto (Figura 5a), ou seja, a molécula inteira foi capaz de induzir co-agregação dos receptores BCR/FcγRII. Para confirmar a fosforilação de TAPP2 ocorrida apenas quando células B

eram ativadas com anticorpo intacto, realizamos análise de fosforilação de proteínas TAPP2 purificadas por imunoprecipitação de células B ativadas. Observamos que a fosforilação ocorre apenas com o uso do anticorpo intacto e é máxima após 5 minutos de ativação (Figura 5b). Esta foi a primeira demonstração da fosforilação de proteínas TAPP2 em células B ativadas.

4.1.6 - Fosforilação de TAPP2 em células B purificadas de animais deficientes em SHIP

Trabalhos anteriores demonstraram que TAPP2 tem a capacidade de se ligar a $PI(3,4)P_2$, que é gerado após a hidrólise de $PI(3,4,5)P_3$ mediado pela fosfatase SHIP. Avaliamos, a seguir, se a fosforilação de TAPP2 estaria diminuída em animais deficientes em SHIP (Coggeshall, 2002), que talvez tenha comprometida sua produção de $PI(3,4)P_2$ e animais controles normais que expressam SHIP. As células B purificadas desses animais foram estimuladas por 5 minutos com IgG de rato anti-IgM de camundongo na sua forma intacta ou IgG $F(ab')_2$. Os lisados celulares foram obtidos e os imunoprecipitados foram submetidos a SDS-PAGE e avaliados por *Western blotting*. Observamos que nesses animais a fosforilação de TAPP2 diminuiu de forma significativa quando comparado com os animais controles (Figura 6).

4.1.7 - Fosforilação de TAPP2 em células B de animais anérgicos ARS

Camundongos ARS são animais anérgicos por possuírem BCR que reconhecem peptídeos endógenos, além de reconhecerem o hapteno azofenil arsonato (Cambier *et al.*, 2007). Nesses animais as células B apresentam capacidade reduzida para responder a estímulos via BCR (Brauweiler *et al.*, 2007). Nesse modelo o padrão de resposta é contrário ao observado no modelo do camundongo deficiente na molécula SHIP, visto que, células de camundongos ARS permanecem em estado de anergia mesmo após estimulação com imunógenos clássicos de células B. Avaliamos então, se a estimulação levaria a alguma alteração da fosforilação de TAPP2 em células B purificadas de camundongos ARS estimuladas por 5 minutos com IgG de rato anti-IgM de camundongo na sua forma intacta

ou IgG F(ab')₂. Os imunoprecipitados dessas células foram analisados pela técnica de *Western blotting*. Nossos resultados mostraram que, ao contrário do que vimos em animais deficientes em SHIP, em células de animais anérgicos a fosforilação de TAPP2 estava significativamente aumentada (Figura 7).

4.1.8 – Recrutamento de proteínas TAPP2 para a membrana após a co-agregação de receptores FcγRII/BCR

Dados da literatura mostraram em modelos com expressão aumentada de TAPP2, que essa proteína era recrutada para a membrana após estimulação com anti-IgM intacta (Marshall *et al.*, 2002). Testamos, a seguir, se esta mobilização ocorre em células A20 estimuladas com anticorpo anti-IgM e se o anticorpo por nós preparado seria adequado para sua visualização por fluorescência. Nossos resultados revelaram que a proteína TAPP2 é recrutada para a membrana após co-agregação FcRII/BCR e que nosso anticorpo é, de fato, útil para utilização em análises com imunofluorescência (Figura 8).

4.2 - PARTE II – Efeitos imunomoduladores da curcumina em células B

4.2.1 – Verificação da citotoxicidade da curcumina em células B

Apesar da curcumina ser um isolado de produto natural largamente utilizado e testado não tendo nenhuma atividade tóxica descrita após testes em uma variedade de tipos celulares, achamos importante testar se a mesma seria também inócua para células B purificadas. Avaliamos por citometria de fluxo a incorporação de iodeto de propídeo por células incubadas por 48 horas com LPS na presença de curcumina. Observamos que a curcumina não exerce efeito tóxico em células B, sejam elas estimuladas ou não com LPS (Figure 9).

4.2.2 - Efeito da curcumina na resposta de células B estimuladas por ativadores policlonais

Com o objetivo de avaliar se a curcumina exerceria algum efeito na resposta proliferativa de células B purificadas de camundongos BALB/c, estimulamos células B isoladas de baço com LPS, anti-delta-dextrana e anti-IgM. As culturas foram tratadas simultaneamente com curcumina em três diferentes concentrações (1, 3 ou 10 μM) e após 3 dias foi testada a proliferação celular através da incorporação de timidina tritiada. Nossos resultados mostraram que em culturas estimuladas com LPS foi observado um efeito inibitório. Esse efeito foi observado nas três doses de curcumina utilizadas tendo se mostrado mais marcante na concentração de 10 μM , onde observamos uma inibição de 82% (Figura 10a). Entretanto a curcumina não foi capaz de inibir a proliferação de células B estimuladas com anti-delta-dextrana (Figura 10b) ou anti-IgM (Figura 10c) de maneira significativa. Avaliamos também o efeito da curcumina na resposta induzida por outros ligantes de receptores tipo Toll e observamos que, além da resposta ao LPS, a resposta estimulada por deoxinucleotídeos com seqüências CpG é inibida pela curcumina, enquanto a mesma não tem efeito importante na resposta induzida por Pam3cys (Figura 10d).

Após a observação de que a curcumina inibia a proliferação de células B estimuladas por LPS, avaliamos se a curcumina alteraria a produção de imunoglobulinas. Para isso, células B purificadas foram estimuladas com LPS e tratadas com curcumina simultaneamente e o nível de IgM no sobrenadante foi dosado após 7 dias de cultura. A curcumina inibiu 98% da secreção de imunoglobulinas medida no sobrenadante de culturas estimuladas com LPS. Esse efeito foi mais marcante na concentração de 10 μM , embora também já fosse significativo na dose de 3 μM (Figura 11).

Baseados nos resultados iniciais do nosso trabalho, que mostram que a curcumina inibiu a proliferação e produção de imunoglobulinas em células ativadas com LPS, decidimos avaliar se esse efeito abrangeria a expressão de moléculas co-estimulatórias. Células B estimuladas com LPS ou anti-IgM tratadas ou não com curcumina foram cultivadas por 48 horas e então marcadas com anticorpos anti-B220 e anti-CD86 e analisadas por citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram que a estimulação pelo

LPS leva a expressão de CD86 e que essa expressão não se altera significativamente em células estimuladas e tratadas com curcumina (Figura 12).

4.2.3 – Efeito da curcumina na transdução de sinal em células B estimuladas por LPS ou anti-IgM

Avaliamos inicialmente se a curcumina alteraria o perfil de fosforilação de proteínas com resíduos de tirosina em proteínas totais de células B ativadas. Foram avaliadas células B estimuladas com LPS, CpG, Pam3cys, anti-IgM e tratadas com curcumina. Após a análise dos lisados dessas células pela técnica de *Western Blotting* observamos que uma discreta alteração no perfil de fosforilação foi observada (Figura 13). Avaliamos, ainda se outro evento inicial envolvido na sinalização de células B, a mobilização de cálcio intracelular, seria afetado pelo tratamento com curcumina. Nossos resultados mostraram que células estimuladas com anticorpo anti-IgM e tratadas com curcumina não apresentam alteração na mobilização de cálcio intracelular (Figura 14).

Embora a análise da fosforilação total de resíduos de tirosina em proteínas totais de células B ativadas tenha demonstrado que a curcumina não era capaz de produzir grandes alterações no perfil de fosforilação total, decidimos avaliar isoladamente o perfil de fosforilação em proteínas importantes para a ativação. Primeiramente avaliamos a fosforilação de MAPK em culturas feitas na presença de curcumina. Para isso, células B purificadas foram estimuladas com LPS, CpG, Pam3cys e anti-IgM, e tratadas com curcumina. As proteínas ERK e p38 foram identificadas por *Western Blotting* e seu nível de fosforilação foi determinado. Observamos que a curcumina foi capaz de inibir a fosforilação das MAPKs ERK e p38 (Figura 15), indicando que essas moléculas constituem possíveis alvos moleculares da curcumina.

Para verificar se o tratamento com a curcumina reduziria a migração de NFκB para o núcleo de células B estimuladas com LPS, foram feitas culturas de células B purificadas que foram estimuladas com LPS e simultaneamente tratadas com curcumina e incubadas por 16 horas. Através da técnica de EMSA constatamos que nas culturas tratadas com curcumina houve uma significativa redução na concentração de NFκB nos lisados nucleares

dessas células o que não ocorreu nos controles estimulado apenas com LPS, onde foi observada uma intensa translocação desse fator para o núcleo (Figura 16).

A migração de NFκB para o núcleo é secundária a fosforilação e proteólise de IκB. Assim, após observar inibição da migração de NFκB para o núcleo, testamos se o bloqueio da migração desta proteína estaria relacionado à alteração na fosforilação de IκB. Utilizamos culturas de células B purificadas estimuladas com LPS, CpG, Pam3cys, anticorpo anti-IgM e tratadas ou não com curcumina. Nossos resultados mostraram que o tratamento com curcumina foi capaz de inibir a fosforilação de IκB (Figura 17).

Esses resultados sugerem que a curcumina interferiria na via de ativação do NFκB deflagrada pelo LPS por interferir na fosforilação de IκB.

4.3 - PARTE III – Efeitos imunomoduladores da warifteina em células B

4.3.1 – Verificação da citotoxicidade da warifteina em células B

O primeiro passo dessa etapa do trabalho foi avaliar se a warifteina teria algum efeito tóxico induzindo morte em células B. Para isso, realizamos um ensaio de marcação com iodeto de propídio por citometria de fluxo em culturas de células B purificadas incubadas com warifteina. As culturas estimuladas ou não com LPS e tratadas ou não com warifteina por 24 horas foram marcadas com anticorpo anti-B220 e tratadas com iodeto de propídio no momento da análise em citômetro de fluxo. Avaliamos na população marcada pelo anticorpo anti-B220 a porcentagem de células marcadas com de iodeto de propídio e não observamos aumento no número de células mortas na cultura (Figura 18).

Adicionalmente, analisamos o efeito da warifteina sobre a linhagem tumoral DAUDI. As células foram tratadas com warifteina nas doses de 0,1, 1, 5 e 10 µg/ml. Observamos que o tratamento com warifteina não produz morte celular (avaliada pela contagem de células viáveis e não viáveis utilizando o corante azul de Trypan) (Figura 19).

4.3.2 – Efeito da warifteina na ativação induzida por ativadores policlonais de células B

Com o intuito de avaliar a capacidade imunomoduladora da warifteina em células B, inicialmente avaliamos se a warifteina inibiria a resposta proliferativa de células B. Utilizamos culturas de células B purificadas que foram estimuladas com LPS e tratadas com diferentes doses de warifteina e medimos a resposta proliferativa dessas células. Observamos que a warifteina tem efeito inibitório chegando a inibir 98% da proliferação de células B na dose de 10 µg/ml (Figura 20).

Avaliamos, também, se o efeito inibitório da warifteina observado em células estimuladas por LPS se repetiria em células estimuladas por outros ligantes de receptores do tipo Toll. Utilizamos como estímulo oligodeoxinucleotídeo com seqüências CpG, Pam₃cys e um estímulo clássico induzido via BCR que é o anticorpo anti-IgM. O efeito inibitório na resposta proliferativa destas células ativadas com estas substâncias também foi observado (Figura 21). Células estimuladas com LPS apresentaram inibição de 96%, CpG 63%, Pam₃cys 50% e anti-IgM 75%.

Com objetivo de avaliar se o efeito inibitório da warifteina na resposta proliferativa de células B estava restrito as etapas iniciais da ativação celular, foi feito estudo cinético onde a warifteina foi adicionada em diferentes tempos após o início da cultura. Estas foram estimuladas com LPS, oligodeoxinucleotídeo com seqüências CpG, Pam₃cys ou anticorpo anti-IgM, no tempo zero de cultura e tratadas com warifteina nos tempos indicados. A resposta proliferativa foi medida após 72 horas. Nossos resultados mostraram que o efeito inibitório da warifteina pode ser observado mesmo se este alcalóide for adicionado em momentos tardios da ativação (Figura 22).

A expressão de moléculas co-estimulatórias em células B ativadas é um dos eventos induzidos em resposta a LPS e anti-IgM. Verificamos, assim, se a warifteina modificaria a expressão de CD86 em células B ativadas. As culturas foram estimuladas com LPS ou anti-IgM por 48 horas e tratadas simultaneamente com warifteina. Em seguida foi avaliada por citometria de fluxo a expressão de CD86 em células B220⁺. Nossos resultados mostraram que o tratamento com warifteina não foi capaz de alterar a expressão do CD86 induzida por LPS ou anti-IgM (Figura 23).

Avaliamos adicionalmente se a secreção de imunoglobulinas também estaria comprometida após o tratamento com warifteina. Culturas de células B purificadas estimuladas com LPS ou Pam₃cys e tratadas com warifteina apresentaram diminuição significativa na secreção de imunoglobulinas do tipo IgM (Figura 24). Nas células estimuladas com Pam₃cys ocorreu inibição de 35% e nas células estimuladas com LPS observamos 99% de inibição.

4.3.3 – Efeito da warifteina na sinalização intracelular em células B ativadas

Após a caracterização do efeito inibitório da warifteina na ativação de células B, iniciamos a avaliação de um possível envolvimento deste alcalóide sobre as principais vias de sinalização em células B. Inicialmente analisamos o perfil de fosforilação de proteínas em células B purificadas estimuladas com LPS ou anti-IgM e tratadas com warifteina. Nossos resultados mostraram que o tratamento não alterou o perfil de fosforilação em resíduos de tirosina em proteínas totais (Figura 25). Avaliamos, ainda, se haveria alteração na fosforilação da MAPK ERK. Nossos resultados indicam que células estimuladas com LPS e tratadas com warifteina apresentaram uma redução na fosforilação de ERK enquanto que esse efeito não foi observado em células estimuladas com anti-IgM e tratadas com warifteina (Figura 26).

Investigamos, finalmente, a translocação do fator NFκB para o núcleo em culturas tratadas com LPS na presença ou ausência de warifteina. Os lisados nucleares dessas culturas de células B foram obtidos e analisados pela técnica de EMSA. Observamos que o tratamento com warifteina bloqueou a translocação do NFκB para o núcleo das células ativadas com LPS quando comparamos com os níveis nucleares de culturas ativadas não tratadas com o alcalóide (Figura 27).

4.3.4 – Efeito da warifteina na concentração intracelular de cAMP

Vários estudos anteriores mostraram que o extrato de *C. cymodialis* induz o aumento de cAMP intracelular em diferentes tipos celulares. Verificamos, então, se o aumento de cAMP poderia ser um possível mecanismo de ação da warifteina em nosso

modelo. Para isso, preparamos culturas de células B purificadas estimuladas com LPS e tratadas com warifteina e fizemos a dosagem de cAMP após 2 horas de cultura. Culturas controles foram tratadas com Rolipran e Forskolin. Observamos que a warifteina induz um aumento nos níveis intracelulares de cAMP (Figura 28), sugerindo que esse possa ser seu mecanismo de ação.

5 – FIGURAS

PARTE I – Envolvimento de TAPP2 na modulação da ativação de células B

Figura 1. Seleção de colônias positivas para a proteína TAPP2. A expressão de TAPP2 foi testada em diferentes Tc 0 Tw 173545 706.635 0 (de colôni(1ara14)43o 2.)Tj2TT1 1 Tf0.8 0 Tw 1732

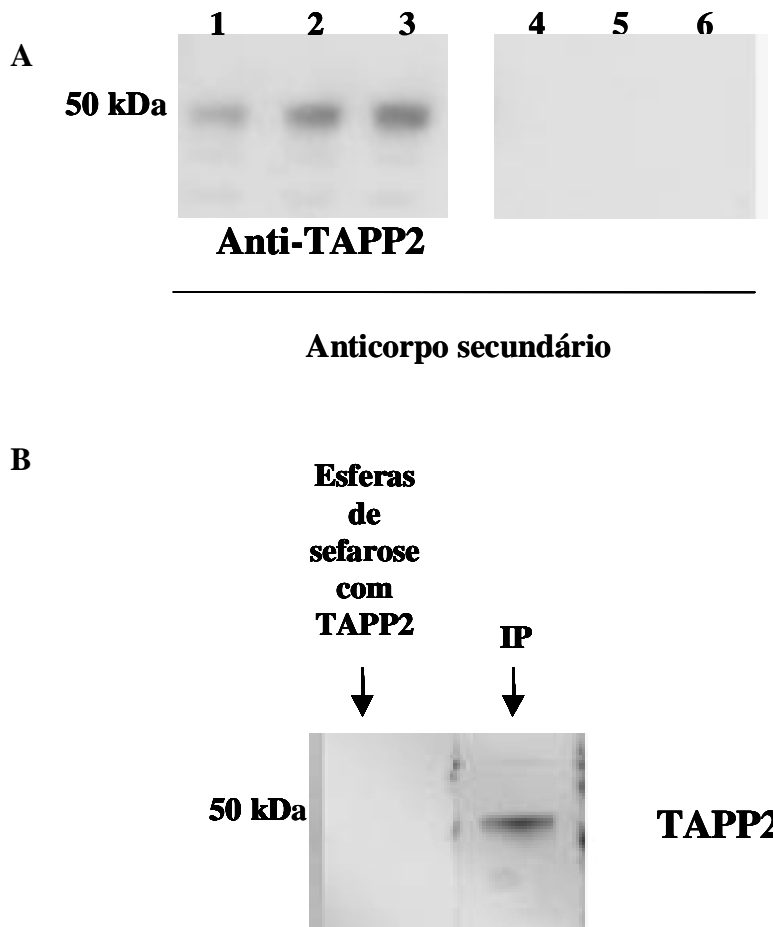


Figura 2. Avaliação da especificidade do anticorpo para a proteína TAPP2 em lisados e imunoprecipitados de células A20. (A) Células A20 (6×10^6 em 200 μ l) foram estimuladas com IgM intacta de rato anti-imunoglobulina de camundongo (anti-IgM; 5 μ g/ml), lisadas e analisadas por *Western blotting*. Membrana de PVDF foram incubadas com o anticorpo primário anti-TAPP2 e secundário anti-Ig de coelho ligado peroxidase. As amostras de número 1, 2 e 3 correspondem a cultura não estimulada, estimulada por 2 minutos e estimulada por 5 minutos com anti-IgM, respectivamente. As amostras de número 4, 5, e 6 correspondem a mesma seqüência de estimulação, porém a membrana foi incubada apenas com o anticorpo secundário. (B) Células A20 foram estimuladas por 5 minutos com anticorpo anti-IgM de camundongo e o lisado foi imunoprecipitado (IP) com anticorpo anti-TAPP2 ligado a esferas de sefarose. O material obtido foi submetido à corrida eletroforética e analisados pela técnica de *Western blotting*. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

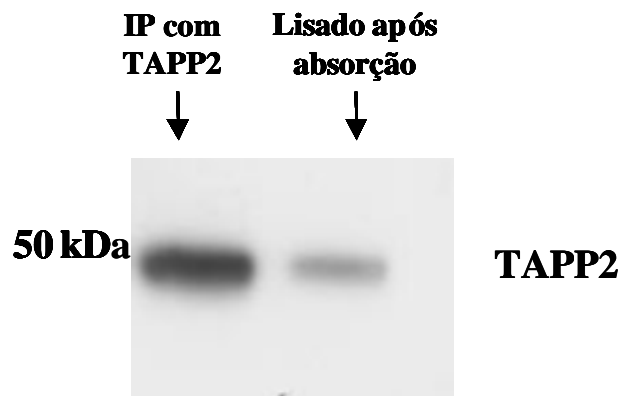


Figura 3. Avaliação da eficiência da retirada de TAPP2 de lisados de células A20 estimuladas utilizando esferas de sefarose ligadas ao anticorpo anti-TAPP2. Células A20 (6×10^6 em 200 μ l) foram estimuladas com IgG intacta anti-IgM de camundongo (5 μ g/ml). O lisado total das células foi imunoprecipitado (IP) com anticorpo anti-TAPP2 ligado a esferas de sefarose. Em seguida foram submetidas à corrida eletroforética e transferidas para uma membrana de PVDF. As análises por *Western blotting* foram realizadas com o anticorpo primário anti-TAPP2 e anticorpo secundário anti-Ig de coelho ligado a peroxidase. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

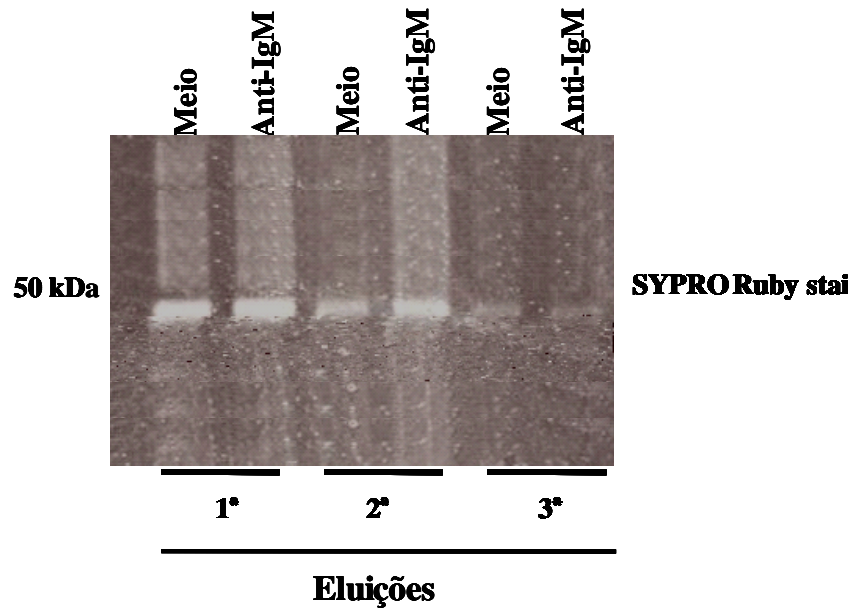


Figura 4. Proteínas ligadas a anticorpos anti-TAPP2 ligados a sefarose obtidas por eluição possuem peso molecular de aproximadamente 50kDa. Células A20 (6×10^6 em $200 \mu\text{l}$) foram estimuladas com IgG intacta anti-IgM de camundongo ($5 \mu\text{g/ml}$). O lisado total foi imunoprecipitado com anti-TAPP2 ligado a sefarose. Após a imunoprecipitação as proteínas ligadas às esferas de sefarose foram eluídas com tampão ácido para a liberação das proteínas imunoprecipitadas. Essas proteínas foram submetidas à corrida eletroforética em gel SDS-PAGE e o gel foi corado com SYPRO Ruby Gel Stain. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

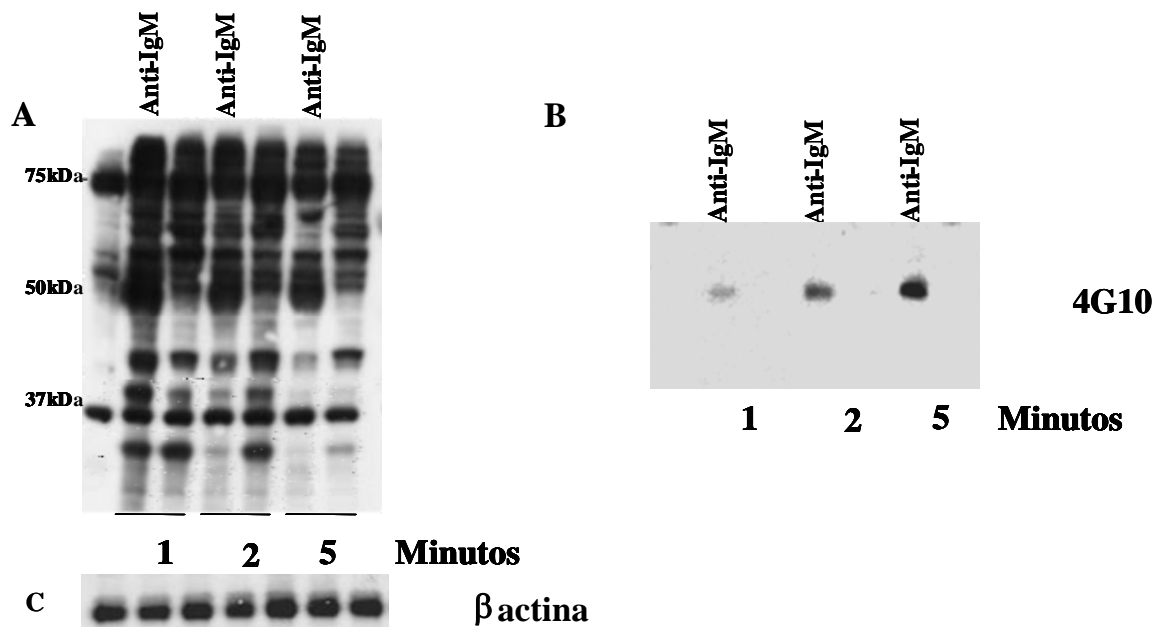


Figura 5. Fosforilação de TAPP2 em células A20 estimuladas. Células A20 (6×10^6 em $200 \mu\text{l}$) foram estimuladas com IgG intacta anti-IgM de camundongo ($5 \mu\text{g/ml}$) ou IgG F(ab')_2 anti-camundongo (anti-IgM Fab; $7 \mu\text{g/ml}$) por 5 minutos. O lisado total das células foi imunoprecipitado com anticorpo anti-TAPP2 ligado a esferas de sefarose. As amostras foram submetidas à corrida eletroforética e transferidas para uma membrana de PVDF. O nível de fosforilação em resíduos de fosfotirosina foi avaliado por Western blotting. (A) Lisado total marcado com anticorpo anti-fosfotirosina total (4G10). (B) Imunoprecipitado com anticorpo anti-TAPP2 ligado à esfera de sefarose marcado com 4G10. (C) Marcação controle com β -actina. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

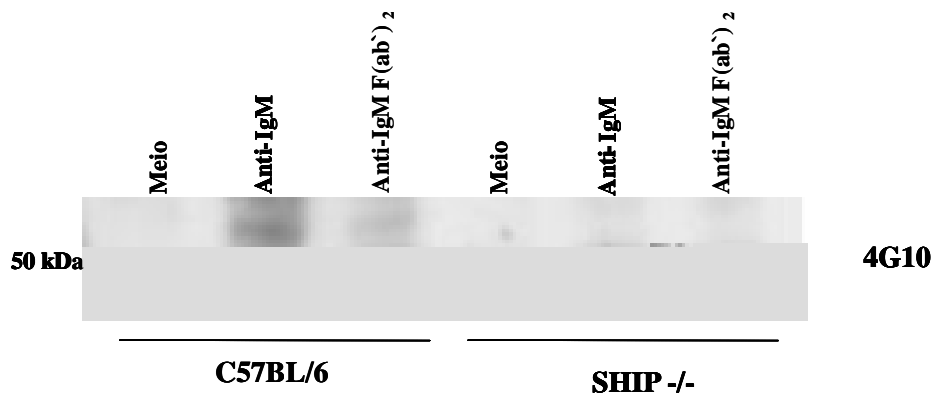


Figura 6. Fosforilação de TAPP2 em animais deficientes de SHIP. Células B purificadas (6×10^6 em $200 \mu\text{l}$) foram estimuladas com IgG intacto anti-imunoglobulina de camundongo (anti-IgM; $5 \mu\text{g/ml}$) ou IgG F(ab')₂ de anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo (anti-IgM Fab; $7 \mu\text{g/ml}$) por 5 minutos. O lisado total foi imunoprecipitado com anticorpo anti-TAPP2 ligado a esferas de sefarose. As amostras foram submetidas à corrida eletroforética e transferidas para membrana de PVDF. Os *Western blotting* foram realizados com anticorpo anti-fosfotirosina total (4G10). Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

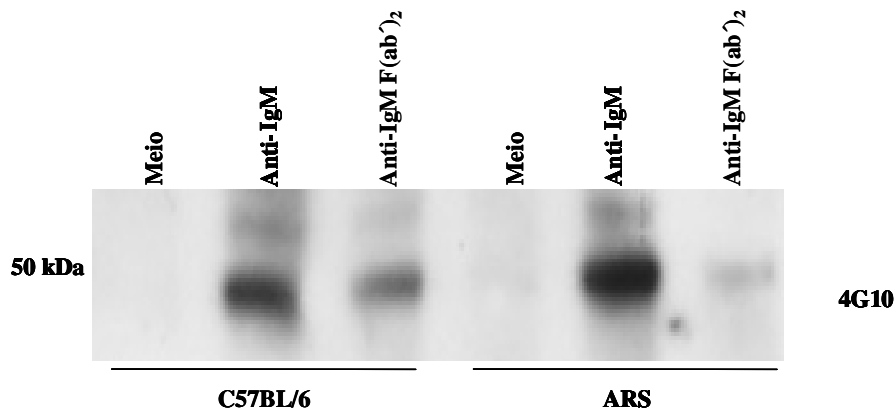


Figura 7. Fosforilação de TAPP2 em células B de animais anérgicos ARS após co-agregação $Fc\gamma RII/BCR$. Células B purificadas (6×10^6 em $200 \mu l$) foram estimuladas com IgG intacta anti-IgM de camundongo (anti-IgM; $5 \mu g/ml$) ou $F(ab')_2$ de anti-IgM de camundongo (anti-IgM Fab; $7 \mu g/ml$). O lisado total foi submetido a imunoprecipitação com anti-TAPP2 ligado a sefarose. As amostras foram submetidas a corrida eletroforética e transferidas para membrana de PVDF. O *Western blotting* foi realizado com o anticorpo anti-fosfotirosina total (4G10). Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

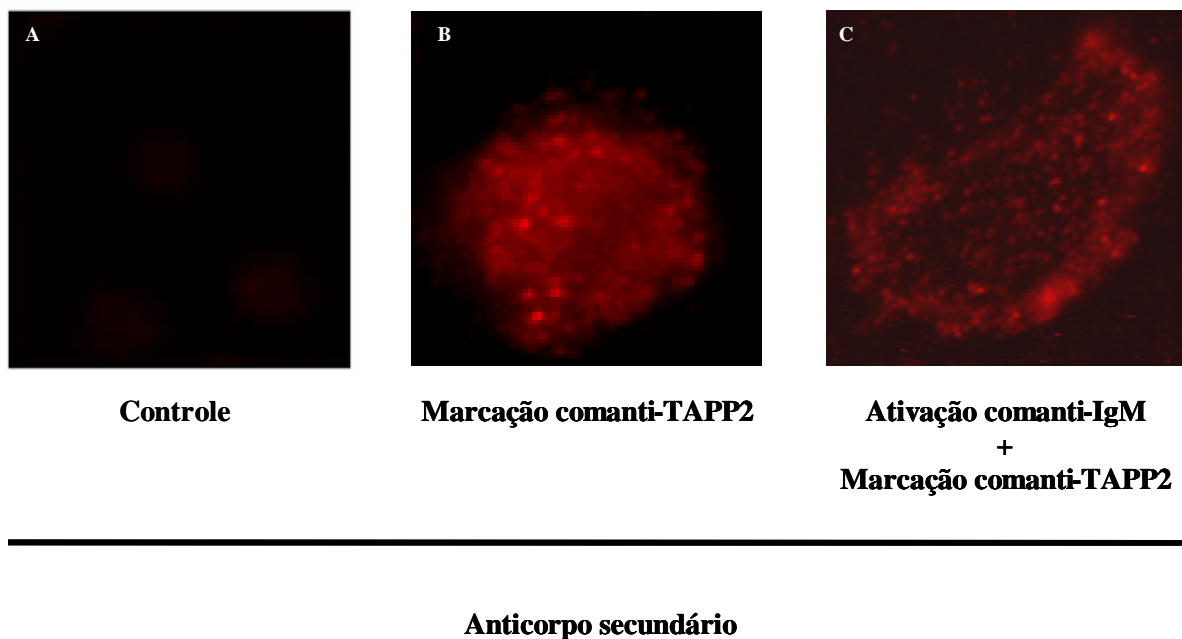


Figura 8. Recrutamento de TAPP2 para a membrana após co-agregação FcγRII/BCR. Células A20 (1×10^6 /ml) foram estimuladas com anticorpo IgG de cabra anti-IgM de camundongo ($2 \mu\text{g/ml}$) por 30 minutos. As lâminas contendo as células foram, então, fixadas e marcadas com anticorpo anti-TAPP2. A localização do anticorpo anti-TAPP2 foi visualizada pela marcação com anticorpo secundário (Ig de burro anti-Ig de coelho) marcado com Cy3. Os campos mostrados indicam a localização de TAPP2 em uma célula representativa no aumento de 40 vezes. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

PARTE II – Efeito imunomodulador da curcumina em células B ativadas

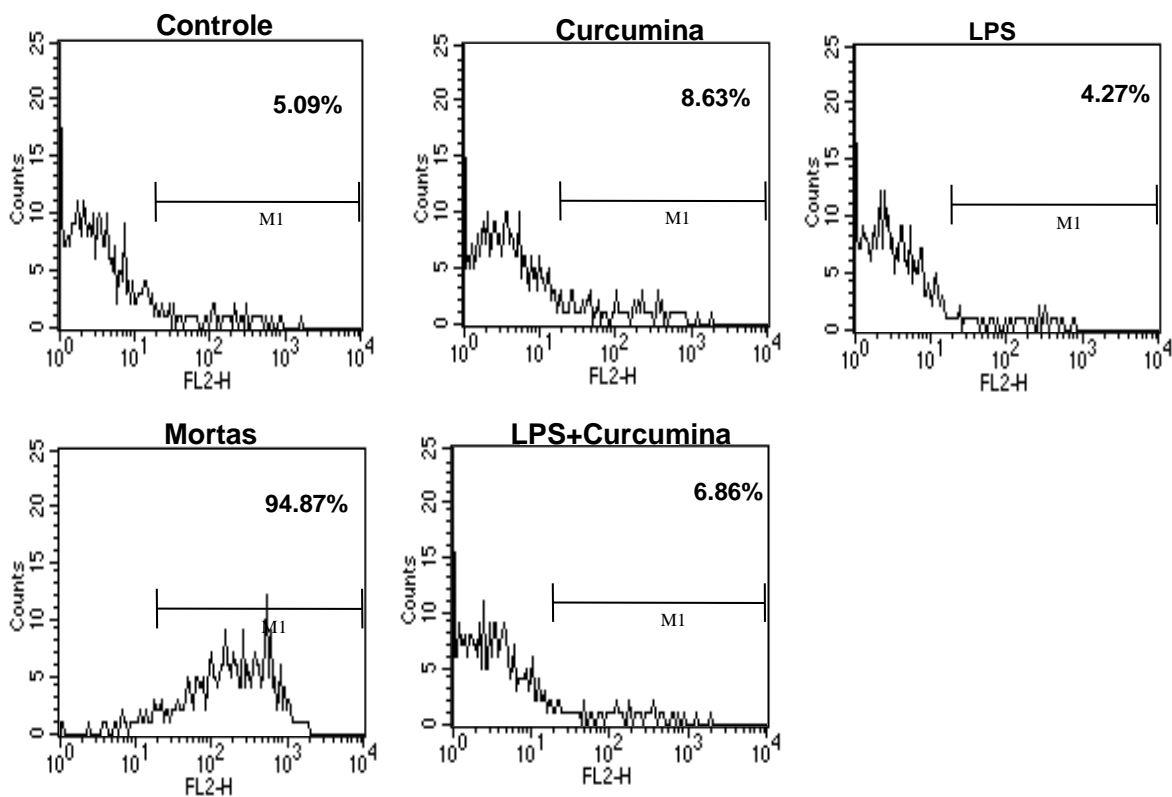


Figura 9. Avaliação da citotoxicidade da curcumina em de células B. Células B purificadas foram cultivadas (1×10^6 /ml) em meio, LPS ($10 \mu\text{g/ml}$), curcumina ($10 \mu\text{M}$) e LPS mais curcumina por 48 horas. Após este período as células foram marcadas com anticorpo anti-B220-FITC. No momento da leitura foram adicionados $3 \mu\text{l}$ de iodeto de propídio (na concentração final de $0,5 \mu\text{g/ml}$) e as células foram analisadas por citometria de fluxo. Para realização do controle de células mortas, as culturas foram fixadas em PBS com 1% de formol antes da adição do iodeto de propídio (Mortas). Os dados mostram o percentual de células marcadas com PI na população de células B220⁺ obtidas no gate de linfócitos. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

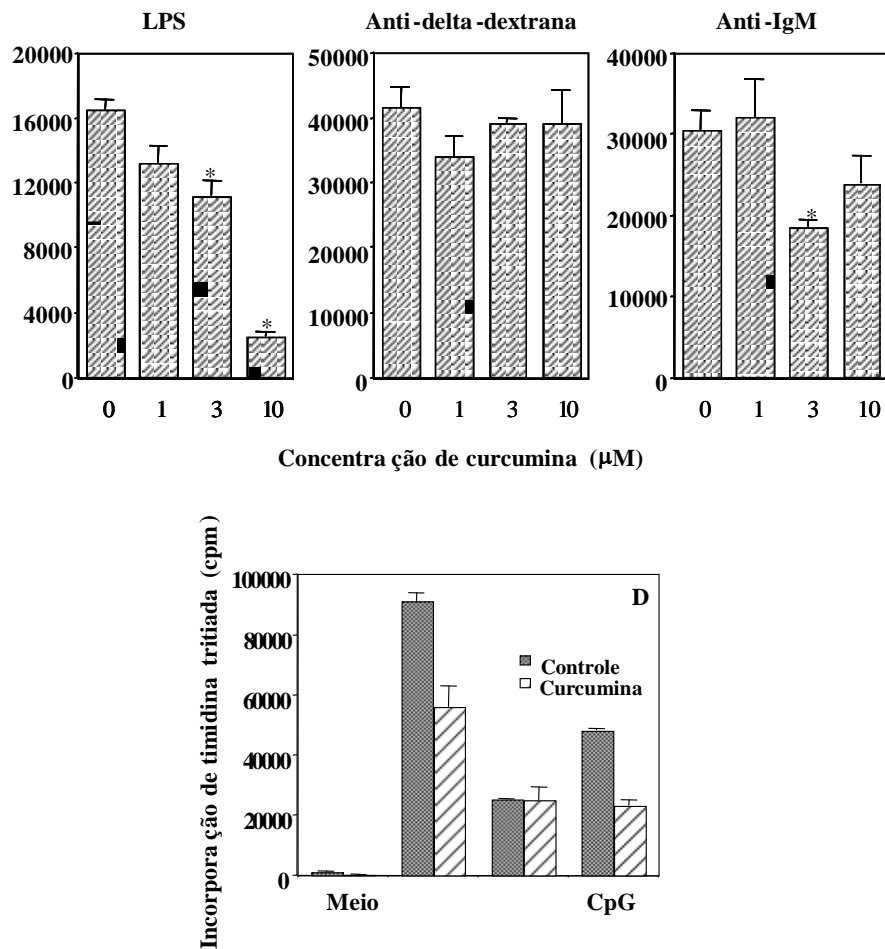


Figura 10. Efeito da curcumina na resposta proliferativa de células B estimuladas por ativadores policlonais. Células B purificadas foram cultivadas (2×10^5 em $200 \mu\text{l}$) por 72 horas na presença de (A) LPS ($10 \mu\text{g/ml}$), (B) anti-delta-dextrana (10 ng/ml) ou (C) Ig de cabra anti-IgM de camundongo ($10 \mu\text{g/ml}$) e (D) LPS, Pam₃Cys ($1 \mu\text{g/ml}$) e CpG ($1 \mu\text{g/ml}$). As culturas foram tratadas ou não com as doses indicadas de curcumina. A proliferação foi medida pela incorporação de timidina tritiada após 18 horas de cultura. Culturas controle não tratadas apresentaram a incorporação de 2679 com. Os dados são representativos de três experimentos em triplicatas \pm SD. A análise estatística foi feita utilizando teste t de Student para amostras não pareadas; $*p \leq 0,05$.

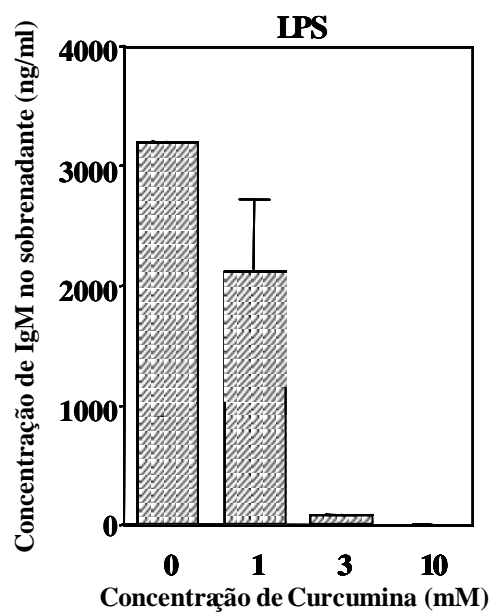


Figura 11. Efeito da curcumina na secreção de IgM por células B estimulas com LPS. Células B purificadas (5×10^4 por poço) foram estimuladas com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) na presença ou ausência das doses indicadas de curcumina por 7 dias. O sobrenadante das triplicatas foi reunido em pool para a medida dos níveis de imunoglobulinas M pelo método de ELISA. Média de três experimentos.

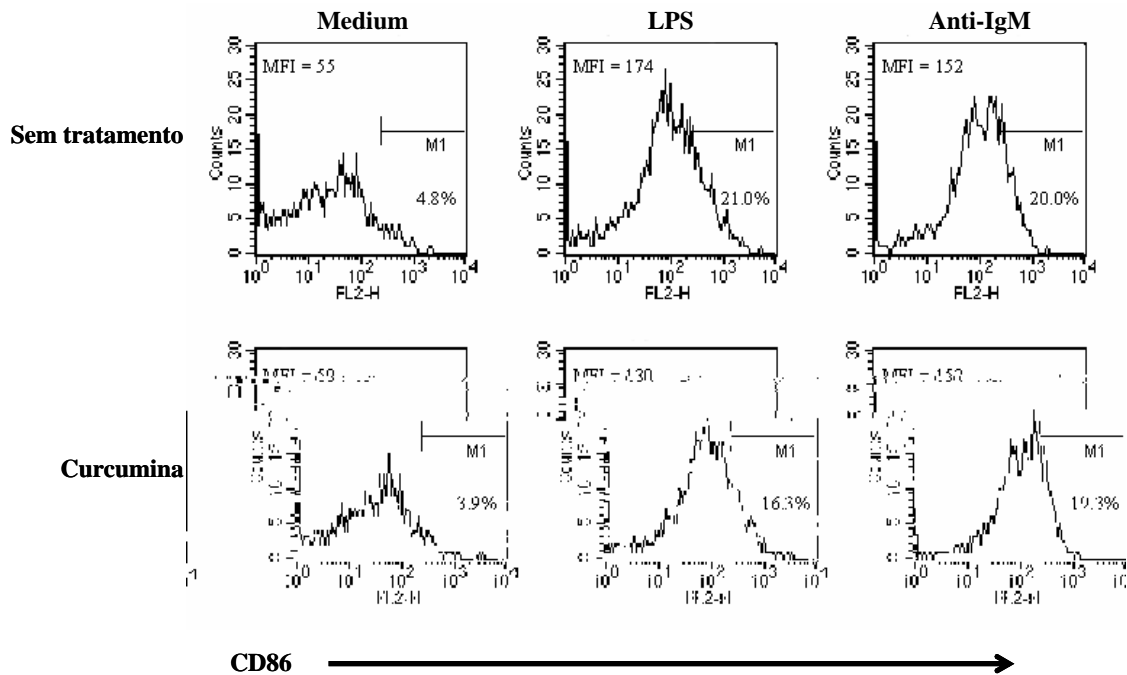


Figura 12. Efeito da curcumina na expressão de moléculas co-estimulatórias em células B estimuladas por LPS ou anti-IgM. Células B purificadas foram cultivadas (1×10^6 /ml) por 48 horas na presença de LPS (10 μ g/ml), anti-IgM (10 μ g/ml) e tratadas simultaneamente com curcumina (10 μ M). Após a incubação, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos anti-B220-FITC e anti-CD86-PE. As células foram analisadas por citometria de fluxo. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

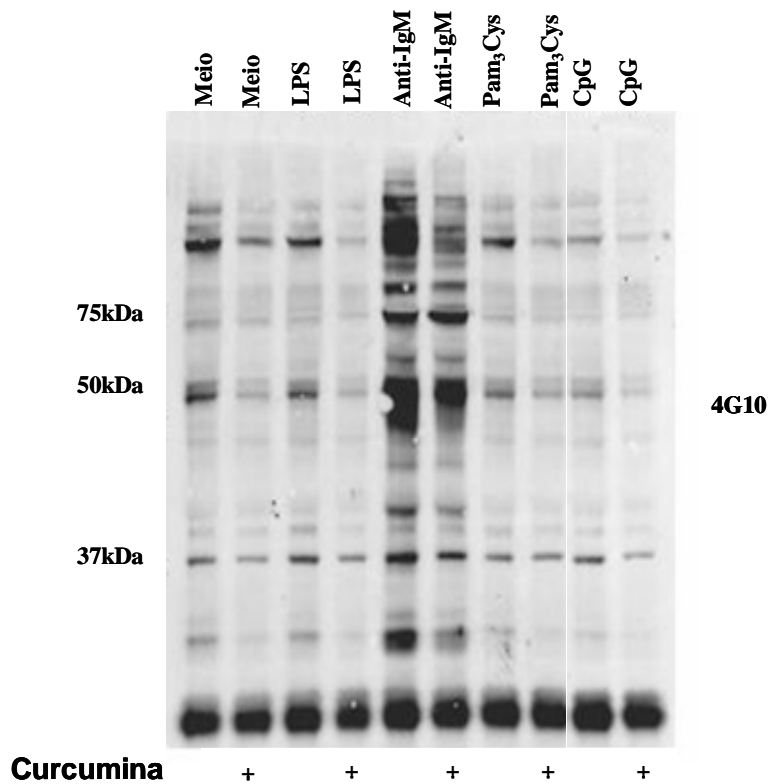


Figura 13. Efeito da curcumina no perfil de fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas totais de células B estimuladas com ligantes de receptores do tipo Toll e anticorpo anti-IgM. Células B purificadas (1×10^7 /ml) por 30 minutos na presença de LPS (10 μ g/ml), Pam₃cys (1 μ g/ml), oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG (1 μ g/ml) ou por 5 minutos com anticorpo de cabra anti-IgM de camundongo (6 μ g/ml), na presença ou não de curcumina (10 μ M). Em seguida lisados destas células foram avaliados por *western blotting* utilizando o anticorpo anti-fosfotirosina total (4G10). Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

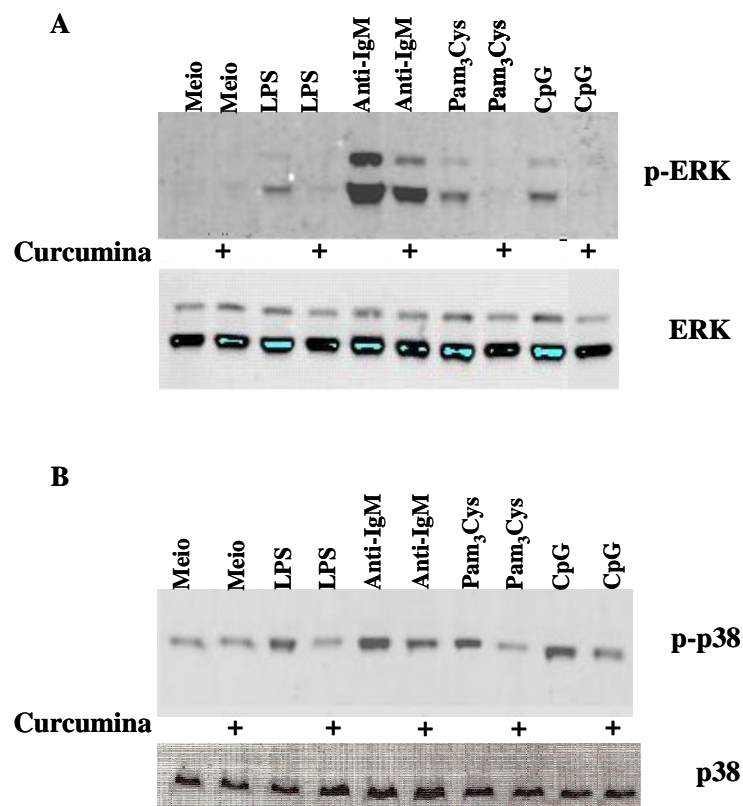


Figura 15. Efeito da curcumina na fosforilação de MAPKs em células B estimuladas com ligantes de receptores do tipo Toll e anticorpo anti-IgM. Células B purificadas (1×10^7 /ml) foram incubadas por 30 minutos na presença de LPS ($10 \mu\text{g/ml}$), Pam₃cys ($1 \mu\text{g/ml}$), oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG ($1 \mu\text{g/ml}$) ou por 5 minutos com anticorpo anti-IgM de camundongo ($6 \mu\text{g/ml}$), e curcumina (10 mM) foi adicionada simultaneamente a algumas culturas curcumina. Em seguida os lisados destas células foram analisados por *Western blotting* utilizando os anticorpos anti-pERK, anti-ERK, anti-p-p38 e anti-p38. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

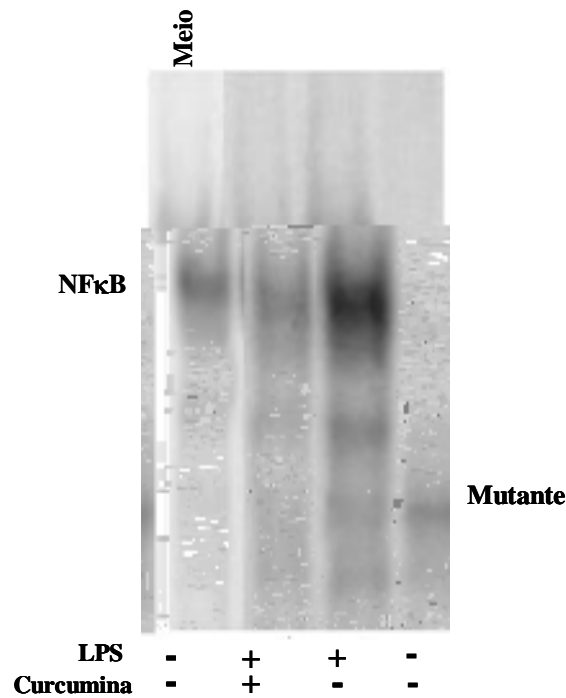


Figura 16. Efeito da curcumina na translocação do fator NFκB para o núcleo de células B estimuladas com LPS. Células B purificadas (1×10^7 /ml) foram estimuladas com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) por 24 horas na presença ou ausência de curcumina ($10 \mu\text{M}$). As células foram lisadas para a obtenção do extrato nuclear que foi analisado por EMSA (Electrophoretic mobility shift assay). Para isso, esse extrato foi incubado com 40.000 cpm de ^{32}P associado à seqüência dupla-fita consenso de oligonucleotídeo de NFκB. O complexo proteína-DNA foi separado das seqüências em gel de poliacrilamida nativa e foi visualizado por Phosphoimage analysis. Um oligonucleotídeo mutante foi utilizado para verificar a especificidade da ligação do DNA com o NFκB. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

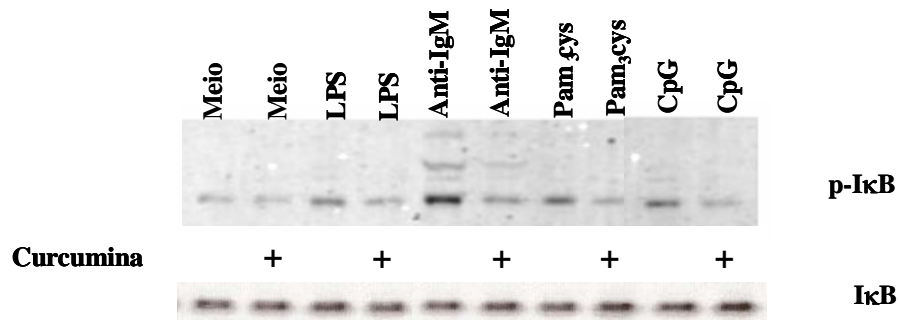


Figura 17. Efeito da curcumina na fosforilação de IκB em células B ativadas. Células B purificadas (1×10^7 /ml) foram incubadas por 30 minutos na presença de LPS (10 μ g/ml), Pam₃cys (1 μ g/ml), oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG (1 μ g/ml) ou por 5 minutos com anticorpo anti-IgM de camundongo (6 μ g/ml) e curcumina (10 mM) foi adicionada simultaneamente a algumas culturas. Em seguida os lisados destas células foram analisados por *Western blotting*, utilizando os anticorpos anti-p IκB e anti-IκB. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

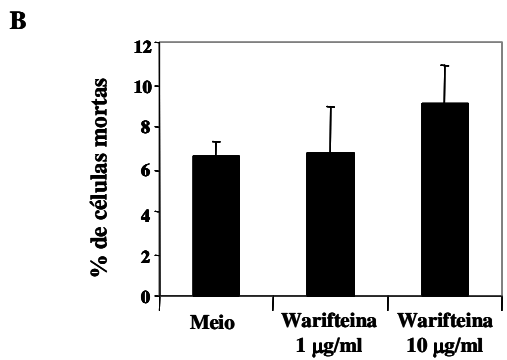
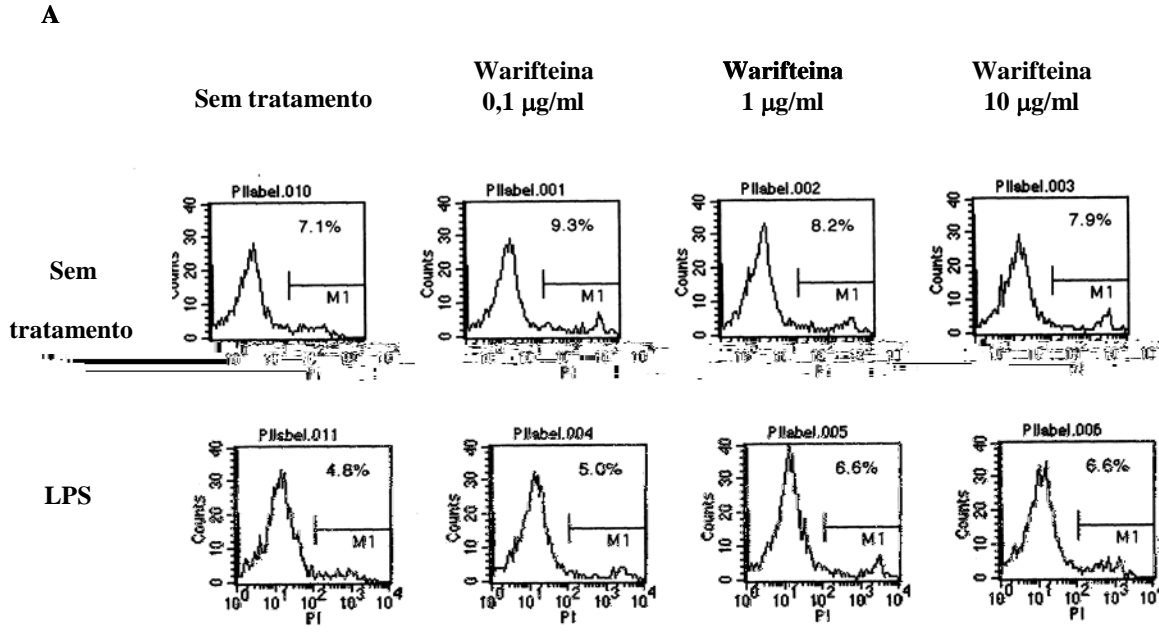


Figura 18. Avaliação da citotoxicidade da warifteina em células B. Células B purificadas foram cultivadas (1×10^6 /ml) em meio, LPS (10 µg/ml) e warifteina nas doses indicadas por 24 horas. Após esse período as células foram marcadas com anticorpo anti-B220-FITC. No momento da leitura foram adicionados 3 µl de iodeto de propídio (na concentração final de 0,5 µg/ml) e as células foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Histogramas representativos da porcentagem de células B220⁺ marcadas com iodeto de propídio. (B) Valores percentuais representativos do número de células mortas (região M1) obtidos após os tratamentos indicados. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes. Os grupos foram comparados através de teste estatístico t de Student não pareado e não foi observada diferença estatística significativa.

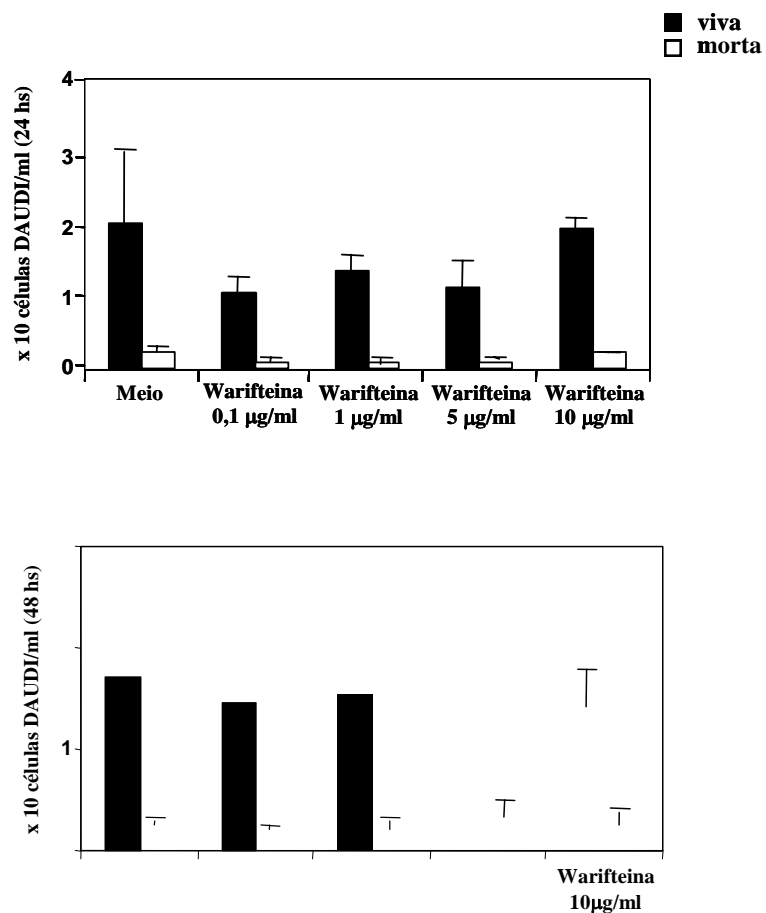


Figura 19. Avaliação da citotoxicidade da warifteina em células DAUDI. Culturas de células DAUDI (2×10^5 por poço) foram tratadas por (A) 24 horas ou (B) 48 horas com as doses indicadas de warifteina e as culturas controles (meio) não receberam warifteina. Após os períodos de tempos indicados a viabilidade celular foi determinada pela contagem do número de células utilizando microscópio óptico em culturas que receberam azul de Trypan. Os dados mostram o número de células mortas (que incorporaram azul de Trypan) e viáveis (não coradas). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Os grupos foram comparados pelo teste estatístico t de Student não pareado e não foi observada diferença estatística significativa.

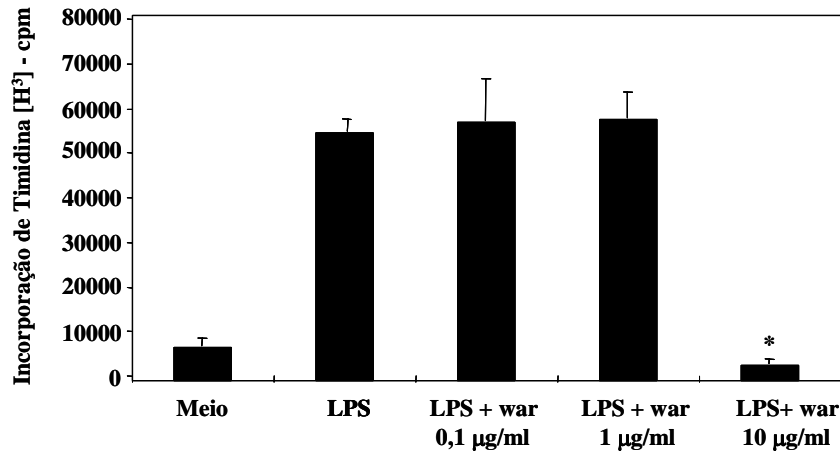


Figura 20. Efeito da warifteina na resposta proliferativa de células B estimuladas com LPS. Células B purificadas (2×10^5 poço) foram estimuladas ou não com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) e incubadas com warifteina (war) nas concentrações indicadas por 72 horas. A proliferação foi medida pela incorporação de timidina tritiada após 18 horas de cultura. Culturas controles não estimuladas apresentaram a incorporação de 1.212 cpm. Todas as culturas foram feitas em triplicatas e as barras mostram média \pm SD. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student para amostras não pareadas; $*p \leq 0,05$.

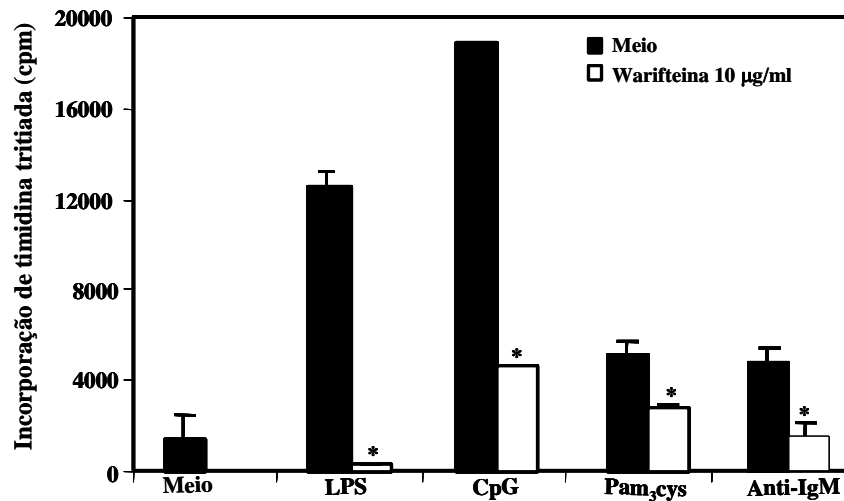


Figura 21. Efeito da warifteina na proliferação de células B estimuladas por ligantes de receptores do tipo Toll. Células B purificadas (2×10^5 por poço) foram estimuladas ou não com LPS (10 µg/ml), anticorpo anti-IgM de camundongo (10 µg/ml), Pam₃cys (1 µg/ml) e oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG (1 µg/ml) e tratadas ou não com warifteina (10 µg/ml) por 72 horas. A proliferação foi medida pela incorporação de timidina tritiada após pulso de 18 horas. Culturas controle não tratadas apresentaram a incorporação de 3446 cpm. Todas as culturas foram feitas em triplicatas e as barras mostram média \pm SD. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student; * $p \leq 0,05$.

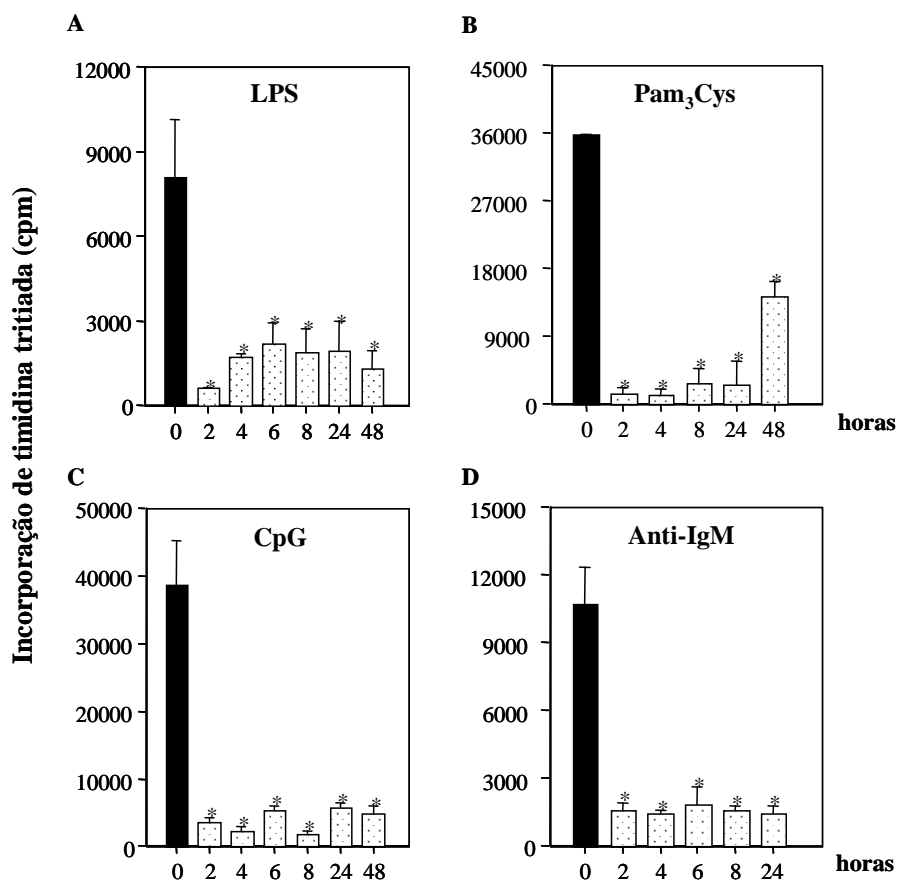


Figura 22. Cinética do efeito da warifteina na ativação de células B estimuladas por ativadores policlonais. Células B purificadas foram cultivadas (2×10^5 por poço) foram estimuladas ou não com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) (A), Pam₃cys ($1 \mu\text{g/ml}$) (B), oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG ($1 \mu\text{g/ml}$) (C) e anticorpo anti-IgM de camundongo ($10 \mu\text{g/ml}$) (D) e incubadas ou não com warifteina ($10 \mu\text{g/ml}$) por 72 horas. As culturas receberam ativador policlonal no tempo zero e warifteina nos tempos indicados. A proliferação foi medida pela incorporação de timidina tritiada adicionada nas últimas 18 horas. Todas as culturas foram feitas em triplicatas e os dados mostram media \pm SD. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes. A análise foi feita utilizando o teste t de Student; * $p \leq 0,05$.

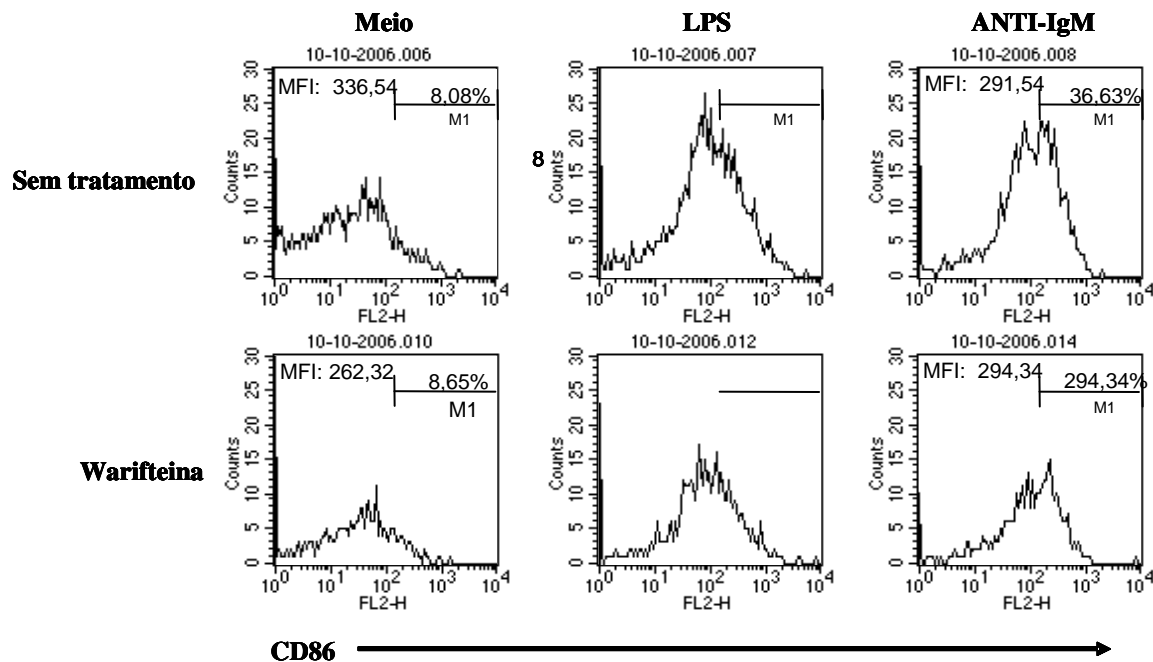


Figura 23. Efeito da warifteina na expressão de moléculas co-estimulatórias em células B estimuladas por LPS ou anti-IgM. Células B purificadas (1×10^6 /ml) foram cultivadas por 48 horas na presença de LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) ou anticorpo anti-IgM de camundongo ($10 \mu\text{g/ml}$) e tratadas simultaneamente com warifteina ($10 \mu\text{g/ml}$). Após a incubação, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos anti-B220-FITC e anti-CD86-PE. As células foram analisadas por citometria de fluxo. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

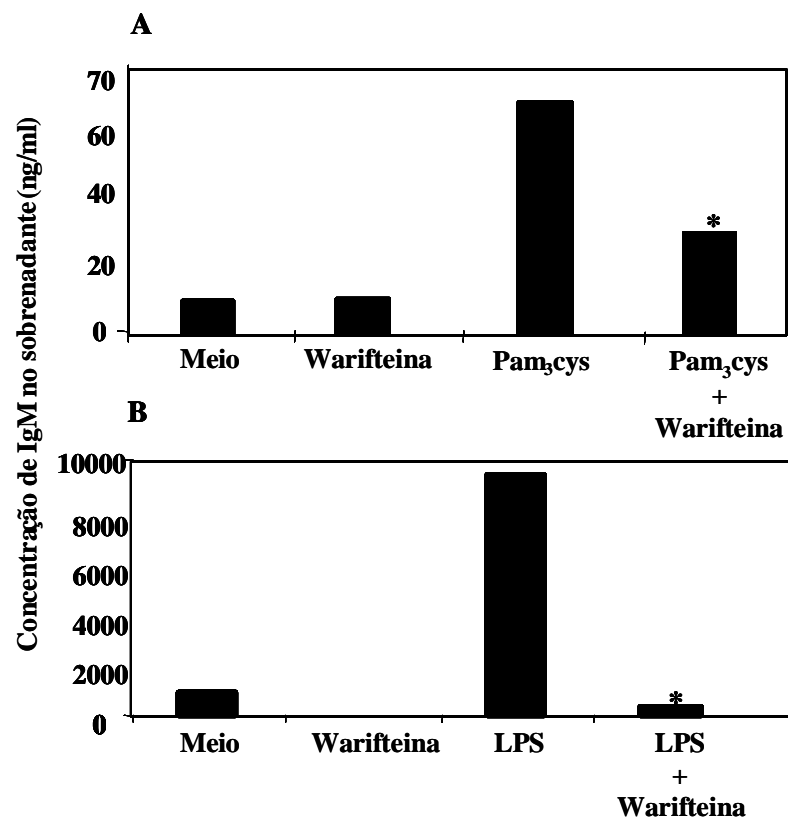


Figura 24. Efeito da warifteina na secreção de imunoglobulinas de células B estimuladas por ligantes de receptores do tipo Toll. Células B purificadas (5×10^4 por poço) foram estimuladas com Pam₃Cys (1 μ g/ml) (A) ou LPS (10 μ g/ml) (B) na presença ou ausência de warifteina (10 μ g/ml) por 7 dias. O sobrenadante das triplicatas foi reunido em *pool* para a medida dos níveis de imunoglobulinas M pelo método de ELISA. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

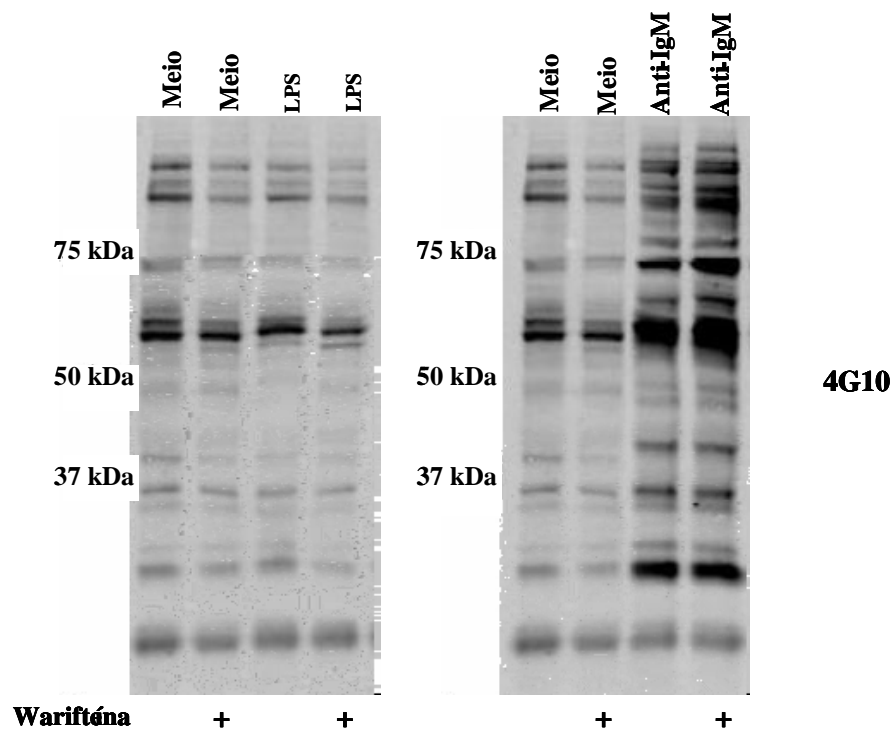


Figura 25. Efeito da warifetina no perfil de fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas totais de células B estimuladas com LPS ou anti-IgM. Células B purificadas (1×10^7 /ml) foram estimuladas por 30 minutos na presença de LPS (10 μ g/ml) ou por 5 minutos com anticorpo de cabra anti-IgM de camundongo (6 μ g/ml) na presença ou não de warifetina (10 μ g/ml). Em seguida lisados destas células foram analisados por *Western blotting* utilizando o anticorpo primário anti-fosfotirosina total (4G10). Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

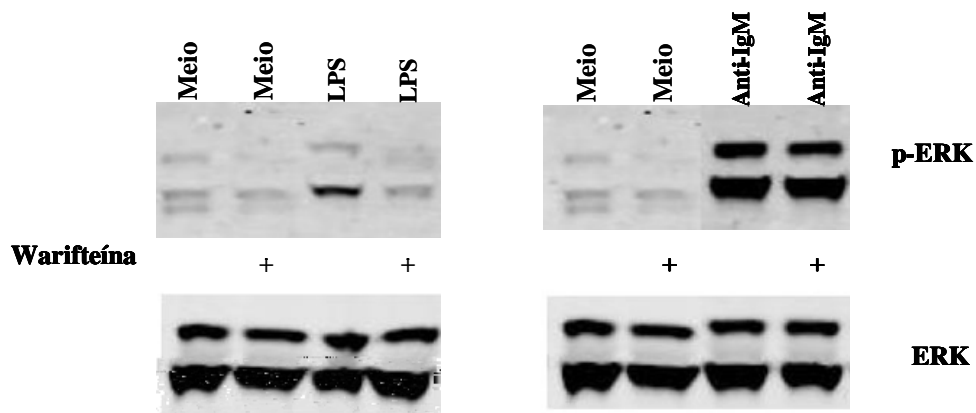


Figura 26. Efeito da warifteina na fosforilação de ERK em células B estimuladas por LPS ou anti-IgM. Células B purificadas (1×10^7 /ml) foram estimuladas por 30 minutos na presença de LPS (10 μ g/ml) ou por 5 minutos com anticorpo anti-IgM de camundongo (6 μ g/ml) na presença ou não de warifteina (10 μ g/ml). Em seguida os lisados destas células foram analisados por *Western blotting* utilizando os anticorpos primários: anti-pERK, anti-ERK. Um resultado representativo de três experimentos semelhantes.

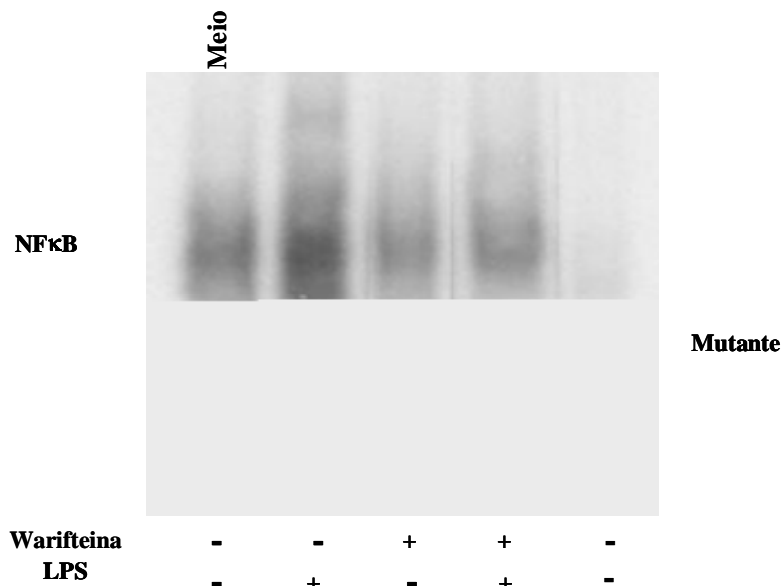


Figura 27. Efeito da warifteina na translocação de NFκB para o núcleo de células B estimuladas com LPS. Células B purificadas (1×10^7 /ml) foram estimuladas com de LPS (10 μg/ml) por 24 horas na presença ou não de warifteina (10 μg/ml). As células foram lisadas para a obtenção do extrato nuclear que foi analisado por EMSA. Para isso, esse extrato foi incubado com 40.000 cpm de ^{32}P associado à seqüência dupla-fita consenso de oligonucleotídeo de NFκB. O complexo proteína-DNA foi separado das seqüências livres através em gel de poliacrilamida nativa e, visualizado pelo Phosphoimage analysis. Um oligonucleotídeo mutante foi utilizado para verificar a especificidade da ligação do DNA com o NFκB. Um resultado representativo de dois experimentos semelhantes.

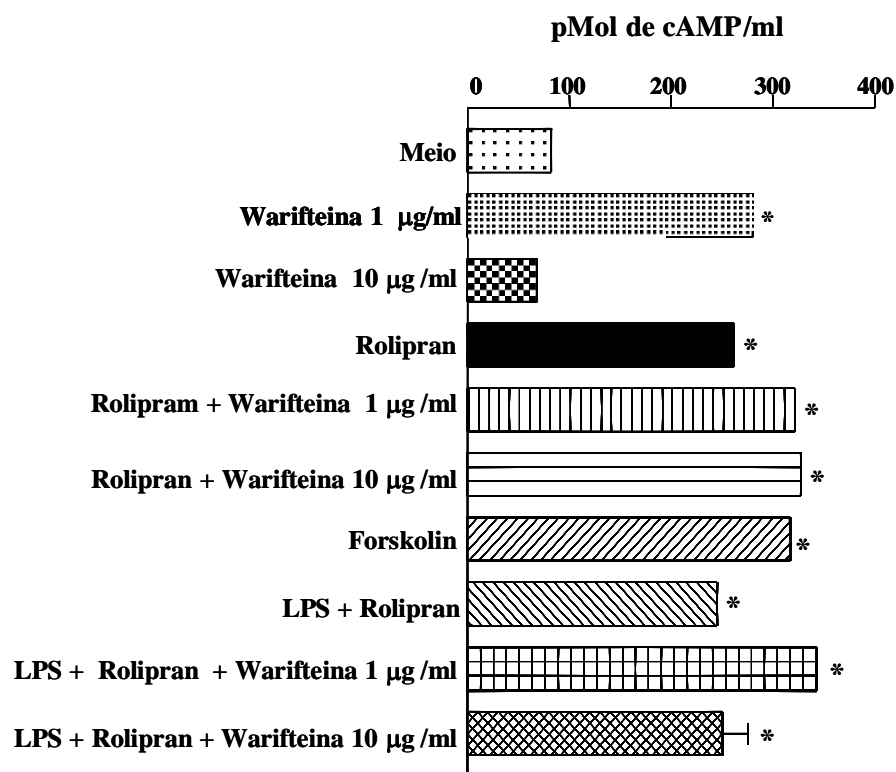


Figura 28. Análise dos níveis de cAMP em células B estimuladas com LPS e tratadas com warifteina. Células B purificadas (2×10^5 em 0.2 ml) foram cultivadas por 2 horas na presença de LPS (10 µg/ml), Rolipran (10 µM) ou Fosfokolin (10 µM). Algumas culturas foram tratadas com warifteina nas doses indicadas. Após o período de cultura, o nível de cAMP foi medido utilizando o kit cAMP Enzymeimmunoassay BiotrakTM (EIA) System (dual range) (Amersham Biosciences, UK). Os dados são a média de três experimentos semelhantes \pm SD analisados pelo teste t de Student; * $p \leq 0,05$.

6 – DISCUSSÃO

PARTE I – Envolvimento de TAPP2 na modulação da ativação de células B

A proteína TAPP2 foi descrita recentemente por dois grupos (Dowler *et al.*, 2000 e Marshall *et al.*, 2002). Sua caracterização foi feita a partir de seqüência de aminoácidos e homologia com a proteína adaptadora de peso molecular 32 kDa (Bam 32) (Marshall *et al.*, 2002) em estudos que procuravam identificar proteínas com domínios PH (Dowler *et al.*, 2000). TAPP é uma proteína adaptadora bastante conservada em diferentes espécies e expressa em diferentes populações celulares, inclusive em células de tecidos linfóides. Sua porção C terminal possui um domínio PH (domínio que se liga a PI(3,4)P₂, que é o produto da hidrólise de PI(3,4,5)P₃ a partir da ação da fosfatase SHIP) (Allam & Marshall, 2005). Já foi relatado que em células B humanas com expressão aumentada de TAPP2, esta proteína pode ser recrutada para a membrana após a co-agregação FcγRII/BCR, induzida pela estimulação com anticorpo anti-IgM (Marshall *et al.*, 2002). Nessas células com TAPP2 aumentada a estimulação produz uma mobilização de cálcio intracelular lenta e mais prolongada quando comparado com células controle não estimuladas. Outro fato importante é que o recrutamento de TAPP2 ocorre de forma dependente da via da PI3K, visto que esse recrutamento é abolido quando inibidores da via da PI3K são utilizados (Marshall *et al.*, 2002). Pouco se sabe, no entanto, sobre as funções biológicas dessa proteína adaptadora em células B. A maioria dos estudos que tentaram mostrar alguma função biológica de TAPP2 foi realizada em modelos com expressão aumentada dessa proteína. Por esse motivo, nos propusemos neste trabalho a produzir um anticorpo que fosse útil na análise do envolvimento dessa proteína na cascata de fosforilação desencadeada pela ativação em células B.

A parte inicial do nosso trabalho foi dedicada à produção do anticorpo anti-TAPP2. Dessa maneira, bactérias *E. coli* foram transformadas para que passassem a expressar a proteína TAPP2 e testadas pela técnica de PCR quanto a eficiência da transformação (Figura 1), em seguida a colônia selecionada foi crescida em larga escala e a proteína TAPP2 foi purificada. Essa proteína foi, então, utilizada para a imunização de coelhos. Após três meses foram retiradas amostras de sangue para a purificação do anticorpo anti-

TAPP2. Os anticorpos foram purificados e avaliados pela técnica de *western blotting*. Observamos que este anticorpo reconhece uma única banda de aproximadamente 50 kDa em lisados celulares totais (Figura 2a), o que está correlacionado com o peso molecular de TAPP2 previamente descrito (Kimber *et al.*, 2003). Avaliamos também a utilização desse anticorpo em imunoprecipitados e observamos que o anticorpo anti-TAPP2 ligado a esferas de sefarose reconhece uma proteína com peso molecular de aproximadamente 50 kDa retirada de lisados de células A20 estimuladas (Figura 2b). Um fato importante foi que em nenhum dos testes houve ligação inespecífica do anticorpo anti-TAPP2 (Figura 2a,b). Imunoprecipitados utilizando anticorpo anti-TAPP2 ligados a esferas de sefarose retiraram a maior parte de TAPP2 existentes em lisados de células A20 estimuladas com anti-IgM (Figura 3). Para uma comprovação adicional de que o anticorpo produzido retirava dos lisados celulares apenas TAPP2, realizamos experimentos onde os imunoprecipitados foram eluídos para retirada da proteína TAPP2 obtida dos lisados celulares. Análise desse material em coloração direta por Sypro Ruby em gel nos revelou que nossos complexos retiravam dos lisados uma única proteína de aproximadamente 50 kDa (Figura 4).

De posse do anticorpo anti-TAPP2 que se mostrava eficiente para o reconhecimento da proteína TAPP2 em lisados celulares e imunoprecipitados, iniciamos uma investigação do potencial de fosforilação dessa proteína. A estimulação de células B pela ocupação do BCR leva a uma cascata de fosforilação de diversas proteínas (Nimmerjahn & Racetch, 2007). A proteína TAPP2 já foi sequenciada (*Gene Bank* código de acesso para a seqüência de TAPP2 humana é BU429648 e para a seqüência de TAPP2 murina é Q9ERS5) e foi demonstrada a presença de três resíduos (Ser-Asp-Val) que são correspondentes a resíduos existentes em domínios PDZ, sugerindo uma possível interação com alvos comuns como proteínas de citoesqueleto e *scaffolding protein* (Allan & Marshall, 2005). Apesar de nenhum relato da literatura ter demonstrado ainda a capacidade fosforilativa de TAPP2, e por esse ser um evento possível na interação entre proteínas adaptadoras, fomos avaliar essa possibilidade. Nossos resultados mostraram pela primeira vez, que as proteínas TAPP2 são fosforiladas quando ocorre estimulação com co-agregação Fc γ RII/BCR (Figura 5b).

A molécula TAPP2 liga através de seu domínio PH o produto gerado pela ação da lipídio fosfatase SHIP, o PI(3,4)P₂ (Allan & Marshall, 2005). Assim, seria importante caracterizar o papel fisiológico de TAPP2 em animais deficientes na molécula SHIP. Não

há nenhuma evidência direta de que o nível de PI(3,4)P₂ esteja reduzido nesses animais. No entanto, é possível que haja diminuição nos níveis desta molécula, já que na ausência de SHIP pode ocorrer uma diminuição da hidrólise de PI(3,4,5)P₃ em PI(3,4)P₂ (Brauweiler *et al.*, 2000b). Nossos resultados mostraram que a fosforilação de TAPP2 está significativamente reduzida em animais deficientes de SHIP (Figura 6), sugerindo de forma indireta uma possível relação entre a presença de SHIP e a geração de seu produto PI(3,4)P₂. O mecanismo desta diminuição de fosforilação de TAPP2 na ausência de SHIP não foi por nós caracterizado, mas é possível que a localização de TAPP2 na membrana seja essencial para que esta proteína venha a ser fosforilada por proteínas tirosina quinases ou, ainda que a ligação a PI(3,4)P₂ modifique a conformação de TAPP2 de forma que ela passe a ser susceptível a fosforilação. Podemos sugerir ainda, que o fato de TAPP2 ser fosforilada após co-agregação do FcγRII/BCR e que esta fosforilação é dependente de SHIP, indica que esta proteína participa na via de sinalização induzida por esta fosfatase. Foi sugerido que o aumento de PI(3,4)P₂ poderia estar relacionado a desativação da via da PI3K, já que o precursor deste fosfolípido, o PI(3,4,5)P₃ produto da PIK, é essencial para a ligação da Tec quinase BTK à membrana (Kimber *et al.*, 2003; Freebun *et al.*, 2002). Nosso achado de que TAPP2 liga ao produto da quebra de PIP₃ feita por SHIP sugere que uma nova via de sinalização é induzida pela quebra do produto gerado por PI3K, o que indica que a geração PI(3,4,5)P₃ por PI3K pode levar a indução de, pelo menos, duas vias de sinalização diferentes.

A importância da via da PI3K na ativação e diferenciação de células B está bem caracterizada. Vários estudos sobre os efeitos de inibidores da PI3K mostraram que esta via está relacionada à produção de imunoglobulinas induzida pela ligação do CD40 ao seu ligante em células B humanas (Aagaard-Tillery & Jelink, 1996) e proliferação de induzida por LPS em células B murinas (Venkataraman *et al.*, 1999). Células B humanas tratadas com wortmanina, um inibidor clássico da PI3K, apresentaram diminuição da resposta proliferativa induzida por anti-IgM e indução de apoptose, sugerindo que esta via de sinalização envolve componentes de fundamental importância para a sobrevivência e resposta a mitógenos via BCR. É possível sugerir que a participação de TAPP2 consumindo PI(3,4)P₂ pode contribuir para a regulação da ativação da via da PI3K.

Investigamos neste trabalho a fosforilação de TAPP2 em outro modelo murino, os camundongos ARS. Nesses animais são geradas células anérgicas pelo fato de possuírem imunoglobulinas específicas para o hapteno azofenil-arsonato e que reagem por reação cruzada com fitas simples de DNA desses animais, mantendo as células B em estado de anergia. As células B desses animais apresentam naturalmente uma mobilização de cálcio intracelular elevada, que é uma das características de células anérgicas (Cambier *et al.*, 2007). Estudos prévios já haviam demonstrado que em células com expressão aumentada de TAPP2 a mobilização de cálcio era duradoura (Marshall *et al.*, 2002). Baseados nos dados que indicam aumento dos níveis de cálcio tanto em células B anérgicas quanto em células B com expressão aumentada de TAPP2, investigamos no modelo ARS o estado de ativação da proteína TAPP2. Observamos que, em células B de animais ARS ocorre uma fosforilação aumentada de TAPP2 (Figura 7). Esses resultados sugerem um possível envolvimento de TAPP2 nos níveis aumentados de cálcio nas células desses animais, o que sugere tanto que o aumento desta proteína estaria envolvido em estados de anergia quanto que a mesma pode ter um papel importante na regulação dos níveis intracelulares de cálcio.

Os dados obtidos com a utilização do anticorpo anti-TAPP2 (Figura 8) confirmam relatos anteriores feitos em células com expressão aumentada de TAPP2, que mostraram que a co-agregação FcγRII/BCR leva ao recrutamento de TAPP2 para a membrana (Marshall *et al.*, 2002). Demonstramos aqui, em células com níveis normais de TAPP2, que esse fenômeno se repete.

Nossos resultados tomados em conjunto indicam que TAPP2 é recrutada para a membrana de células onde há a co-agregação de FcγRII/BCR, provavelmente para ligar-se a PI(3,4)P₂. Demonstramos pela primeira vez que a proteína TAPP2 é fosforilada quando as células B são estimuladas pela co-agregação de FcγRII/BCR. Em células de animais deficientes de SHIP a fosforilação de TAPP2 está diminuída possivelmente pela falta ou diminuição de PI(3,4)P₂ nesse sistema. Em células de animais ARS o aumento da fosforilação de TAPP2 pode ter alguma relação com a manutenção dos elevados níveis de cálcio. Desse modo, com base nesses dados, podemos sugerir que a proteína TAPP2 estaria envolvida com regulação da ativação de células B. O papel exato da proteína TAPP2 na ativação de células B dependerá de estudos futuros com o objetivo de caracterizar sua

função biológica e as proteínas e/ou componentes celulares que funcionam como alvo ou se ligam a esta proteína após sua ativação.

PARTE II – Estudo dos efeitos imunomoduladores da curcumina em células B

A curcumina é um diferuloilmetano e é o principal composto retirado das raízes da *Curcuma longa* (Aggarwal *et al.*, 2003). A utilização da curcumina como fitoterápico esta baseada no seu efeito terapêutico em doenças com características inflamatórias agudas ou crônicas. A curcumina induz diminuição da produção de uma série de fatores pró-inflamatórios em uma variedade de células que participam desse processo (Jagetia & Aggarwal 2007).

Outro campo de estudos dos efeitos da curcumina tem sido o tratamento do câncer. Já foi descrito que esta substância inibe o crescimento de células tumorais, pela indução de apoptose e bloqueio da fosforilação de proteínas envolvidas na sobrevivência celular (Han *et al.*, 1999 e Guarurajan *et al.*, 2007).

A curcumina parece ter como alvo várias moléculas intracelulares levando ao bloqueio ou diminuição da atividade de várias vias de sinalização. Por exemplo, o fator nuclear NFκB, tem sua translocação para o núcleo bloqueada após o tratamento com curcumina em diferentes modelos (Bengmark, 2006).

A maioria dos estudos feitos com o objetivo de avaliar os efeitos da curcumina em células linfóides foi realizada em células T. Esses estudos sugerem que a curcumina atua modulando a ativação e proliferação dessas células induzida por diferentes ativadores (Rajan *et al.*, 2004). Em relação às células B, pouco se sabe sobre os efeitos da curcumina em células primárias, já que a grande maioria dos estudos foram feitos utilizando células tumorais. Foi observado que a curcumina inibe o crescimento celular pelo bloqueio de algumas moléculas alvo como erg-1, c-myc, bcl-XL, gene supressor de tumor *p53*, NFκB e Syk (Han *et al.*, 1999 e Guarurajan *et al.*, 2007).

Neste trabalho, investigamos o efeito da curcumina sobre células B normais. Na primeira etapa do nosso trabalho avaliamos se a curcumina apresentaria algum efeito na viabilidade de células B purificadas de camundongos BALB/c, ativadas ou não pelo LPS e

anti-IgM. Nossos resultados (Figura 9) mostraram que a curcumina não apresentou efeito citotóxico sobre células normais ou ativadas com LPS ou anti-IgM, ativadores policlonais clássicos de células B. Este achado está de acordo com dados da literatura que mostram que a curcumina, usada em diferentes tipos celulares, não afeta a viabilidade celular (Wang *et al.*, 1997). Além disso, trabalhos anteriores já haviam mostrado que a concentração utilizada por nós de curcumina não exerce efeito tóxico em linfócitos T murinos (Natarajan & Bright, 2002).

A proliferação é um dos eventos iniciais do processo de ativação de células B e envolve inúmeras moléculas e diferentes vias de sinalização. Nossa análise da proliferação de células B induzidas por ativadores policlonais e tratadas com diferentes doses de curcumina (Figura 10), mostraram um efeito inibitório da proliferação induzida especialmente por LPS na dose de 10 μ M. Já as culturas estimuladas com anti-IgM apresentaram discreta diminuição e nas ativadas com anti-delta-dextrana nenhuma alteração da resposta proliferativa foi observada. Esses dados sugerem que esses ativadores que ligam à Ig de superfície levam ao engajamento de vias de ativação distintas das induzidas por LPS e que são refratárias à ação da curcumina. A ativação via Ig de superfície, assim como a resposta ativada por LPS, é capaz de induzir a migração do NF κ B para o núcleo (Sen, 2006 e Kawai & Akira, 2007). Entretanto o perfil de resposta é diferente, e já foi relatado que essas respostas possuem sensibilidade diferente a ação de drogas capazes de interferir na via de ativação da PI3K (Bone & Williams, 2001). Estudos anteriores

c

t

Apesar da curcumina ter um efeito inibitório marcante na proliferação e secreção de imunoglobulinas em células estimuladas por LPS (Figuras 10 e 11), não interfere na expressão da molécula co-estimulatória CD86 (Figura 12). A expressão dessa molécula é um evento precoce durante a ativação e pode ser observada 24 horas após a estimulação com LPS (Galdiero *et al.*, 2003). Nossos achados que mostram que a curcumina não inibe a expressão de CD86 induzida pelo LPS sugerem que a combinação de sinais que levam a proliferação e secreção de imunoglobulinas envolve moléculas diferentes das que induzem expressão de CD86 e que estas últimas não seriam alvos da curcumina.

Após a ligação do antígeno ao BCR, ocorre a indução de sinalização intracelular. Um dos eventos iniciais é a fosforilação de seqüências ITAM localizadas nas moléculas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ pelas quinases da família Src. Em seguida ocorre o recrutamento e ativação da proteína tirosina quinase Syk. Esta quinase leva a ativação de inúmeras outras moléculas envolvidas na transdução de sinais intracelulares (Latour & Veillette, 2001).

Após caracterizarmos que a curcumina inibia a resposta induzida pelo LPS, iniciamos uma avaliação de vias de sinalização que seriam afetadas pela ação da curcumina. A fosforilação de diversas proteínas é um evento indispensável para a ativação celular. Assim, avaliamos se a fosforilação total de proteínas poderia ser afetada pelo tratamento com curcumina. Células B estimuladas com anti-IgM não apresentaram diminuição da fosforilação de proteínas com resíduos de tirosinas após tratamento com curcumina (Figura 13). Estudos anteriores mostraram que em células de linfoma a curcumina induz uma redução da fosforilação da proteína tirosina quinase Syk (Gururajan *et al.*, 2007). Entretanto, nossos resultados sugerem que em células primárias esse efeito não se repete.

Nós observamos que o perfil de fosforilação sofreu uma discreta diminuição em células estimuladas com LPS ou outros ligantes de receptores do tipo Toll (Figura 13). Assim, passamos a investigar especificamente o nível de fosforilação em proteínas importantes para a ativação. Analisamos inicialmente a fosforilação de MAPK e verificamos uma significativa redução de fosforilação em células estimuladas com ligantes de Toll e tratadas com curcumina (Figura 15). As MAPK ERK e p-38 se mostraram bastante sensíveis à ação da curcumina. Nossos resultados sugerem que as MAPK ERK e P-38 sejam também possíveis alvos da curcumina.

Uma molécula que possui um envolvimento clássico com a ativação via TLR4 (molécula alvo de ligação do LPS) e o fator nuclear NFκB, que sofre translocação para o núcleo após ativação (Mitchell *et al.*, 2007). Nossos resultados confirmaram esse envolvimento mostrando que a estimulação com LPS leva a translocação desse fator e que nas células tratadas com curcumina a translocação deste fator nuclear estava bloqueada (Figura 16). Observamos, ainda, que a fosforilação do IκB estava diminuída (Figura 17). A translocação do NFκB para núcleo é posterior a fosforilação da molécula inibitória IκB. Esta proteína, após ser fosforilada, é degradada, possibilitando a migração do NFκB para o núcleo. Nossa análise da fosforilação de IκB em células estimuladas por diferentes ligantes de receptores do tipo Toll (Figura 17) revelou que a curcumina inibe a fosforilação dessa molécula impedindo, assim, a translocação do NFκB para o núcleo. Nossos dados sugerem que a molécula IκB seja um dos alvos da curcumina em células B ativadas por ligantes de Toll.

Estudos recentes sugerem que a sinalização via receptores do tipo Toll pode mediar a ativação de células B autoimunes presentes no repertório normal (Toubi & Shoenfeld, 2004). Foi sugerido, também, que estímulos inatos induzidos por ligantes de receptores do tipo Toll seriam essenciais para a indução da resposta mediada pelo BCR em células não ativadas (Ruprecht & Lanzavecchia, 2006). Esse efeito de ligação ao TLR pode estar relacionado a indução de vias alternativas de sinalização em células B co-estimuladas por imunoglobulinas de superfície ligadas a LPS (Dye *et al.*, 2007). Já foi mostrado que uma doença semelhante ao lupus pode ser induzida em animais que apresentam expressão aumentada de BAFF quando estimulados via TLR (Groom *et al.*, 2007). Com base nos efeitos seletivos da curcumina em células B ativadas por ligantes de receptores do tipo Toll (mostrados nesse trabalho), sugerimos que a curcumina possa exercer uma ação moduladora na ativação de células B autoimunes. Relatos anteriores mostraram que o tratamento de camundongos com encefalomielite experimental com curcumina leva a diminuição dos sintomas e da severidade da doença (Natarajan & Bright, 2002). Finalmente nossos dados sobre os efeitos da curcumina em células B ativadas por ligantes de receptores do tipo Toll abre a possibilidade do uso dessa substância no tratamento de doenças autoimunes onde ocorra uma ativação anormal de células B.

Parte III – Caracterização dos efeitos imunomoduladores da warifteina em células B

A *Cissampelos sympodialis* é uma planta encontrada no nordeste e sudeste do Brasil, onde a infusão preparada com suas folhas e raízes é popularmente utilizada no tratamento de doenças inflamatórias e asma (Barbosa-Filho *et al.*, 1997). A análise fitoquímica dessa planta levou ao isolamento de diversos alcalóides (Lira *et al.*, 2002), dentre eles a warifteina. A warifteina é o composto encontrado em maior quantidade na infusão da *Cissampelos sympodialis* (Agra & Thomas, 1997). Estudos realizados com hepatócitos e fibroblastos V79 demonstraram que o IC₅₀ varia entre 10 µM a 35 µM, que convertido para microgramas por mililitro equivaleria a 52,4 µg/ml a 180 µg/ml. Com base nesses estudos, estabelecemos como maior dose utilizada em nossos experimentos 10 µg/ml, para que nossas doses não produzissem toxicidade nas células utilizadas. Para confirmar que a warifteina não teria efeito tóxico em nosso sistema, nossa primeira abordagem foi a avaliação da viabilidade celular após o tratamento com warifteina. Observamos a ausência de efeito tóxico em células B purificadas de camundongos (Figura 18) ou na linhagem humana DAUDI (Figura 19).

Em seguida iniciamos estudos a fim de avaliar os efeitos da warifteina em células B ativadas. Inicialmente avaliamos o efeito da warifteina na resposta proliferativa de células B induzida por ativadores policlonais. Uma significativa redução da resposta proliferativa foi observada em células estimuladas por LPS (Figura 20), oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG, Pam₃cys e anti-IgM (Figura 21). Nossos resultados sugerem que a warifteina atua inibindo a proliferação induzida por ligantes de receptores do tipo Toll e pela ligação ao BCR.

A inibição da resposta proliferativa produzida pela warifteina foi observada também em momentos tardios de cultura (após 48 horas), sugerindo sua atuação também em etapas tardias da ativação celular (Figura 22).

A secreção de imunoglobulinas é um evento dependente de diversas etapas anteriores, entre elas a proliferação (Borguesi & Milcarek, 2006). Por esse motivo, avaliamos se a secreção de imunoglobulinas também poderia estar sendo afetada pelo tratamento com warifteina. Constatamos que a warifteina, além de bloquear a proliferação,

inibiu a secreção de imunoglobulinas em células ativadas por Pam₃cys (Figura 24a) ou LPS (Figura 24b).

Apesar da warifteina ter efeito inibitório na proliferação e secreção de imunoglobulinas, não houve alteração em todas as etapas de ativação, visto que a expressão de moléculas co-estimulatórias CD86 não foi afetada pelo tratamento com warifteina (Figura 23).

Avaliamos, adicionalmente, qual seria o possível mecanismo de ação da warifteina nesse sistema de ativação de células B induzida por ativadores policlonais. Inicialmente avaliamos o efeito da warifteina na fosforilação total de proteínas em células ativadas por LPS ou anti-IgM. Nenhuma alteração foi observada (Figura 25). Entretanto, quando avaliamos a fosforilação da MAPK ERK observamos uma inibição da fosforilação dessa proteína em células ativadas por LPS, o que não ocorreu em células ativadas por anti-IgM (Figura 26). Avaliamos, também, se a warifteina teria algum efeito na translocação do fator nuclear NFκB. Este fator é uma molécula envolvida na sinalização via receptores do tipo Toll. Observamos que nas culturas tratadas com warifteina a translocação do NFκB foi bloqueada (figura 27).

A ação moduladora do cAMP tem sido descrita em diferentes tipos celulares, incluindo células B (Whisler *et al.*, 1992; Apasov & Sitkovsky, 1999). Entretanto, apenas alguns mecanismos moleculares que envolvem o acúmulo intracelular de cAMP foram descritos (Miguet *et al.*, 2005). Um trabalho anterior realizado pelo nosso grupo já havia demonstrado um aumento na concentração de cAMP em células B tratadas com o extrato de *Cissampelos sympodialis* (Alexandre-Moreira *et al.*, 2003). Para demonstrar se o efeito inibitório da warifteina estaria relacionado ao aumento de cAMP, avaliamos a concentração dessa molécula em culturas de células B estimuladas por LPS e tratadas com warifteina. Como controle utilizamos as drogas Forskolin (ativador da adenilato ciclase) e Rolipran (inibidor de fosfodiesterases), que levam ao aumento dos níveis intracelulares de cAMP. Nossos resultados mostraram que os níveis de cAMP estavam aumentados em culturas tratadas com warifteina estimuladas ou não com LPS, na presença ou não de Rolipran (Figura 28).

Estudos anteriores mostraram que o acúmulo de cAMP pode levar a inibição da resposta proliferativa em células estimuladas via BCR (Whisler *et al.*, 1992). Além disso,

este nucleotídeo cíclico induz inibição da sinalização via TLR4 (Miguet *et al.*, 2005). Esses achados estão de acordo com a ação da warifteina em nosso modelo, já que observamos que a mesma parece atuar em vias de sinalização que levariam ao aumento de cAMP.

Já foi demonstrado que a inibição da fosforilação de ERK 1 e 2 pode ser induzida pelo acúmulo de cAMP mediado pela adição de IBMX (inibidor de fosfodiesterases) e Forskolin (ativador da adenilato ciclase). Além disso, essa inibição pode ser revertida pela adição de H-89 (inibidor de PKA) (Miguet *et al.*, 2005). Esses estudos apontam para uma inibição da via MEK-ERK como resultado do aumento do cAMP (Miguet *et al.*, 2005). Com base nesses dados, avaliamos no nosso modelo, se o tratamento com a warifteina alteraria a fosforilação da proteína ERK. Nossos resultados mostraram que o aumento do cAMP produzido pelo tratamento com warifteina resulta na diminuição da fosforilação de ERK.

O aumento na concentração de cAMP parece ser capaz de levar a inibição do fator de transcrição NFκB em células ativadas via BCR ou via TLR4 (Neumann *et al.*, 2004; Miguet *et al.*, 2005). Além disso, postula-se que, em células ativadas via BCR ou via TLR a PKA exerça efeito inibitório sobre o NFκB. Esse efeito pode ser revertido pela adição do inibidor de PKA H-89 (Miguet *et al.*, 2005). Com base nesses relatos não nos surpreendeu que em nosso modelo o aumento do cAMP resultante do tratamento com warifteina tenha diminuído a translocação do NFκB para o núcleo.

Nossos resultados, tomados em conjunto, sugerem que o mecanismo de ação da warifteina em nosso sistema seria mediado pelo aumento dos níveis intracitoplasmáticos de cAMP, levando a ativação da proteína quinase A. Este processo levaria a inibição da atividade do NFκB e conseqüente inibição da proliferação e secreção de imunoglobulinas. Nossos resultados caracterizam, adicionalmente, a warifteina como um potente inidor da resposta de células B. Estudos recentes (Bezerra-Santos *et al.*, 2006) mostraram que a warifteina teria efeito antialérgico importante pelo fato de bloquear a produção de leucotrienos e diminuir a eosinofilia. Nossos resultados sugerem mais um possível efeito benéfico da warifteina em modelos de alergia, que seria o bloqueio da produção de imunoglobulinas, entre elas a IgE, por células B.

7 – CONCLUSÕES

PARTE I – Caracterização do envolvimento de TAPP2 na modulação da ativação de células B

- 1- Produzimos um anticorpo anti-TAPP2 que reconhece uma única banda de aproximadamente 50 kDa, podendo ser utilizado para estudos de lisados totais e imunoprecipitação. Este anticorpo não apresentou ligação inespecificada em nenhum dos testes realizados.
- 2- Demonstramos, pela primeira vez, a indução de fosforilação da proteína TAPP2 após co-agregação de Fc γ RII/BCR.
- 3- A fosforilação de TAPP2 está diminuída em células B de animais deficientes de SHIP, o que sugere seu envolvimento com a regulação da atividade dessa molécula.
- 4- A fosforilação de TAPP2 está aumentada em células B de animais anérgicos (ARS), sugerindo sua participação na manutenção dos níveis elevados de cálcio dessas células.
- 5- A proteína TAPP2 é recrutada para a membrana após co-agregação de Fc γ RII/BCR.
- 6- Em conjunto nossos dados sugerem o envolvimento de TAPP2 na fina rede que regula a ativação de células B.

PARTE II – Estudo dos efeitos imunomoduladores da curcumina em células B ativadas

- 1- A curcumina não apresenta toxicidade sobre células B.
- 2- O tratamento com curcumina inibiu a resposta proliferativa e secreção de imunoglobulinas por células B estimuladas com LPS. No entanto, não detectamos efeito desta substância na resposta induzida por ligação a Ig de superfície.
- 3- A curcumina não alterou a expressão da molécula co-estimulatória CD86 em células B ativadas por LPS.

- 4- A curcumina impediu a translocação do fator de transcrição NFκB em células B ativadas por LPS. Este efeito pode estar relacionado à alteração da fosforilação de IκB, já que esta proteína tem sua fosforilação reduzida em células B ativadas por ligantes de receptores do tipo Toll tratadas com curcumina.
- 5- O perfil de fosforilação total de proteínas em resíduos de tirosinas apresentou uma discreta diminuição em células ativadas e tratadas com curcumina.
- 6- As MAPK ERK e p-38 tiveram sua fosforilação reduzida em células ativadas e tratadas com curcumina.
- 7- Nossos dados sugerem que IκB, ERK e p-38 seriam possíveis alvos da curcumina em células B. Sendo assim, por estas moléculas estarem envolvidas na ativação e síntese de proteínas, a resposta proliferativa e a secreção de imunoglobulinas estariam comprometidas em nosso modelo.

Parte III – Caracterização dos efeitos imunomoduladores da warifteina em células B

- 1- A warifteina não afeta a viabilidade de células B murinas frescas e da linhagem DAUDI.
- 2- O tratamento com warifteina inibiu a resposta proliferativa e secreção de imunoglobulinas por células B ativadas por ligantes de receptores do tipo Toll e anti-IgM.
- 3- A expressão da molécula co-estimulatória CD86 não foi afetada em células estimuladas com LPS e tratadas com warifteina.
- 4- A warifteina não altera o perfil de fosforilação de proteínas com resíduos de tirosinas totais em células estimuladas por LPS e anti-IgM. Entretanto, a fosforilação de ERK apresentou-se reduzida, indicando que a inibição da via das MAPK seja um dos alvos da warifteina.
- 5- A translocação do fator de transcrição NFκB para o núcleo foi bloqueada em células ativadas por LPS e tratadas com warifteina.
- 6- A warifteina induziu um aumento nos níveis intracelulares de cAMP.

- 7- Em conjunto, nossos dados sugerem que a warifteina atua sobre células B por induzir a elevação dos níveis intracelulares de cAMP, o que afetaria a sinalização nestas células .

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AATSINKIA, J.T. & RAJANIEMI, H. J. 2005. An alternative use of basic pGEX vectors for producing both N- and C-terminal fusion proteins for production and affinity purification of antibodies. *Protein Expr Purif.* **40**: 287-291.
- ADAMS, B. K., CAI, J. & ARMSTRONG, J., HEROLD, M., LU, Y. J., SUN, A., SNYDER, J. P., LIOTTA, D. C., JONES, D. P. & SHOJI, M. 2005. EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism. *Anticancer. Dorgs.* **16**: 263-275.
- AGAARD-TILLERY, K. M. & JELINEK, D. F. 1996. Phosphatidylinositol 3-kinase activation in normal human B lymphocytes: differential sensitivity of growth and differentiation to wortmannin. *J. Immunol.* **156**: 4543-4554.
- AGGARWAL, B. B., KUMAR, A. & BHARTI, C. A. 2003. Anticancer potencial of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* **23**: 363-398.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S., PIUVEZAM, M. R. & PEÇANHA, L. M. T. 2003. Modulation of B lymphocyte function by na aqueous fraction of the ethanol extract *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). *Braz. J. Med. Res.* **36**: 1511-1522.
- ALLAM, A. & MARSHALL, A. J. 2005. Role of the adaptor proteins Bam32, TAPP1 and TAPP2 in lymphocyte activation. *Immunol. Lett.* **97**: 7-17.
- APASOV, S. G. & SITKOVSKY, M. V. 1999. The extracellular versus intracellular mechanisms of inhibition of TCR-triggered activation in thymocytes by adenosine under conditions of inhibited adenosine deaminase. *Int. Immunol.* **11**: 179-189.
- ARAUJO, C. C. & LEON, L. L. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 723-728.
- BALANDRIN, M. F. 1993. Plant-derived natural products in drug discovery and development: Na overview. *Acs. Symposium Series Washington, D.C.: American Chemical Society.* **534**: 2-12.
- BANCHEREAU, J., BAZAN, F., BLANCHARD, D., BRIERE, F., GALIZZI, J. P., VAN KOOTEN, C., LIU, Y. J. *et al.* 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 881-922.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**: 245-252.
- BARBOSA-FILHO, J. M., AGRA, M. F. & THOMAS, G. 1997. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *C. sympodialis* from Paraíba (Brazil). *Ciência e Cultura.* **49**: 386-394.
- BATISTA-LIMA, K. V., RIBEIRO, K. V., RIBEIRO, R. A., BALESTIENE, F. M. P., THOMAS, G. & PIUVEZAM, M. R. 2001. Anti-inflammatory activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) leaf extract. *Acta Pharmaceutica Bonaerense.* **20**: 275-279
- BENGMARK, S. 2006. Curcumin, na atoxic antioxidant and natural NFKappaB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *JPEN J.* **30**: 45-51.
- BERNASCONI, N. L., TRAGGIAI, E. & LANZAVECHIA, A. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science.* **298**: 2199-2202.
- BERNASCONI, N. L., ONAI, N. & LANZAVECHIA, A. 2003. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood.* **101**: 4500-4504.
- BEZERRA-SANTOS, C. R., BALESTIENE, F. M. P., ROSSI-BERGMANN, B., PEÇANHA, L. M. T. & PIUVEZAM, M. R. 2004. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. *J. Ethanopharmacol.* **95**: 191-197.

- BEZERRA-SANTOS, C. R., VIEIRA-DE-ABREU, A., BARBOSA-FILHO, J. M., BANDEIRA-MELO, C., PIUVEZAM, M. R. & BOZZA, P. T. 2006. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifiteine. *Int. Immunopharmacol.* **6**: 1152-1160.
- BIJSTERBOSCH, M. K., MEADE C. J., TURNER, G. A., KLAUSS G. G. 1985. B lymphocyte receptors and polyphosphoinositide degradation. *Cell.* **41**:999-1006.
- BOLLAND, S., PEARSE, R. N., KUROSAKI, T. & RAVETCH, J. V. 1998. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity.* **8**: 509-516.
- BORDOR, J., FEIGENBAUM, L., BODOROVA, J., BARE, C., REITZ, M. S. JR. & GRESS, R. E. 2001. Suppression of T cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *J. Leuk. Biol.* **69**: 1053-1059.
- BORGUESI, L. & MILCAREK, C. 2006. From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. *Immunol. Res.* **36**: 27-32.
- BONE, H. & WILLIAMS, N. A. 2001. Antigen-receptor cross-linking and lipopolysaccharide trigger distinct phosphoinositide 3-kinase-dependent pathways to NF-kappa B activation in primary B cells. *Int immunol.* **13**: 807-816.
- BORIACK-SJODIN, P., MARGARIT, S. M., BAR-SAGI, D. & KURIYAN, J. 1998. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature.* **394**: 337-343.
- BRAUWEILER, A., TAMIR, I., & CAMBIER, J. C. 2000a. Bilevel control of B-cell activation by the inositol 5-phosphatase SHIP. *Immunol. Rev.* **176**: 69-74.
- BRAUWEILER, A., TAMIR, I., DAL PORTO, J., BENSCHOP, R. J., HELGASON, C. D., HUMPHRIES, R. K. & CAMBIER, J. C. 2000b. Differential regulation of B cell development, activation and death by the src homology 2 domain-containing 5' inositol phosphatase (SHIP). *J. Exp. Med.* **191**: 1545-1554.
- BRAUWEILER, A., MERRELL, K., GAULD, S. B. & CAMBIER, J. C. 2007. Cutting Edge: Acute and chronic exposure of immature B cells to antigen leads to impaired homing and SHIP1-dependent reduction in stromal cell-derived factor-1 responsiveness. *J. Immunol.* **178**: 3353-3357.
- BRUNSWICK, M., FINKELMAN, F. D., HIGHET, P. F., INMAN, J. K., DINTZIS, H. M. & MOND, J. J. 1988. Picogram quantities of anti-Ig antibodies coupled to dextran induce B cell proliferation. *J. Immunol.* **140**: 3364-3372.
- CAMBIER, J. C. & JULIES, M. H. 1987. Early changes in quiescent B cell physiology subsequent to cognate and bystander interaction with helper T cell. *Scand. J. Immunol.* **27**: 59-63.
- CAMBIER, J. C., GAULD, S. B., MERRELL, K. T. & VILEN, B. J. 2007. B-cell anergy : from transgenic models to naturally occurring anergic B cells ? *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 633-643.
- CAMPBELL, K. S. 1999. Signaling transduction from the B cell antigen receptor. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 256-264.
- CARTER, R. H. & BARRINGTON, R. A. 2004. Signaling by the CD19/CD21 complex on B cells. *Curr. Dir. Autoimmun.* **7**: 4-32.
- CELLA, M., SALLUSTRO, F. & LANZAVECHIA, A. 1997. Origin, maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 10-16.
- CHENG, A. L., HSU, C. H., LIN, J. K. HSU, M. M., HO, Y. F., SHEN, T. S., KO, J. Y., LIN, J. T., LIN, B. R., MING-SHIANG, W., YU, H. S., JEE, S. H., CHEN, G. S., CHEN, T. M., CHEN, C. A., LAI, M. K., PU, Y. S., PAN, M. H., WANG, Y. J., TSAI, C. C. & HSIEH, C. Y. 2001. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* **21**: 2895-2900.
- CIPRIANI, B., BORSELLINO, G., KNOWLES, H., TRAMONTI, D., CAVALIERE, F., BERNARDI, L., BATTISTINI, L., BROSAN, C. F. 2001. Curcumin inhibits activation of V γ 9V δ 2 T cells by phosphoantigens and induces apoptosis involving apoptosis-inducing factor and large scale DNA fragmentation. *J. Immunol.* **167**: 3454-3462.

- COGGESHALL, K. M. 1998. Inhibitory signaling by B cell Fc γ RIIb. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 306-312.
- COGGESHALL, K. M. 2002. Regulation of signal transduction by the Fc gamma receptor family members and their involvement in autoimmunity. *Curr. Dir. Autoimmun.* **5**: 1-29.
- CRESPO, P., SCHUEBEL, K. E., OSTROM, A. A., GUTKIND, J. S. & BUSTELO, X. R. 1997. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP Exchange by Vav proto-oncogene product. *Nature.* **258**: 169-172.
- CROWLEY, M., INABA, K. & STEINMAN, R. M. 1990. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J. Exp. Med.* **172**: 383-386.
- DAMEN, J. E., ROSTEN, P., HUMPHRIES, R. K., JEFFERSON, A. B., MAJERUS, P. W. & KRYSTAL, G. 1996a. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetraphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 1689-1693.
- DAMEN, J. E., ROSTEN, P., HUMPHRIES, R. K., JEFFERSON, A. B., MAJERUS, P. W. & KRYSTAL, G. 1996b. Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphates and Shc to the B-cell Fc gamma immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4305-4311.
- DASSARI, P., NICHOLSON, I. C., HODGE, G., DANDLE, G. W. & ZOLA, H. 2005. Expression of Toll-like receptors on B lymphocyte. *Cell.* **236**: 140-145.
- DYE, J. R., PALVANOV, A., GUO, B. & ROTHSTEIN, T. L. 2007. B cell receptor cross-talk: exposure to lipopolysaccharide induces an alternate pathway for B cell receptor-induced ERK phosphorylation and NF κ B activation. *J. Immunol.* **179**: 229-235.
- DE ANDRES, B., MUELLER, A. L., VERBEEK, S., SANDOR, M. & LYNCH, G. 1998. A regulatory role for Fc γ receptors CD16 and CD32 in the development of murine B cells. *Blood.* **92**: 2823-2829.
- DE FRANCO, A. L. 1994. Signaling pathways activated by protein tyrosine phosphorylation in lymphocyte. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 364-371.
- DELLA FAZIA, M. A., SERVILLO, G. & SASSONE-CROSSI, P. 1997. Cyclic AMP signaling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett.* **410**: 22-24.
- DOWLER, S., CURRIE, R. A., CAMPBELL, D. G., DEAK, M., KULAR, G., DOWNES, C. P. & ALESSI, D. R. 2000. Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem. J.* **351**: 19-31.
- FERREIRA, A. M., FREITAS, M. R., KLUPPEL, B. L., PIUVEZAM, M. R. & THOMAS, G. 1996. "Atividade do Extrato das folhas de *C. sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) na migração de células para o espaço broncoalveolar em cobaias sensibilizados". XIV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Florianópolis, SC – 17 a 20 de setembro de 1996.
- FULD, S., BORLAND, G. & YARWOOD, S. J. 2005. Elevation of cyclic AMP in Jurkat T-cells provokes distinct transcriptional responses through the protein kinase A (PKA) and exchange protein activated by cyclic AMP (EPAC) pathways. *Exp. Cell Res.* **309**: 161-173.
- FREEBUM, R. W., WRIGHT, K. L., BURGESS, S. J., ASTOUL, E., CANTRELL, D. A. & WARD, S. G. 2002. Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate metabolites in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors. *J. Immunol.* **169**: 5441-5450.
- DE FREITAS, M. R., CORTES, S. F., THOMAS, G. & BARBOSA-FILHO, J.M. 1996. Modification of Ca²⁺ metabolism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinone alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *J. Pharmacol.* **48**: 332-336.
- FRUMAN, D. A., SNAPPER, S. B., YBALLE, C. M., DAVIDSON, L., YU, J. Y., ALT F. W., A. & CANTLEY, L. C. 1999. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85 α . *Science.* **283**: 393-397.

- GALDIERO, M., PISCIOTTA, M. G., GALDIERO, E., CARRATELLI, C. R. 2003. Porins and lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* regulate the expression of CD80 and CD86 molecules on B cells and macrophages but not CD28 and CD152 on T cells. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**: 1104-1111.
- GAO, B. & TSAN, M. F. 2003. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor α release by murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **278**: 174-179.
- GAO, X., KUO, J., JIANG, H., DEEB, D., LIU, Y., DIVINE, G., CHAPMAN, R. A., DULCHAVSKY, S. A. & GAUTAM, S. C. 2004. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **68**: 51-61.
- GAULD, S. B., DAL PORTO, J. & CAMBIER, J. C. 2002. B cell antigen receptor signaling roles in cell development and disease. *Science*. **296**: 1641-1642.
- GAVIN, A., AIT-AZZOUZE, D., MARTENSSON, A., DUONG, B., VERKOCZY, L., SKOG, J. L., SKOG, P. & NEMAZEE, D. 2004. Peripheral B lymphocyte tolerance. *Keio J. med.* **53**: 151-158.
- GEISSLER, M. & WETH, R. 2002. Immunotherapy: new insights. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* **91**: 2236-2246.
- GIALLOURAKIS, C., KASHIWADA, M., PAN, P. Y., DANIAL, N., JIANG, H., CAMBIER, J., Coggeshall, K. M. & Rothman, P. (2000). Positive regulation of interleukin-4-mediated by the SH2-containing inositol-5'-phosphatase. *J. Biol. Chem.* **275**: 2975-2982.
- GROOM, J. R., FLETCHER, C. A., WALTERS, S. N., GREY, S. T., WATT, S. V., SWEET, M. J., SMYTH, M. J., MACKAY, C. R. & MACKAY, F. 2007. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J. Exp. Med.* **204**: 1959-1971.
- GUARURAJAN, M., DASU, T., SHAHIDAIN, S., JENNINGS, C. D., ROBERTSON, D. A., RANGNEKAR, V. M. & BONDADA, S. 2007. Spleen tyrosine kinase (Syk), a novel target of curcumin, is required for B lymphoma growth. *J. Immunol.* **178**: 111-121.
- HAN, S. S., CHUNG, S. T., ROBERTSON, D. A., RANJAN, D. & BONDADA, S. 1999. Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of *erg-1*, *c-myc*, *bcl-XL*, NF κ B, and *p53*. *Clin. Immunol.* **93**: 152-161.
- HEALY, J. I. & GOODNOW, C. C. 1998. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 645-670.
- HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K. & AKIRA, S. 1999. Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *lps* gene product. *J. Immunol.* **162**: 3749-3752.
- HSU, C. H. & CHENG, A. L. 2007. Clinical studies with curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **595**: 471-480.
- IRVIN, B. J., HANSON, C. L., SMITH, L. H. & DANIELS, C. K. 2001. Cyclic AMP and IL-6 signaling cross-talk: comodulation of proliferation and apoptosis in the 7Td1 B cell hybridoma. *Nat. Immunol.* **256**: 73-79.
- IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptative immune responses. *Nat. Immunol.* **5**: 987-995.
- JAGETIA, C. G. & AGGARWAL, B. B. 2007. "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J. Clin. Immunol.* **27**: 19-35.
- JANSSEN, E. & ZHANG, W. 2003. Adaptor proteins in lymphocytes activation. *Curr. Opin. Immunol.* **15**: 269-276.
- JOE, B. & LOKESH, B. R. 1994. Role of capsaicin, curcumin and dietary *n* - 3 fatty acids in lowering the generation of reative oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Acta.* **1224**: 255-263.

JOE, B. & LOKESH, B. R. 2000. Dietary *n* – 3 fatty acids, curcumin and capsaicin lower the release of lysosomal enzymes and eicosanids in rat peritoneal macrophages. *Mol. Cell Biochem.* **203**: 153-161.

KAWAI, T. & AKIRA, S. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ.* **13**: 816-825.

KAWAI, T. & AKIRA, S. 2007. TLR signaling. *Semin Immunol.* **19**:24-32.

KHOPDE, S. M., PRIYADARSINI, K. I. & VENKATE, P. 1999. Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue. *Biophys. Chem.* **80**: 85-91.

KIM, G. Y., KIM, K. H., LEE, S. H., YOO, M. S., LE, H. J., MOON, D. O., LEE, C. M., AHN, S. C., PARK, Y. C. & PARK, Y. M. 2005a. Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of Nfkappa B as potential targets. *J. Immunol.* **174**: 8116-8124.

KIM, G. Y., RYU, K., KO, Y. & PARK, C. 2005b. Effects of nuclear factor-kappaB inhibitors and its implication on *natural killer* T-cell lymphoma cells. *Br. J. Haematol.* **131**: 59-66.

KIMBER, W. A., TRINKLE-MULCAHY, L., CHEUUNG, P. C. F., DEAK, M., MARSDEN, L. J.,
2001. *Immunology* **102**: 501-511.

KIMBER A., KY, M. & ESCMOTEAR, Y. (A) 5LE331.

- LOTEMPIO, M. M., VEENA, M. S., STEELE, H. L., RAMAMURTHY, B., RAMALINGAM, T. S., COHEN, A. N., CHAKRABARTI, R., SRIVATSAN, E. S. & WANG, M. B. 2005. Curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11**: 6994-7002.
- MARSHALL, A. J., NIRO, H., LERNER, C. G., YUN, T. Y., THOMAS, S., DISTECHE, C. M. & CLARK, A. 2000. A novel B lymphocyte-associated adaptor protein Bam32, regulates antigen receptor signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Exp. Med.* **191**: 1319-1332.
- MARSHALL, A. J., KRAHAN, A. K., MA, K., DURONIO, V. & HOUS, S. 2002. TAPP1 and TAPP2 are targets of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in B cells: sustained plasma membrane recruitment triggered by the B cell antigen receptor. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 5479-5491.
- MATTHEWS, R. J., BOWNE, D. B., FLORES, E. & THOMAS, M. L. 1992. Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline, glutamic acid, serine, and threonine-rich sequences. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 2396-2405.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY, C. A. JR. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* **388**: 394-397.
- MELO, P. S., DE MEDEIROS CAVACANTE, H. M., BARBOSA-FILHO, J. M., DINIZ, M. F. F. M., DE MEDEIROS, I. A. & HAUN, M. 2003. Warifetine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. *Toxicol. Lett.* **142**: 143-151.
- MILLS, D. M. & CAMBIER, J. C. 2003. B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4⁺ T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Semin. Immunol.* **15**: 325-329.
- MILLS, D. M., STOLPA, J. C. & CAMBIER, J. C. 2004. Cognate B cell signaling via MHC class II: differential regulation of B cell antigen receptor and MHC class II/Ig-alpha beta signaling by CD22. *J. Immunol.* **172**: 195-201.
- MINGUET, S., HUBER, M., ROSENKRANZ, L., SCHAMEL, W. W., Reth, M. & Brummer, T. (2005). Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur. J. Immunol.* **35**: 31-41.
- MITCHELL, A. J., PAUL-CLARK, M. J., CLARKE, G. W., MCMASTER, S. K. & CARTWRIGHT. 2007. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J. Endocrinol.* **193**: 323-330.
- MURAGUCHI, A., MIYAZAKI, K., KEHRL, J. H. & FAUCI, A. S. 1984. Inhibition of human B cell activation by diterpine forskolin interference with B cell growth factor-induced G1 to S transition of B cell cycle. *J. Immunol.* **133**: 1283-1287.
- MUTA, T., KUROSAKI, T., MISULOVIN, Z., SANCHEZ, M., NUSSENZWEIG, M. C. & RAVETH, J. V. 1994. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of FcγRIIB modulates B-cell receptor signaling. *Nature.* **368**: 70-73.
- NATARAJAN, C. & BRIGHT, J. J. 2002. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus Kinase - STAT pathway in T lymphocytes. *J. Immunol.* **168**:6506-6513.
- NEUMANN, M., GRIESHAMMER, T., CHUVPILO, S., KNEITZ, B., LOHOFF, M., SCHIMPL, A., FRANZA, B. R. JR. & SERFLING, E. 2004. Rel A/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. *EMBO J.* **14**: 1991-2004.
- NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**: 461-477.
- NIMMERJAHN, F. & Racetch, J. V. 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* **96**: 179-204.
- ONO, M., OKADA, H., BOLLAND, S., YANAGI, S., KUROSAKI, T. & RAVETH, J. V. 1997. Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell.* **90**: 293-301.

- OTT, V. L., FONG, D. C. & CAMBIER, J. C. 2001. Fc gamma RIIB as a potential molecular target for intravenous gamma globulin therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108 (4Supl)**: S95-98.
- PAO, L. I., FAMIGLITTI, S. J. & CAMBIER, J. C. 1998. Asymmetrical phosphorylation and function of immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines in B cell antigen receptor signal transduction. *J. Immunol.* **160**: 3305-3314.
- PARKER, D. C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 331-360.
- PATWARDHAN, B. & GAUTAM, M. 2005. Botanical immunodugs: scope and opportunities. *Drug Discovery Today.* **10**: 495-502.
- PATWARDHAN, B. & GAUTAM, M. 2005. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. *Drug. Discov. Today.* **10**: 495-502.
- PENG, S. L. 2005. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **17**: 230-236.
- RAHMAN, I., Biswas, S. K. & Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **72**: 1439-1452.
- RAJAN, D., JOHNSTON, T., WU, G., ELLIOT, L., BONDADA, S. & NAGABHUSHAN, M. 1998. Curcumin blocks cyclosporine A-resistant CD28 costimulatory pathway of human T-cell proliferation. *J. Surg. Res.* **77**: 174-178.
- RAJAN, D., CHEN, C., JOHNSTON, T. D., JEON, H. & NAGABHUSHAN, M. 2004. Curcumin inhibits mitogen stimulated lymphocyte proliferation, NFκB activation, and IL-2 signaling. *J. Surg. Res.* **121**: 171-177.
- RAVETH, J. R. & LANIER, L. L. 2002. Immune inhibitory receptors. *Science.* **290**: 84-89.
- RINGSHAUSEN, I., PESCHEL, C. & DECKER, T. 2006. Cell cycle inhibition in malignant lymphoma: disease control by attacking the cellular proliferation machinery. *Curr. Drug. Targets.* **7**: 1349-1359.
- ROCK, F. L., HARDIMAN, G., TIMANS, J. C., KASTELEIN, R. A. & BAZAN, J. F. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 588-593.
- ROPER, R. L., LUDLOW, J. W. & PHIPPS, R. P. 1994. Prostaglandin E2 inhibits B lymphocyte activation by a cAMP-dependent mechanism: PGE-inducible regulatory proteins. *Cell. Immunol.* **154**: 296-308.
- RUPRECHT, C. R. & LANZAVECHIA, A. 2006. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol.* **36**:810-816.
- SCHAEFFER, E. M. & SCHWARTZBERG, P. L. 2002. Tec family kinases in lymphocyte signaling and function. *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 282-288.
- SCHARENBERG, A. M., EL-HILLAL, O., FRUMAN, D. A., BEITZ, L. O., LI, Z., LIN, S., GOUT, I., CANTLEY, L. C., RAWLINGS, D. J. & KINET, J. P. 1998. Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J.* **17**: 1961-1972.
- SCHEID, M. P., HUBER, M., DAMEN, J. E., HUGHES, M., KANG, V., NIELSEN, P., PRESTWICH, G. D., KRYSTAL, G. & DURONIO, V. 2002. Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation: phosphatidylinositol (3,4)P2 is required for PKB phosphorylation at Ser-473: studies using cells from SH2-containing inositol-5-phosphatase knockout mice. *J. Biol. Chem.* **277**: 9027-9035.
- SEN, R. 2006. Control of B lymphocyte apoptosis by the transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* **25**:871-883.
- SHEINMAN, R. I., GUALBERTO, A., JEWELL, C. M., CIDLOWSKI, J. A. & BALDWIN, A. S. JR. 1995. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-Kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 943-953.
- SHISHODIA, S., SETHI, G. & AGGARWAL, B. B. 2005. Curcumin: getting back to the roots. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1056**: 206-217.

- SIKORA, E., BIELAK-ZMIJEWSKA, K., SKIERSKI, J. & RADZISZEWSKA, E. 1997. Inhibition of human and rat T lymphocytes by curcumin, a curry pigment. *Biochem. Pharmacol.* **54**: 889-907.
- SKALHEGG, B. S., TASKEN, K., HANSSON, V., HUITFELDT, H. S., JAHMSEN, T. & LEA, T. 1994. Location of cAMP-dependent protein kinase type I with the TCR-CD3 complex. *Science.* **263**: 84-87.
- SKALHEGG, B. S., FUNDEURUD, A., HENANGER, H. H., HAFTE, T. T., LARSEN, A. C., KVISSSEL, A. K., EIKVAR, S. & ORSTAVIK, S. 2005. Protein kinase a (PKA): potential target for therapeutic intervention of dysfunctional immune cells. *Curr. Drug. Targets.* **6**: 655-664.
- SMITH, G. R. 1991. Conjugational recombination in *E. coli*: myths and mechanisms. *Cell.* **64**: 19-27.
- SMITH, P. G., WANG, F., WILKINSON, K. N., SAVAGE, K. J., NEUBERG, D. S., BOLLAG, G., SHIPP, M. A. & AGUIAR, R. C. T. 2005. The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3KAKT-dependent apoptosis in B cell lymphoma. *Blood.* **105**: 308-316.
- SOUTH, E. H., EXON, J. H. & HENDRIX, K. 1997. Dietary curcumin enhances antibody response in rats. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **19**: 105-119.
- SPERTINI, F. 2007. New concepts for the therapy of systemic lupus erythematosus. *Rev. Med. Suisse.* **3**: 98-102.
- TAKEDA, K., KAISHO, T. & AKIRA, S. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 335-376.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* **16**: 3-9.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**: 1-14.
- TAMIR, I., STOLPA, J. C., HELGASON, C. D., NAKAMURA, K., BRUHNS, D., DAERON, M. & CAMBIER, J. C. 2000. The RasGAP-binding protein p62^{dok} is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cell. *Immunity.* **12**: 347-358.
- TAN, B. K. & VANITHA, J. 2004. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. *Curr. Med. Chem.* **11**: 1423-1430.
- TANDYE, S. G., AVERY, D. T., Deenick, E. K. & Hodgkin, P. D. (2003). Intrinsic differences in the proliferation of naïve and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J. Immunol.* **170**: 686-694.
- TANGAPAZHAM, R. L., SHARMA, A. & MAHESHWARI, P. K. 2006. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J.* **8**: E443-E449.
- TEDDER, T. F., ZHOU, L. J. & ENGEL, P. 1994. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol. Today.* **15**: 437-442.
- THOMAS, G., ARAUJO, C. C., DUARTE, J. C., SOUZA, D. P. & PYNE, N. J. 1997a. Bronchodilatory activity of aqueous fraction of ethanolic extract of leaves of *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) in guinea-pig. *Phytomedicine.* **4**: 233-238.
- THOMAS, G., BURNES, F., PYNE, S. & PYNE, N. J. 1997b. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) on spontaneous tone of isolated trachea. *Phytoter. Res.* **11**: 496-499.
- THOMAS, G., SELAK, M. & HENSON, P. M. 1999. Effects of aqueous fraction of ethanol extract of leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in human neutrophils. *Phytoter. Res.* **13**: 9-13.
- THORPY, T. J. 1994. α-adrenoceptors, cAMP and airways smooth muscle regulation: challenges to the dogma. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**: 370-374.
- TOGNI, M., LINDQUIST, J., GERBER, A., KOLSCH, U., HAMM-BAARKE, A., KLOCHE, S. & SCHRAVEN, B. 2004. The role of adaptor proteins in lymphocytes activation. *Mol. Immunol.* **41**: 615-630.
- TOMITA, M., KAVAKAMI, H., UCHIHARA, J. N., OKUDAIRA, T., MASUDA, M., TAKASU, N., MATSUDA, T., OHTA, T., TANAKA, Y. & MORI, N. 2006a. Curcumin suppresses constitutive activation of AP-1 by downregulation of JunD protein in HTLV-1-infected T-cell-lines. *Leuk. Res.* **30**: 313-321.

- TOMITA, M., KAVAKAMI, H., UCHIHARA, J. N., OKUDAIRA, T., MASUDA, M., TAKASU, N., MATSUDA, T., OHTA, T., TANAKA, Y. & MORI, N. 2006b. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive active NF-kppaB, leading to suppression of cell growth of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer*. **118**: 765-772.
- TORGERSEN, K. M., VAAGE, J. T., LEVY, F. O., HANSSON, V., ROLSTAD, B. & TASKEN, K. 1997. Selective activation of cAMP-dependent protein kinase type I inhibits rat natural killer cell cytotoxicity. *J. boil. Chem.* **272**: 5495-5500.
- TORGERSEN, K. M., VANG, T., ABRHAMSEN, H., YAQUB, S. & TASKEN, K. 2002. Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated of immune function. *Cell. Signal*. **14**: 1-9.
- TOUBI, E. & SHOENFELD, Y. 2004. Toll-like receptores and their role in the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity*. **37**:183-188.
- VENKATARAMAN, C., CHELVARAJAN, R. L., CAMBIER, J. C. & BONDADA, S. 1998. Interleukin-4 overcomes the negative influence of cyclic AMP accumulation on antigen receptor stimulated B lymphocytes. *Mol. Immunol.* **35**: 997-1014.
- VENKATARAMAN, C. G., SHANKAR, G., SEN, G. & BONDADA, S. 1999. Bacterial lipopolysaccharide induced B cell activation is mediated via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent signaling pathway. *Immunol. Lett.* **69**: 233-238.
- WANG, F., PAN, M. H., CHENG, A. L., LIN, L. I., HO, Y. S., HSIEH, C. Y. & LIN, J. K. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**:1867-1876.
- WATT, S. A., KIMBER, W. A., FLEMING, I. N., LESLIE, N. R. & DOWNES, C. P. & LUCOCQ, J. M. 2004. Detection of novel intracellular agonist responsive pools of phosphatidylinositol 3,4-biphosphate using the TAPP1 pleckstrin homology domain in immunoelectron microscopy. *Biochem. J.* **377**: 653-663.
- WEISSMAN, G. 1991. Aspirin. *Sci. Am.* **264**: 84-90.
- WHISLER, R. L., BEIQING, L., GRANTS, I. S. & NEWHOUSE, Y. G. 1992. Cyclic AMP modulation of human B cell responses: role of cAMP-dependent protein kinases in enhancing B cell responses to phorbol diesters and ionomycin. *Cell. Immunol.* **42**: 398-415.

8 – ANEXOS

Modulation of *in vitro* Murine B-lymphocyte Response by Curcumin and its Synthetic Analogues

Decoté-Ricardo, D.¹; Chagas, K.K.F.¹.; Rocha, J.D.B.¹.; Lima, M. E. F.²; Redner, P.³;
Lopes, U.G.³; Cambier, J. C.⁴; Arruda- Hinds, L.⁵ & Peçanha, L.M.T.¹

¹ Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil.

³ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴ Integrated Department of Immunology, University of Colorado Health Sciences Center and National Jewish Medical Research Center, Denver, Colorado, USA.

⁵ Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence:

L.M.T. Peçanha - Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco I, sala I2-062, Ilha do Fundão, 21944-570 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

FAX: +55-21-2560-8344

E-mail: lpecanha@micro.ufrj.br

Research supported by CNPq, FINEP, PRONEX – MCT, and FAPERJ. K.K.F. Chagas, was the recipient of a CNPq fellowship, D.D. Decoté-Ricardo was a recipient of a CAPES/MEC fellowship and J.D.B. Rocha was a recipient of a CNPq fellowship. Both K.K.F. Chagas and D. Decoté Ricardo contributed equally in the development of the study. The authors are indebted with the technical support of Sidney Gomes da Costa.

Abstract

Curcumin is a phenolic natural product isolated from the rhizome of *Curcuma longa* (tumeric). It was previously described that curcumin had a potent anti-inflammatory effect and inhibited the proliferation of a variety of tumor cells. In the present study, we investigated the inhibitory effects of curcumin and previously characterized synthetic analogs on the response of normal murine splenic B cells. Curcumin inhibited the proliferative response of purified splenic B cells from BALB/c mice stimulated with the Toll-like receptor ligands LPS and CpG oligodeoxynucleotides. LPS-induced IgM secretion was also inhibited by curcumin. The LPS-induced proliferative response was similarly inhibited by the curcumin synthetic analogs. The proliferative response induced by either the T-independent type 2 stimuli anti-delta-dextran or anti-IgM antibodies was relatively resistant to the effect of curcumin and its analogs when compared with the inhibition detected in LPS-induced responses. Curcumin did not modify the expression of CD86 induced by stimulation with LPS. We investigated the intracellular signaling events involved in the inhibitory effects of curcumin on murine B cells. Curcumin did not significantly inhibit the increase in calcium levels induced by anti-IgM antibody. Western blotting analysis showed that curcumin inhibited TLR ligands and anti-IgM-induced phosphorylation of ERK, I κ B and p38. Curcumin also decreased the nuclear levels of NF κ B. Our results suggested that curcumin is an important inhibitor of signaling pathways activated upon B cell stimulation by TLR ligands. These data indicate that curcumin could be a potent pharmacological inhibitor of B cell activation.

Key words: B lymphocyte, Curcumin, Immunoglobulin, Signal transduction, TLR

Effect of the Alkaloid Warifteine Purified from *Cissampelos sympodialis* on B Lymphocyte function *in vitro*

Rocha, J.D.B.¹; **Decoté-Ricardo, D.**¹; Redner, P.²; Lopes, U.G.²; Piuvezam, M.R.³;
Arruda- Hinds, L.⁴ & Peçanha, L.M.T.¹

¹Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, PB, Brazil.

⁴ Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence:

L.M.T. Peçanha - Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco I, sala I2-062, Ilha do Fundão, 21944-570, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

FAX: +55-21-2560-8344

E-mail: lpecanha@micro.ufrj.br

Research supported by CNPq, PRONEX – MCT, PUC/PETROBRAS and FAPERJ. J.D.B. Rocha was a recipient of a CNPq fellowship and D. Decoté-Ricardo was a recipient of a CAPES/MEC fellowship. Both J.D.B Rocha and D. Decoté Ricardo contributed equally in the development of the study. We thank Dr. Barbosa-Filho (UFPB) for providing the warifteine and Dr. John Cambier for helpful discussion and for supplying reagents for the biochemical studies. The authors are indebt with Sidney Gomes da Costa for the technical support, with Ilka Abreu and Dr. Julio Scharfstein for the collaboration of in the calcium studies, and with S.R. Cotta for the collaboration of in the initial experiments.

ABSTRACT

The aqueous fraction of the ethanolic extract obtained from the plant *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) was previously described to inhibit both T cell and B cell function. The alkaloid warifteine is one of the major components of this extract. In the present study we investigated the effect of warifteine on B lymphocyte function and characterized its mechanism of action. Purified splenic murine B lymphocytes were stimulated with either Toll-like receptor (TLR) ligands (LPS, Pam₃Cys and CpG oligodeoxynucleotides) or anti-IgM antibody. Warifteine inhibited the proliferative response and immunoglobulin (Ig) secretion induced by these stimuli. This alkaloid did not inhibit, however, LPS and anti-IgM-induced CD86 expression. Kinetics studies demonstrated that warifteine blocks B cell function even when added after 48hs of a 72 hs culture. Warifteine also inhibited the proliferative response induced by phorbol myristate acetate and the calcium ionophore A23187. In order to characterize the mechanism of action of warifteine, we investigated the signal transduction pathways that would be blocked by this alkaloid. Warifteine did not modify total protein phosphorylation in LPS and anti-IgM-activated B cells. However, this alkaloid decreased the phosphorylation of the mitogen activated protein kinase (MAPK) ERK and decreased the intranuclear levels of the transcription factor NFκB. Warifteine induced an increase in cAMP. Taking together, our data suggest that warifteine is a potent inhibitor of B cell response *in vitro* and that this effect may be due to the induction of increased intracellular cAMP levels, suggesting that this substance may be useful as a modulator of B cell function.

Key words: B lymphocyte, *Cissampelos sympodialis*, warifteine, Immunoglobulin, Signal transduction, TLR

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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