

Juliana Dutra Barbosa da Rocha

Modulação da Atividade de Linfócitos B pela Warifteina isolada de
Cissampelos sympodialis.



Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Ligia Maria Torres Peçanha



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO DE 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Rocha, Juliana Dutra Barbosa da Rocha
Modulação da atividade de linfócitos B pela warifteina isolada de
Cissampelos sympodialis. Juliana Dutra Barbosa da Rocha – Rio de Janeiro,
2009
xv, 64.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof.
Paulo de Góes, 2006.

Orientador: Ligia Maria Torres Peçanha.

Referências bibliográficas: f 113

1. Warifteina 2. Linfócitos B 3. cAMP 4. *Cissampelos sympodialis* 5.
Transdução de sinal 6. Receptores tipo Toll I. Peçanha Ligia Maria Torres.
II, UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em
Ciências Biológicas. III. Modulação da atividade de linfócitos B pela
warifteina isolada de *Cissampelos sympodialis*.

Juliana Dutra Barbosa da Rocha

Modulação da Atividade de Linfócitos B pela Warifteina isolada de
Cissampelos sympodialis.

Rio de Janeiro, 6 de Fevereiro de 2009.

Ligia Maria Torres Peçanha, Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica),
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade
Federal do Rio de Janeiro

José Mauro Peralta, Doutor em Ciências (Microbiologia), Instituto de
Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de
Janeiro

Adriana Cesar Bonomo, Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica),
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade
Federal do Rio de Janeiro

Maria Isabel Doria Rossi, Doutora em Patologia, Instituto de Ciências
Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Maria Bellio, Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de
Microbiologia Professor Paulo de Góes

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, sob a orientação da Prof^a Ligia Maria Torres Peçanha.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço muita a toda a minha família, em especial a papai, mamãe e ao meu irmão Raphael, que mesmo nos momentos mais difíceis das nossas vidas sempre me incentivaram a perseverar e lutar pelos meus objetivos.
- A minha orientadora Prof^a Lígia Peçanha.
- A minha co-orientadora Prof^a Luciana Arruda.
- Um agradecimento especial aos não menos fundamentais para essa dissertação, Débora Decote-Ricardo, e ao Sidney Gomes da Costa.
- A todos os alunos do laboratório de Imunoparasitologia e do laboratório LGIIVIR.
- A Prof^a Maria Belio pela revisão dessa dissertação.
- A banca avaliadora pela disponibilidade e pelo tempo a mim concedido.
- A Dr^a Márcia Piuvezam por gentilmente ceder a warifteína purificada.
- Ao Dr^o Ulisses Lopes e ao doutorando Paulo Redner por colaborarem com nossos dados com os experimentos de dosagem de NFκB.
- Ao Dr^o Alberto Nóbrega por gentilmente ceder os estímulos Pam₃Cys e oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG.
- A todos os alunos e professores do Departamento de Imunologia do IMPPG, que sempre me ensinaram e auxiliaram quando precisei de ajuda.
- Aos meus amigos da vida inteira, que sempre presentes me permitiram relaxar e “desestressar” da rotina do laboratório.
- Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Dedico a minha Família e Amigos,

Juliana Dutra Barbosa da Rocha

Modulação da Atividade de Linfócitos B pela warifteína isolada de
Cissampelos sympodialis.

Orientador: Ligia Maria torres Peçanha

Resumo da Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências Biológicas.

O extrato hidroalcoólico da folha de *Cissampelos sympodialis* (CS) apresenta ação inibitória sobre o funcionamento de células B e T. A warifteína é o alcalóide majoritário presente neste extrato. No presente estudo investigamos se a warifteína inibiria as funções da célula B e caracterizamos seu mecanismo de ação. Células B esplênicas murinas purificadas foram estimuladas ou não com ligantes de receptores tipo-Toll (LPS, Pam₃Cys e oligodeoxinucleotídeos com sequências CpG) ou anti-IgM. Warifteína inibiu a resposta proliferativa e a secreção de imunoglobulinas induzidas por esses estímulos. Estudos cinéticos demonstraram que a warifteína bloqueia a função de linfócitos B mesmo se adicionadas 24h após o início da cultura. A warifteína também inibiu a resposta proliferativa induzida por acetato mirístico de forbol (PMA) e o ionóforo de cálcio A23187. A secreção de IgM *in vitro* (induzida tanto por LPS quanto por Pam₃Cys), e de IgM e IgG *in vivo* (induzida pelo antígeno TI-2 TNP-ficoll) foram inibidas pela warifteína. Foram investigadas, ainda, as vias de sinalização bloqueadas pela warifteína. Nenhuma diferença foi observada nos níveis de fosforilação de proteínas em resíduos de tirosinas. A warifteína inibiu o influxo de cálcio induzido por anticorpo anti-IgM. Os níveis de p-ERK foram reduzidos pela adição de warifteína a culturas de células B estimuladas por LPS. A warifteína também diminuiu os níveis intranucleares de NFκB. Observou-se que a warifteína induz um aumento nos níveis intracelulares de cAMP, um conhecido mensageiro que inibe a ativação da célula B. Nossos resultados sugerem que a warifteína é um potente inibidor da resposta da célula B *in vitro* e *in vivo* e seu efeito é

mediado pela redução da fosforilação de ERK e da translocação do NF κ B ao núcleo, provavelmente consequentes de um aumento nos níveis de cAMP. Esses achados indicam que a warifteína pode ser uma ferramenta importante para estudos de sinalização em células B.

Palavras-chave: Warifteína, Linfócitos B, cAMP, *Cissampelos sympodialis*, Transdução de sinal, Receptores tipo Toll.

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2009

Juliana Dutra Barbosa da Rocha

Modulação da Atividade de linfócitos B pela Warifteína isolada de
Cissampelos sympodialis.

Orientador: Lígia Maria Torres Pecanha

Resumo da Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências Biológicas.

The hydroalcoholic leaf extract from *Cissampelos sympodialis* (CS) was previously shown to inhibit both T and B cell function. Warifteine is the major alkaloid found in the CS extract. In the present study we investigated whether warifteine would inhibit B cell function and characterized its mechanism of action. Splenic purified murine B cells were stimulated with either Toll like receptor ligands (LPS, Pam₃Cys, and oligodeoxynucleotides with CpG sequences) or anti-mouse IgM. Warifteine inhibited both proliferative response and immunoglobulin secretion induced by these stimuli. Kinetics studies demonstrated that warifteine blocked B cell function even when added 24h after the beginning of the culture. Warifteine also inhibited the proliferative response induced by Phorbol Myristate Acetate (PMA) and the calcium ionophore A23187. *In vitro* IgM production (induced by both LPS and Pam₃Cys) and *in vivo* TI-2 antigen (TNP-ficoll)-induced IgM and IgG production were both inhibited by warifteine. We further investigated the signaling pathways blocked by warifteine. No differences were observed when the total levels of protein-associated phosphotyrosine were analyzed. We observed that warifteine inhibited anti-IgM-induced the calcium influx. The levels of p-ERK were decreased in LPS-stimulated and warifteine-treated cultures. This substance also diminished the nuclear levels of NFκB. The alkaloid induced an increase in intracellular cAMP levels, an intracellular messenger that was shown to inhibit B cell activation. Our results suggested that warifteine was a potent inhibitor of B cell response both *in vivo* and *in vitro* and this effect was mediated by a reduction in p-ERK levels and

inhibition of NF κ B nuclear localization. These alterations were, probably, due to an increase in intracellular cAMP concentrations. These findings indicate that warifteine could be a useful tool for studying B cell signaling.

Key words: Warifteine, B Lymphocytes, cAMP, *Cissampelos sympodialis*, Signal transduction, Toll-like receptors.

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2009

ÍNDICE

RESUMO -----	vii
ABSTRACT -----	ix
ABREVIATURAS -----	xiv
1. INTRODUÇÃO -----	1
1.1)Produtos Naturais -----	1
1.1.1) Relevância e viabilidade do estudo de compostos derivados de plantas medicinais.-----	1
1.1.2) Alcaloides e suas funções biológicas -----	1
1.1.3) <i>Cissampelos sympodialis</i> -----	3
1.1.4) Warifteína -----	5
1.2) Mecanismos de Ativação da célula B -----	6
1.2.1) Resposta a antígenos T – dependentes -----	7
1.2.1.1) Ligação ao CD40 -----	9
1.2.1.2) Citocinas -----	11
1. 2. 2) Resposta de linfócitos B a antígenos T–independentes -----	12
1.2.2.1) Ativação de linfócitos B por antígenos T – independentes tipo 1 ---	12
1.2.2.2) Mecanismo de ativação de linfócitos B por antígeno T – independentes tipo 2 -----	15
1.3) Linfócitos B e cAMP -----	16
2. OBJETIVOS -----	19
3. OBJETIVOS ESPECIFICOS -----	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS -----	20
4.1) Reagentes -----	20
4.2) Purificação da warifteína-----	20

4.3) Animais -----	21
4.4) Isolamento de linfócitos B murinos e preparo das culturas -----	21
4.5) Linhagens celulares -----	22
4.6) Verificação da toxicidade da warifteína -----	22
4.7) Medida da resposta proliferativa de linfócitos B-----	23
4.8) Avaliação da secreção de Imunoglobulinas induzida por moléculas ativadoras policlonais <i>in vitro</i> -----	23
4.9) Avaliação da secreção de imunoglobulinas antígeno-específicas em soro de animais imunizados -----	24
4.10) Dosagem de cálcio-----	25
4.11) Análise da inibição da fosforilação total e de proteínas da família ERK por Western Blotting -----	25
4.12) Dosagem de NFκB em extratos nucleares por EMSA -----	27
4.13) Dosagem de Adenosina monofosfato cíclico (cAMP) -----	27
4.14) Análise estatística -----	28
5. RESULTADOS -----	29
5.1) Warifteína não apresenta efeito citotóxico sobre a célula B -----	29
5.2) Warifteína inibe a proliferação celular induzida por diversos ativadores policlonais da célula B -----	29
5.3) Efeito inibitório da warifteína ocorre mesmo em etapas mais tardias do processo de ativação da célula B -----	30
5.4) Warifteína reduziu a secreção de imunoglobulinas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ---	30
5.5) Efeito inibitório da warifteína ocorre mesmo quando PMA e A23187 são adicionados à cultura de linfócitos B -----	31
5.7) Warifteína bloqueia o influxo de cálcio em linfócitos B murinos estimulados por anti-IgM -----	31
5.8) Warifteína não altera o padrão de fosforilação total de células B, porém inibe a fosforilação da proteína ERK presentes em linfócitos B tratados e estimulados por LPS -----	32

5.9) Redução na concentração de NFκB no núcleo de células B estimuladas com LPS e tratadas com warifteína-----	32
5.10) Warifteína induz aumento na concentração intracelular de cAMP -----	32
6. FIGURAS -----	33
7. DISCUSSÃO -----	47
8. COLCLUSÕES -----	54
9. REFERÊNCIAS -----	56
10. ANEXOS _____	64

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
AFL	Fração aquosa do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> (“Aqueous fraction from leaf”)
AP-1	Proteína ativadora 1 (“activator protein 1”)
BCR	Receptor para antígenos da célula B
cAMP	Adenosina 3',5' monofosfato cíclica
CD80	B7.1
CD86	B7.2
cre	Elementos responsivos ao cAMP (“cAMP response elements”)
CREB	Proteínas que se ligam ao cre (“cre binding protein”)
Csk	Src quinase que fosforila resíduos carboxi-terminais (“carboxi src kinase”)
EPAC	Fator de troca de nucleotídeo guanina responsivo ao cAMP (“cAMP responsive guanine nucleotide exchange factor”)
ERK	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares (“extracellular signal-regulated kinase”)
DAG	Diacilglicerol
GEF	Fatores de troca de nucleotídeos guanina (“guanine-nucleotide exchange factors”)
ICER	Repressor precoce induzido pelo cAMP (“inducible cAMP early repressor”)
INF-γ	Interferon gama
IκB	Molécula inibidora do NF κ B
IP₃	Inositol-trifosfato
IRAK	Receptor de IL-1 associado a proteínas tirosinas quinases (“IL-1 receptor associated protein kinases”)
ITAM	Padrões de ativação de imunoreceptores com resíduos de tirosina (“immunoreceptor tyrosine-based activation motifs”)

JNK	Proteína quinase da porção N-terminal de Jun (“Jun N-terminal kinase”)
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos (“Mitogen-activated protein kinases”)
MyD88	Proteína adaptadora associada aos TLR
NF-AT	Fator nuclear de ativação da célula T ativada. (“nuclear factor of activated T cell”)
NFκB	Fator nuclear κB
Pam₃Cys	Ligante de TLR2
PDE	Fosfodiesterase
PGE2	Prostaglandina E2
PIP₂	Fostatidil inositol bifosfato
PLC	Fosfolipase C
PMA	Acetato miristático forbólico
PKA	Proteína quinase dependente de cAMP (“Protein kinase A”)
PKC	Proteína quinase C (“Protein kinase C”)
PKR	Proteína quinase R (“Protein kinase R”)
SH	Domínio com homologia as Src quinases (“Src homology domain”)
Src quinases	Família de proteínas com atividade de quinase de tirosinas identificada inicialmente como uma proteína derivada do vírus de Sarcoma de Rous (RSV), proteíam essa derivada da proteína c-Src de mamíferos.
Stat	Proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição (“Signal transduction and activators of transcription”)
TCR	Receptor da célula T
TIR	“Toll-IL-1 receptor”
TLR	Receptores tipo-toll (“Toll-like receptors”)
TRAFF	Fatores associados aos receptores de TNF (“TNF receptors-associated factors”)

1. INTRODUÇÃO

1.1) Produtos Naturais

1.1.1) Relevância e viabilidade do estudo de compostos derivados de plantas medicinais.

Segundo um levantamento realizado pelo órgão norte-americano “National Institutes of Health” (NIH), estima-se que oitenta por cento da população mundial utiliza plantas medicinais como forma de terapia primária (Schuster, 2001).

Produtos naturais e seus derivados têm sido tradicionalmente utilizados pela medicina como fonte para produção de diversos fármacos. Ao mesmo tempo, o seu estudo gera uma enorme lucratividade para as importantes indústrias farmacêuticas (Kaul, 1998).

Um levantamento realizado em 1985 mostrou que vinte e cinco por cento dos compostos ativos presentes nos fármacos eram provenientes de plantas (Balandrin *et al*, 1985; Halbeirstein, 2005). Dez anos mais tarde, vinte mil plantas medicinais foram avaliadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), entretanto, desses estudos, somente 250 investigavam quais compostos químicos ativos estavam presentes nessas plantas (Naranjo, 2003). Um estudo mais recente revelou que cinquenta por cento dos fármacos mais vendidos pela indústria farmacêutica possuíam compostos ativos derivados de plantas (Schuster, 2001).

Esses fatos associados indicam uma necessidade no fomento das pesquisas na área de isolamento de compostos ativos e do estudo da função dessas substâncias presentes em plantas medicinais, normalmente já utilizadas pela medicina popular.

1.1.2) Alcalóides e suas funções biológicas.

Alcalóides são um grande grupo de metabólitos secundários que contém nitrogênio em sua estrutura (Pelletier, 1982). Originalmente o termo alcalóide estava associado a moléculas farmacologicamente ativas derivadas de metabólitos secundários de plantas. Atualmente, o termo ganhou uma utilização mais geral e se refere a moléculas nitrogenadas de origem natural que contém nitrogênio em sua estrutura, com exceção dos aminoácidos simples, proteínas e substâncias que contém origem policetídeas (como

alguns antibióticos aminoglicosídeos). Assim eles são divididos em diferentes grupos de acordo com o aminoácido que os originou (Pelletier, 1982). Eles podem ser derivados de plantas, insetos, micorganismos (como fungos e bactérias) e até mesmo mamíferos (Kutcham, 1995).

A palavra alcalóide deriva da palavra árabe *al-quali* que significa o nome da planta da qual a soda foi primeiramente extraída. O primeiro alcalóide isolado foi a morfina, derivada da planta *Papaver somniferum* em 1806 por Sertüner (Kutcham, 1995).

Alcalóides bisbenzilisoquinolínicos são formados a partir dos aminoácidos tirosina ou fenilalanina (Pelletier, 1982). São moléculas básicas heterocíclicas, que possuem a molécula de nitrogênio em sua estrutura. Em sua grande maioria são metabólitos secundários de plantas e a eles são atribuídas diferentes funções biológicas (Pelletier, 1982). Eles representam o maior grupo de compostos dentro da família dos alcalóides isoquinolínicos com mais de 350 membros descritos (Keseru & Nógradi, 1995).

De acordo com a literatura, diferentes alcalóides bisbenzilisoquinolínicos são conhecidos por possuírem atividades antiinflamatórias (Ferrante *et al*, 1990), anti-proliferativas (Yoo *et al*, 2002) e por inibir a invasão e o crescimento de diferentes parasitos, como *Trypanosoma cruzi* (Fournet *et al*, 2000), *Leishmania* sp. (Fournet *et al*, 1993) e *Plasmodium* sp. (Dreyfuss *et al*, 1987).

Dentre os diferentes alcalóides bisbenzilisoquinolínicos já conhecidos pela comunidade científica podemos citar a tetrandrina, a cepharanthina, a daphnolina, a andrina, a linacina, a pheanthina, entre tantos outros com atividade biológica comprovada (Fournet *et al*, 1997; Fournet *et al*, 2002).

A tetrandrina é um dos alcalóides bisbenzilisoquinolínicos mais estudados. Ela é isolada da raiz da planta *Stephania tetrandra* S Moore, que é amplamente utilizada pela Medicina Tradicional Chinesa (Ferrante *et al*, 1990). Além de apresentar ações anti-inflamatórias, anti-proliferativa, e anti-parasitaria já comprovadas (Ferrante *et al*, 1990; Fournet *et al*, 2000; Yoo *et al*, 2002). Dentre os alcalóides bisbenzilisoquinolínicos, ela é uma das poucas substâncias a possuírem seu mecanismo de ação já descrito. Acredita-se que ela possua diferentes alvos moleculares de acordo com sua atividade esperada. Com relação à atividade parasiticida ela atua bloqueando canais de cálcio que impede a entrada

do parasito (Felix, King & Shevell, 1992). Já sobre o mecanismo anti-inflamatório observou-se uma ação pleiotrópica, com a substância inibindo a secreção de TNF- α , a proliferação celular, a produção de espécies reativas de oxigênio e a translocação do fator de transcrição NF κ B (Chem *et al*, 1997).

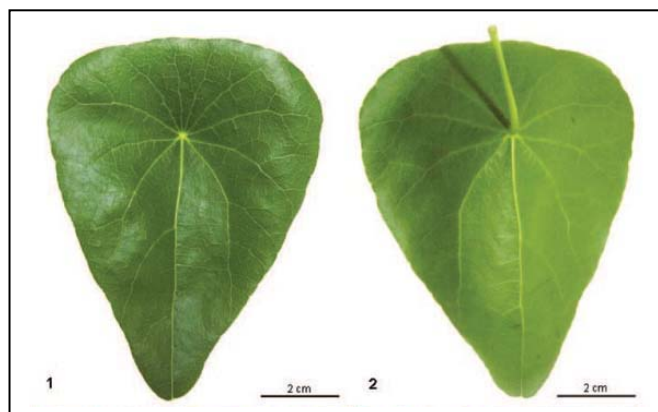
Nesta dissertação avaliamos o efeito de um derivado de um produto natural, a warifteína, que é um alcalóide bisbenzilisoquinolínico, sobre os linfócitos B e investigamos o seu mecanismo de ação. Esse alcalóide é isolado da planta *Cissampelos sympodialis* da família Menispermaceae (Rodhes, 1975).

1.1.3) *Cissampelos sympodialis*

Já foram caracterizadas 19 espécies do gênero *Cissampelos* e 9 destas são encontradas no Brasil (Rodhes, 1975). Uma das espécies, *Cissampelos sympodialis* Eich (Menispermaceae), popularmente conhecida por Milona (ou também conhecida por: jarrinha, orelha de onça ou abuteira), é encontrada no Nordeste e Sudeste do Brasil e o chá da raiz desta planta é largamente usado na medicina popular para o tratamento de doenças de caráter inflamatório e alérgico (Correa, 1984). Abaixo uma foto da folha da *Cissampelos sympodialis* (Esquema 1).

Diversos trabalhos demonstraram o efeito da fração aquosa do extrato hidroalcoólico (AFL) de *Cissampelos sympodialis* sobre musculatura lisa. Foi observada a indução do relaxamento da musculatura lisa brônquica e inibição de broncoespasmo induzido por histamina em cobaios sensibilizados por ovoalbumina (Thomas *et al*, 1997a). Além disso, foi demonstrado um aumento no número de células mononucleares presentes no lavado broncoalveolar de animais tratados com a AFL (Ferreira *et al*, 1996).

Em relação ao mecanismo de ação desta substância, foi demonstrado que a AFL aumenta os níveis intracelulares de cAMP em células musculares traqueais e foi observada a inibição de fosfodiesterases (PDE) IV e V (enzimas que degradam o cAMP) em musculatura pulmonar de cobaios. Assim, uma possibilidade é que a AFL atue inibindo essas enzimas e aumentando os níveis intracelulares desse mensageiro secundário. (Thomas *et al*, 1997b).



Esquema 1. Folha da *Cissampelos sympodialis* (Porto *et al*, 2008).

A AFL age em células que participam da resposta imunológica, esta ação pode estar relacionada ao seu efeito antiinflamatório. O extrato inibe a desgranulação induzida por Formyl-Met-Phe-Pro (fMLP) em neutrófilos isolados de sangue periférico. Este efeito decorre do aumento de cAMP através da ativação da enzima PKA (Thomas, Selak, & Henson, 1999). Além disso, a AFL inibe, ainda, a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos (Batista-Lima *et al*, 2001). O extrato possui propriedades antialérgicas e foi observado no modelo experimental de asma que esta atividade decorre da inibição da produção de leucotrienos e do bloqueio da migração de eosinófilos (Bezzerra-Santos *et al*, 2006). Também foi observado que a AFL inibe a atividade microbicida de macrófagos (Alexandre-Moreira *et al*, 2003).

A AFL isolada de *C. sympodialis* apresenta, ainda, ação sobre células linfóides. Já foi descrito que este extrato inibe *in vitro* a resposta proliferativa de células T e aumenta a produção das citocinas IL-10 e IL-4 em culturas estimuladas por concanavalina A (Piuvezam, Peçanha & Thomas, 1999). Da mesma maneira, foi descrito que a AFL diminui os níveis de IgE e induz a secreção da citocina interferon γ (INF γ) em camundongos sensibilizados por ovoalbumina (Bezzerra-Santos *et al*, 2004). Estes achados indicam que no modelo de ativação de linfócitos T *in vitro*, a AFL induziria aumento da produção da citocina Th2 IL-4 e no modelo de alergia *in vivo* seria aumentada a produção de INF γ . Como estas citocinas apresentam efeito antagônico, é necessário um estudo mais aprofundado para esclarecer o mecanismo de ação anti-

alérgica desse extrato. Porém vale ressaltar que os modelos experimentais utilizados para a avaliação desses aspectos forem diferentes e que isso poderia justificar esses diferentes efeitos da AFL.

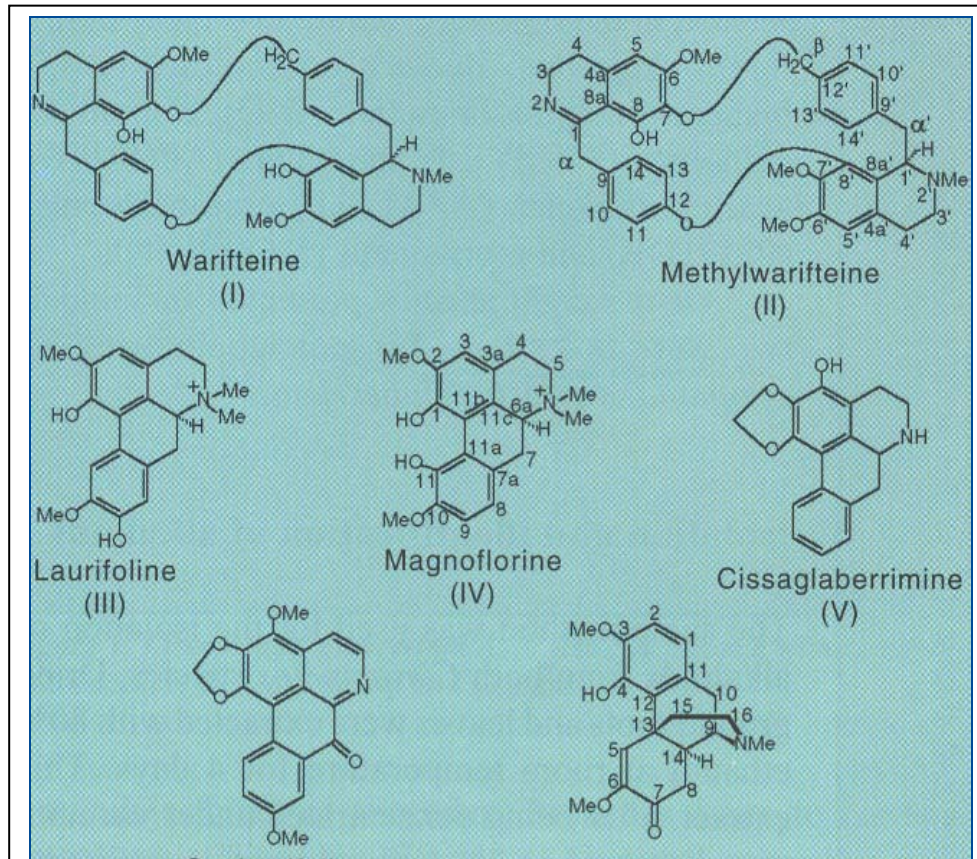
Em relação ao efeito da AFL na resposta de linfócitos B, foi observado que este extrato inibe a resposta proliferativa da célula B estimulada por LPS, anti-delta-dextrana e anti-IgM, entretanto, não foi observada inibição da resposta proliferativa quando células B ativadas eram previamente tratadas com anticorpo anti-MHC de classe II (Alexandre-Moreira, Piuvezam & Peçanha, 2003). Foi observada, ainda, neste mesmo trabalho, a inibição da secreção de imunoglobulinas quando a AFL era adicionada a culturas de linfócitos B de animais infectados com *Trypanossoma cruzi*. A AFL induz em células B um aumento no nível de cAMP (Alexandre-Moreira, Piuvezam & Peçanha, 2003). Esse fato, em conjunto com os dados citados anteriormente em outros modelos, pode indicar que o aumento da produção de cAMP poderia estar relacionado com o mecanismo de ação da AFL.

1.1.4) Warifteína

Estudos fitoquímicos da fração hidroalcoólica da AFL culminaram com o isolamento de alguns alcalóides: warifteína, metilwarifteína, milonina, laurofolina, lirioidenina e roramina (Lira *et al*, 2002).

A warifteína (estrutura mostrada no esquema 2) é um alcalóide terciário do tipo bisbenzilisoquinolínico e é o alcalóide majoritário isolado tanto da raiz quanto das folhas da espécie *Cissampelos sympodialis* (Barbosa-Filho, Agra & Thomas, 1997)

Já foi descrito que a warifteína apresenta ação espasmolítica sobre músculo cardíaco, traquéia e útero de cobaias. Além disso, foi observado que a warifteína inibiria diversos processos que regulam a liberação intracelular de cálcio (Freitas *et al*, 1996). Foi sugerido que essa diminuição na liberação de cálcio decorreria de um aumento intracelular de nucleotídeos cíclicos como a adenosina monofosfato cíclica (cAMP), e que esse acúmulo seria decorrente de uma ação inibitória da warifteína sobre as fosfodiesterases (Thomas *et al*, 1997b; Thorphy, 1994). Estudo de citotoxicidade da warifteína em linhagens de hepatócitos e fibroblastos mostram que o IC₅₀ da warifteína varia entre 10 µM e 35 µM (Melo *et al*, 2003).



Esquema 2. Estrutura química dos diferentes alcalóides isolados da folha da *Cissampelos sympodialis* (Barbosa-Filho *et al*, 1997).

Recentemente, foram observadas propriedades antialérgicas desse alcalóide, e esta atividade seria decorrente da inibição da produção de leucotrienos e do bloqueio da função de eosinófilos em modelos de asma experimentais (Bezzerra-Santos *et al*, 2006). Também foi observado que o tratamento com a warifteína, em animais sensibilizados por ovoalbumina, inibe choque anafilático e diminui os níveis séricos de IgE. Além disso, foi observado que a warifteína inibe a proliferação de leucócitos específicos para ovoalbumina nesse sistema; indicando que essa substância possui ação inibitória marcante mesmo em células pré-ativadas (Costa *et al*, 2008).

1. 2) Mecanismos de Ativação da célula B

Células B maduras podem ser ativadas por diferentes mecanismos. Esta ativação pode decorrer do contato com o linfócito T ou ser consequência da ligação de moléculas a diferentes proteínas da superfície da célula B. Após a ativação celular induzida pelo

contato com o antígeno, a célula passa por um processo de divisão celular e de diferenciação em plasmócitos (células secretoras de imunoglobulinas) ou de diferenciação em células de memória (Parker, 1993).

No processo de ativação T-dependente sinais seriam dados pela ligação do antígeno a imunoglobulina (IgM ou IgD) de superfície (conhecido como receptor da célula B - BCR), pela interação entre o CD40 e o seu ligante e por sinais dados por citocinas como IL-4 (Parker, 1993; Bishop & Hortager, 2003). No processo de ativação T-independente, os sinais seriam dados pela ligação a receptores tipo toll (resposta T-independente tipo 1) ou pela ligação cruzada do BCR na presença de diferentes sinais acessórios (resposta T-independente tipo 2) (Mond *et al*, 1995; Ruprecht *et al*, 2006).

1.2.1) Resposta a antígenos T – dependentes.

A primeira etapa da resposta T-dependente ocorre a partir da internalização do antígeno após seu contato com o BCR. Esta interação do antígeno com o seu receptor específico dispara uma série de sinais intracelulares (Cambier & Julies, 1987).

A ligação do antígeno ao BCR leva a uma agregação destas moléculas. A partir dessa agregação, resíduos de tirosina presentes na porção intracelular das moléculas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, que estão associadas a este receptor, são fosforilados (Reth & Wienands, 1997). Após esta fosforilação, estas moléculas atuam como sítios de ligação para uma série de proteínas de sinalização. As moléculas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ são essenciais para a sinalização, já que o BCR não apresenta porção intracitoplasmática. A fosforilação dos resíduos de tirosina (presentes em seqüências de aminoácidos denominadas ITAM) é mediada por proteínas quinases de tirosinas da família Src (Cambier, 1995). Após a ligação das proteínas da família Src na porção fosforilada de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, ocorre o recrutamento da proteína tirosina quinase da família Syk, elemento chave do processo de sinalização (Kurosaki, 1999).

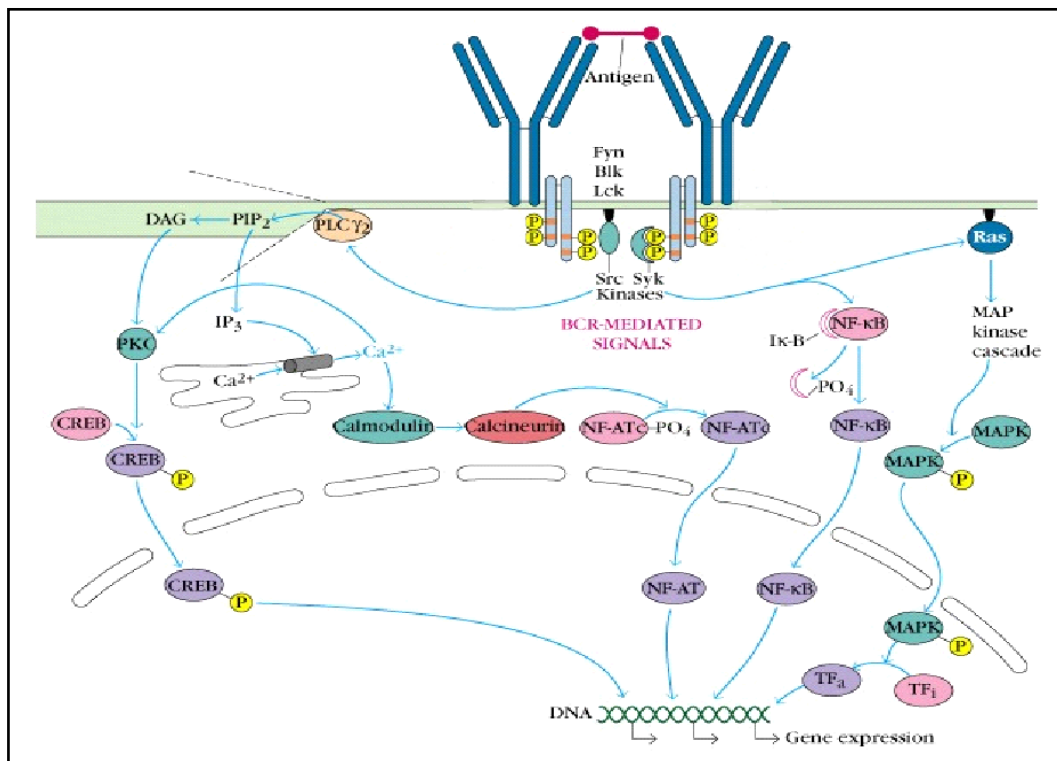
A esta sinalização inicial seguem-se uma série de sinais em cascata que culminam com a ativação de diversos fatores de transcrição. Uma das proteínas ativadas após a sinalização inicial mediada pela ativação de proteínas quinases de tirosinas é a enzima fosfolipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$). Esta enzima catalisa a quebra do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4, 5 difosfato (PIP_2) em inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) e

diacilglicerol (DAG). O DAG participa no processo de ativação da proteína quinase C (PKC) o que tem, provavelmente, como uma das conseqüências, a translocação do fator de transcrição NFκB para o núcleo. O IP₃ atua induzindo a liberação de cálcio do retículo endoplasmático. Este aumento de cálcio intracelular vai induzir a desfosforilação do fator nuclear NFAT pela Calcineurina, que é, assim, induzido a translocar-se para o núcleo (De Franco, 1994; Yamamura, 1998; Campbell, 1999).

A sinalização inicial leva, ainda, a ativação de duas vias de MAP quinases (MAPK - “mitogen activated protein kinase”). Uma destas vias é iniciada pela fosforilação da proteína trocadora de nucleotídeos (GEF) Vav, que leva a ativação da proteína G de baixo peso molecular Ras. A outra via é iniciada pela GEF denominada Sos. Essas GEF podem se ligar, respectivamente, a dois tipos de moléculas adaptadoras Rac (Crespo *et al*, 1997) e Ras (Boriack-Sjodin *et al*, 1998). Essa ativação leva a estimulação das quinases ativadas por mitógenos (ERK e JNK) e a conseqüente formação do fator de transcrição AP-1. Um modelo esquemático é apresentado no Esquema 3.

Acredita-se que o complexo antígeno-BCR seja internalizado após a ligação do antígeno e que este processo seja decorrente da ligação cruzada do antígeno ao BCR e da formação de “lipid-rafts” (porções de membrana ricas em colesterol e esfingolipídios) associados à clatrin (Ma *et al*, 2004; Stoddart *et al*, 2002). A utilização de clatrin e a formação dos “lipid-rafts”, no entanto, é ainda especulativa e não é amplamente aceita, já que alguns estudos demonstraram a internalização direta desse complexo sem a formação desses “lipid-rafts” (Chung, Bawmeister & Monroe, 2001; Putnam *et al*, 2003).

O sinal dado pela ligação do antígeno ao BCR é amplificado pelo complexo co-receptor formado pelas proteínas CD19, CD21 (receptor da molécula C3d do sistema complemento) e CD81. Acredita-se que a ligação do C3d a esse complexo amplifique a ativação induzida pela ligação ao BCR. Provavelmente, a sinalização se inicia pela ligação de CD3d acoplado à molécula de antígeno ao CD21 e se propaga via CD19, já que essa molécula é a única que possui cauda intracitoplasmática, sendo, assim, a única capaz de transduzir sinalização. O papel importante desta molécula na resposta a antígenos foi demonstrado através de estudos que demonstraram que animais deficientes de C3 apresentavam resposta deficiente a antígenos (Toapanta *et al*, 2006).



Esquema 3. Modelo de sinalização após ligação do antígeno ao BCR. A ligação ao BCR inicia a fosforilação dos resíduos ITAM presentes nas caudas intracitoplasmáticas de Ig α e Ig β por proteínas da família Src. A partir desse processo, as diversas vias de sinalização indicadas (ativação de PLC γ , PKC, via da calcineurina, via das MAP quinases e migração de NF κ B para o núcleo) são induzidas (figura retirada de Goldsby *et al*, 2000).

1.2.1.1) Ligação ao CD40.

Após a ligação de antígenos protéicos ao BCR essas moléculas são internalizadas, processadas e apresentadas via MHC de classe II pela célula B. O complexo peptídeo-MHC de classe II liga ao TCR (receptor da célula T) e ocorre interação entre moléculas de superfície da célula B e moléculas acessórias presentes na célula T (Parker *et al*, 1993).

O CD40 é uma molécula de função crucial no processo de ativação de linfócitos B, a ligação desta ao seu receptor (CD154) induz a entrada em ciclo celular (Bishop & Hortager, 2003). Esta molécula está presente em outros tipos celulares, entretanto, seu papel biológico foi primeiramente investigado nos linfócitos B (Bishop & Hortager, 2003). O CD40 é uma glicoproteína transmembrana de 48 KDa da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). O CD40 liga ao CD154, uma proteína de 30 KDa expressa na membrana de células T ativadas (Klaus *et al*, 1997).

Por muito tempo ficou desconhecido o ligante da molécula CD40, e sua exata função nas células do sistema imune. Já era sabido no final da década de 1980 e início da década de 1990, que a adição *in vitro* anticorpo anti-CD40 associado à citocina IL-4, fazia com que a célula B proliferasse e que essa proliferação era mantida na presença desses estímulos (Gordon, 1995). Porém não se sabia ao certo quem seria a fonte fisiológica desse ligante, nem qual o papel dessa ligação na sobrevivência, desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos B e das outras células que o expressavam (Banchereau *et al*, 1993). Entretanto estudos de mapeamento genético demonstraram que pacientes que sofriam de diferentes doenças genéticas como agamaglobulinemia associada ao cromossoma X (X-linked agamaglobulinemia), síndrome de Wiskott-Aldrich, imunodeficiência severa combinada associada ao cromossoma X (X-linked severe combined immunodeficiency), síndrome linfoproliferativa associada ao cromossoma X (X-linked linfoproliferative syndrome) e síndrome de hiper-IgM associada ao cromossoma X (X-linked hiper-IgM simndrome) indicaram o caminho para o entendimento das funções da molécula de CD40 e de seu ligante (Banchereau *et al*, 1993).

Nesses estudos foi identificado que as alterações genéticas que induziam a doença estavam associadas ao gene do ligante do CD40. Assim, em modelos experimentais onde era mutada a região relaciona ao CD40L ou em modelos que nocauteavam a molécula de CD40 os animais apresentavam sintomatologia semelhante à dessas doenças. Essas estavam associadas à incapacidade de montar uma resposta imune duradoura, com presença de células de memória, produção de diferentes isotipos de imunoglobulinas e formação de centro germinativo. Assim se associou a molécula de CD40 e seu ligante ao mecanismo de ativação T-dependente dos linfócitos B (Banchereau *et al*, 1993).

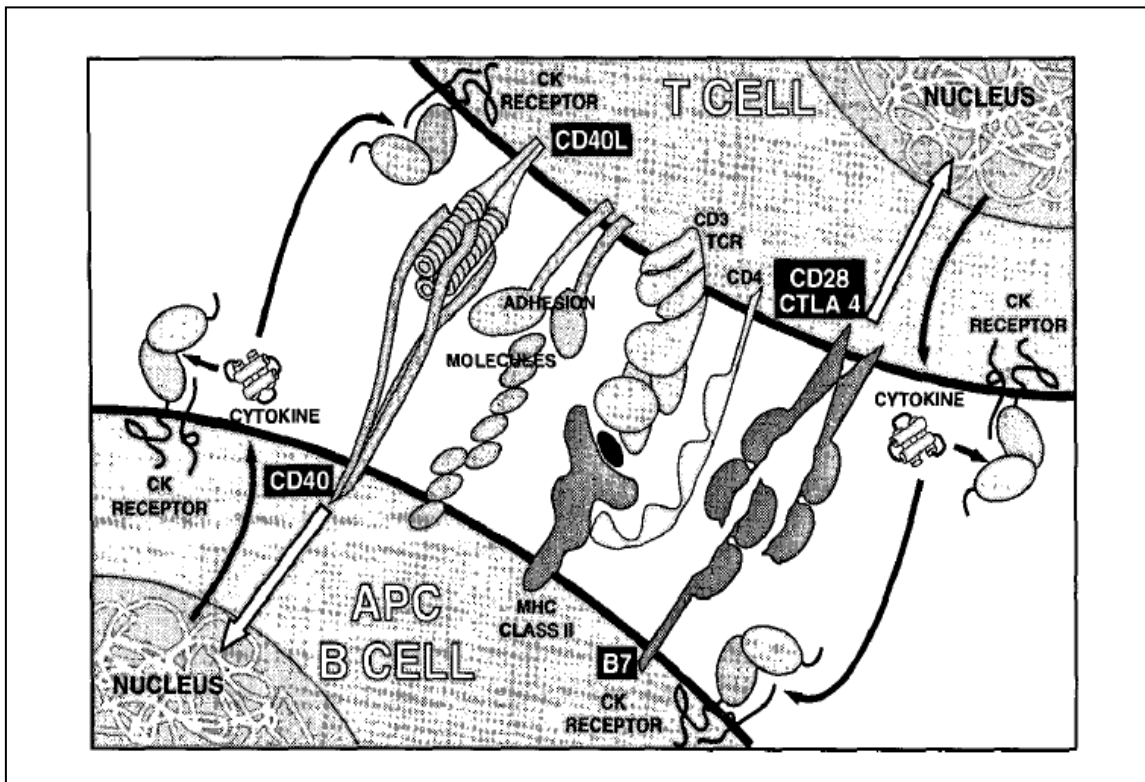
O sinal via a ligação do CD40 ao seu ligante leva a ativação de proteínas da Família TRAFF (“TNF receptor associated factors”) que são proteínas adaptadoras que fazem a ligação entre a cadeia intracitoplasmática do CD40 e diversas proteínas com atividade de proteína quinase de tirosina (por exemplo, JNK, p38, GCK, MEKK1, IKK, MAPK3) (Bishop & Hortager, 2003). A ativação destas quinases leva à ativação de fatores de transcrição como o NFκB, AP-1, NF-AT, NF-IL6, Stat6 e BSAP (Bishop &

Hortager, 2003). Acredita-se que o NFκB seja o fator principal que orquestraria as principais funções do CD40 (Hsing & Bishop, 1999; Weih *et al*, 1995). Esta ligação, entre outros efeitos já citados anteriormente, leva a modulação positiva da expressão de moléculas de CD86 (B7-2) e CD80 (B7-1), sinal este que melhora interação com a célula T (via CD28) (Bishop & Hortager, 2003; Yang & Wilson, 1996).

1.2.1.2) Citocinas.

Para que a célula B secrete imunoglobulinas e realize mudança de classe, são necessários sinais adicionais à ligação ao CD40. Este sinal adicional é dado por algumas citocinas. Entre as citocinas mais relevantes para a resposta de linfócitos B murinos estão IL-2, IL-4 e IL-5, que atuam, cada uma delas, de forma específica na célula B (Paul & Ohara, 1987; Zubler *et al*, 1987; Takatsu, 1997). A ativação T-dependente *in vivo* leva a célula B à expansão clonal, à formação do centro germinativo, à mudança de classe de imunoglobulinas e à formação de plasmócitos de longa duração (Garside *et al*, 1998).

Alguns autores acreditam que seria necessário um terceiro sinal para uma “plena” ativação T-dependente da célula B. Esse sinal seria dado pelos ligantes de receptores tipo-Toll (Passare & Medzhitov, 2006; Ruprecht & Lanzavecchia, 2006), moléculas que se acreditava estarem relacionadas exclusivamente com a resposta T independente tipo I. Esses ativadores serão descritos posteriormente. Ainda existem, no entanto, especulações sobre o papel fundamental destas moléculas na resposta T-dependente (Gavin *et al*, 2006; Nemazee *et al*, 2006). Atualmente é mais aceita a hipótese de que os sinais dados pelos receptores tipo-toll seriam complementares, mas não fundamentais. Eles atuariam amplificando a resposta humoral (Meyer-Bahlburg, Khim & Rawlings, 2007). Abaixo um modelo do mecanismo molecular associado a resposta T-dependente (Esquema 4).



Esquema 4. Mecanismo molecular associado à resposta a antígenos T-dependente. Interação entre o linfócito B e o linfócito T, ligação do MHC de classe II ao TCR; ligação do CD40 com o CD154; ligação das citocinas aos seus receptores (Banchereau *et al*, 1993).

1. 2. 2) Resposta de linfócitos B a antígenos T – independentes.

1.2.2.1) Ativação de linfócitos B por antígenos T – independentes tipo 1.

A resposta conhecida como resposta T-independente tipo I consiste na ativação direta dos linfócitos B por um grupo de moléculas de estrutura variável. Essas moléculas se caracterizam pela ligação a receptores tipo-Toll (TLR). Os receptores Toll foram primeiramente caracterizados em *Drosophila melanogaster*, e nomeados como receptores tipo-Toll (TLR – “toll-like receptor”) em mamíferos (Lemaitre *et al*, 1996). Já foram caracterizados 12 membros dessa família em mamíferos, sendo o TLR4 o primeiro a ser descrito (Akira & Takeda, 2004). Os TLR são glicoproteínas de membrana que possuem na sua cadeia intracitoplasmática um domínio rico em prolina conhecido como TIR (Toll-IL-1 receptor) que é similar à mesma porção presentes em receptores para a citocina IL-1 (Takeda e Akira, 2004).

Com o avanço dos estudos foi descoberto que esses receptores são expressos em diversas espécies e em diferentes tipos celulares (Akira & Takeda, 2004). O TLR4 é normalmente associado ao reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias Gram-negativas; o TLR9 é um receptor intracelular que reconhece oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG. O TLR2 reconhece lipoproteínas bacterianas e moléculas fúngicas como o zimozam. Esses são apenas exemplos da diversidade de moléculas reconhecidas pelos TLR (Takeda & Akira, 2004; Takeda, Kaisho & Akira; 2003).

A ligação destes estímulos em TLR expressos por linfócitos B inicia uma cascata de sinalização que culmina na expressão de fatores de transcrição que levarão à ativação policlonal (Coutinho, *et al*; 1974; Krieg, *et al*, 2002). Esse tipo de ativação normalmente leva a célula B a proliferar e secretar imunoglobulinas (que são inespecíficas na grande maioria). Esta ativação inicial é seguida por diferenciação em plasmócitos e a mudança de classe de imunoglobulinas (Jegerlehner *et al*, 2007). A expressão de citidina deaminase (AID), uma enzima fundamental para a indução de mudança de classe e hipermutação somática, também já foi descrita após a ativação via TLR (Meyer-Bahlburg & Rawlings, 2008).

A sinalização via TLR induz, ainda, a entrada da célula em ciclo celular e, conseqüentemente, a produção citocinas (como IL-6, IL-10 e interferon do tipo 1) e um aumento da expressão de marcadores de ativação como as moléculas de CD80, CD86, CD25 e MHC de classe II (Rhee & Hwang, 2000; Chiron *et al*, 2008; Vanden-Bush & Bishop, 2008; Meyer-Bahlburg & Rawlings, 2008).

Os linfócitos B expressam algumas moléculas da família dos TLR (Dassari *et al*, 2005). Entretanto, existem diferenças entre a expressão destas moléculas em células humanas e murinas. Acredita-se que essa diferença esteja relacionada a uma modificação evolutiva. Células B de camundongos expressam constitutivamente TLR4, TLR9 e TLR2 (Iwasaki & Medzhitov, 2004; Takeda & Akira, 2003), e a expressão de TLR3 é restrita a células B de zona marginal (Genestier *et al*, 2007; Gurujaram, Jacob & Pulendram, 2007).

Já as células B humanas normalmente só expressam os TLR após serem estimuladas (Bernasconi, Onai & Lanzavecchia, 2003; Bernasconi, Traggiai &

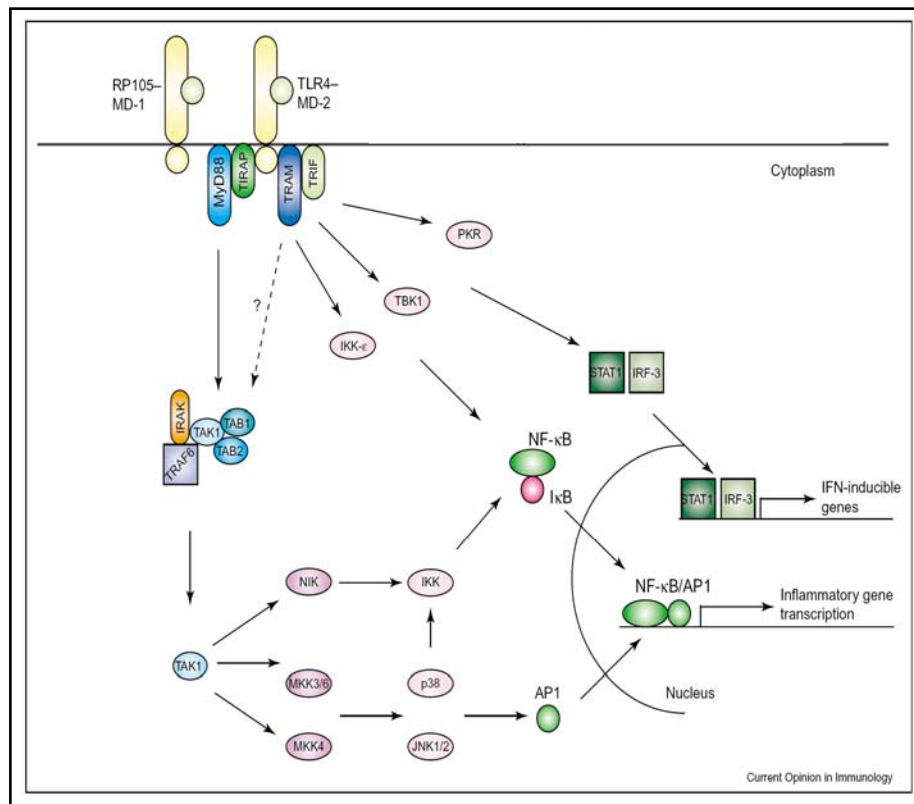
Lanzavecchia, 2002; Bourke *et al*, 2003). A presença desses receptores é maior em plasmócitos e células de memória. Os linfócitos B humanos ativados expressam os receptores TLR3, TLR6, TLR7, TLR9 e TLR10. Assim, a maioria dos estudos utilizando células B humanas investiga a resposta induzida por TLR9 (Bernasconi, Onai & Lazavecchia, 2003; Bourke *et al*, 2003). A presença da molécula adaptadora TRIF em linfócitos B humanos não foi comprovada, assim, ainda não é clara a participação dessa molécula adaptadora na ativação dos linfócitos B pelos receptores tipo-toll (Chiron *et al*, 2008).

Existe controvérsia quanto à presença do TLR4 em células B humanas (Mita *et al*, 2002). No entanto, como esse receptor é expresso constitutivamente em camundongos e apresenta importantes vias de sinalização comuns a outros ligantes de receptores tipo-toll, o TLR4 é considerado um bom modelo de estudo (Horng *et al*, 2002).

A ativação dos TLR se inicia pelos domínios TIR e, associado a esse domínio, existe uma proteína adaptadora chamada MyD88. A partir do recrutamento dessa proteína e da associação com proteínas da família IRAK (“IL-1 receptor associated protein kinases”) ocorre a expressão de fatores de transcrição.

O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) é o ligante mais conhecido e estudado da via de sinalização do TLR4. Esta molécula, após sua interação com a molécula MD2 (o qual se associa ao TLR4) induz a homodimerização do TLR4 ou a dimerização do TLR4 com a molécula de RP105 (nessa situação o LPS se associada à molécula MD1) (Peng, 2005). O RP105 também conhecido como CD180, tem estrutura muito similar ao TLR4, porém não possui o domínio TIR. Em linfócitos B de camundongos ela é capaz de induzir ativação via LPS (Chiron *et al*, 2008), porém em outros modelos celulares (células dendríticas) ele é considerado um mecanismo de regulação da ativação, já que nessas células ele não induz ativação quando associado ao LPS (Divanovic *et al*, 2007). Após a ligação ao receptor, a sinalização via TLR4 pode seguir duas vias: uma mediada pela associação das proteínas TIRAP-MyD88 (dependente de MyD88) e outra mediada por TRIF-TRAM (independente de MyD88). A via dependente de MyD88 leva a ativação de três proteínas quinases: IRAK, TRAF6 e TAK1 e tem como produto final a translocação do NFκB para o núcleo. Além disso, a proteína TAK 1 ativa a via das MAPK, levando a formação de AP-1. A via independente de MyD88, além de induzir a migração de NFκB

para o núcleo, ativa a proteína quinase R (PKR), que está envolvida na expressão de outros fatores de transcrição como STAT 1e IRF3, que estão associados a indução de genes da família do interferon (Peng, 2005). A maioria dos TLR utiliza a via de sinalização, dependente MyD88. Entretanto, já é sabido que as moléculas de TLR3, aparentemente, não utilizam essa via. Assim, durante sua ativação, não existe o recrutamento de MyD88, e sim da molécula TRIF, que também possui domínios TIR. Uma esquematização da ligação do LPS ao TLR4 esta presente no esquema 5.



Esquema 5. Sinalização do TLR4 em células B. O LPS se liga ao MD2 ou MD1, que estão associadas às moléculas TLR4 e RP105, respectivamente. Por homodimerização ou heterodimerização a cauda intracitoplasmática do TLR4 associa a molécula adaptadora MyD88 ou a proteína TRIF. Estas vias de sinalização culminam, respectivamente, na ativação dos fatores de transcrição NFκB e AP-1 ou na indução de genes da família do INF do tipo I (Adaptado de Peng, 2005).

1.2.2.2) Mecanismo de ativação de linfócitos B por antígeno T – independentes tipo 2.

Os antígenos T-independente tipo 2 são moléculas de alto peso molecular que apresentam sítios repetitivos. São exemplos dessas moléculas polissacarídeos, glicolípídeos e ácidos nucléicos (Mosier, Mond & Golding, 1977). O protótipo dos antígenos T-independentes tipo 2 são polissacarídeos de alto peso molecular que, ao se ligarem à célula B, levam à transdução de sinais e ativação direta desta célula (Mond, Lees & Snapper, 1995). Estas moléculas normalmente são grandes e multivalentes e podem induzir ligações cruzadas dos BCR e agregação destas moléculas (Mond, Lees & Snapper, 1995). Normalmente uma pequena quantidade destes antígenos é suficiente para indução de ativação, já que estas induzem uma sinalização intensa e de longa duração (Brunswick *et al*, 1988; Yamada *et al*, 1993).

A ocorrência de mudança de classe de imunoglobulina após a ativação por antígenos T-independentes tipo II depende da presença de um segundo sinal. Este sinal pode ser dado, por exemplo, por citocinas secretadas por células T e NK (Mond, Lees & Snapper, 1995). Este sinal pode ser ainda, induzido por produtos microbianos que se ligam a receptores tipo TLR (Mond, Lees & Snapper, 1995).

1.3) cAMP e o Sistema Imunológico.

O 3',5'- Monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) é um mensageiro secundário gerado a partir do ATP pelas proteínas da família da adenilato ciclase (AC) e estas moléculas são degradadas pelas proteínas da família das fosfodiesterases (PDE) (Torgersen *et al*, 2002). O cAMP pode atuar de diferentes maneiras em diferentes tipos celulares, porém somente são descritos 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), porém 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; Fuld *et al*, 2005).

Na maioria das situações o aumento dos níveis intracelulares 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, forskolin e rolipran, respectivamente, levam a inibição da proliferação células de células T e B, a inibição da atividade citotóxica de células NK e a inibição da indução de secreção de imunoglobulinas pela célula B (Muraguchi *et al*, 1984; Skalhegg *et al*, 1994; Torgersen *et al*, 1997; Irvin *et al*, 2001). Já foi demonstrado que esses efeitos seriam decorrentes do bloqueio da passagem dessas células da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Irvin *et al*, 2001).

Acredita-se que de forma fisiológica essa molécula deve estar associada à regulação fina dos processos de sinalização celular envolvidos na ativação das células do sistema imune. Diversos trabalhos descrevem vias de sinalização celular inibidas pelo aumento de cAMP como, por exemplo, as vias que culminam na formação do fator de transcrição AP-1 e na ativação dos fatores de transcrição NF-AT e NFκB (Torgersen *et al*, 2002; Skalhegg *et al*, 2005).

O cAMP atua de forma bastante incisiva na inibição das células do sistema imune e já foram demonstrados diversos níveis de atuação dessa molécula, desde a atuação sobre proteínas presentes no início da via de sinalização, até em moléculas tardias no processo de transdução de sinal. Com relação à 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,. Esta 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 (Torgersen *et al*, 2002; Skalhegg *et al*, 2005). Além disso, estudos realizados para avaliar a localização da PKA em linfócitos T, mostraram que esta proteína se co-localizava com o TCR, estando ambos os presentes em regiões ricas em colesterol e esfingolípídios (“lipid rafts”), indicando necessidade de proximidade física para que essa interação aconteça (Torgersen *et al*, 2002 e Skalhegg *et al*, 1994).

Mais recentemente, foi demonstrada a presença de uma proteína capaz de inibir a ligação dos fatores de transcrição NF-AT e NFκB ao DNA, e a expressão dessa proteína

era dependente do acúmulo de cAMP. Essa proteína é chamada de ICER (“inducible cAMP early repressor”) e faz parte da família de proteínas CREB (“cre-binding protein”), que se ligam à região cre do DNA (“cAMP response elements”). As proteínas CREB, entre elas a ICER, são dependentes da ação da PKA (Fazia *et al*, 1997; Bordor *et al*, 2001). Já foi mostrada a expressão de ICER em células do sistema imunológico (células T, NK e em menor escala linfócitos B) quando essas células eram estimuladas com agentes que levavam ao acúmulo de cAMP (Bodor *et al*, 2007).

Mais especificamente sobre os linfócitos B, foco desse estudo, o acúmulo intracelular de cAMP tem diversos efeitos. Foi observado efeito inibitório sobre a resposta proliferativa de linfócitos 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 com linfócitos T (Roper *et al*, 1994, Minguet *et al*, 2005).

A sinalização via BCR pode ser influenciada pela concentração intracelular de cAMP. Já foi descrito na literatura que o acúmulo desse nucleotídeo cíclico inibe a fosforilação do I κ B (impedindo, assim, a translocação do NF κ B ao núcleo) e a fosforilação da MAPK ERK (Minguet *et al*, 2005). Foi verificado, ainda, que a inibição da resposta de células B após ligação ao BCR estaria relacionada com modulação da ativação de PLC γ e da mobilização de cálcio e acredita-se que essa inibição seja dependente da ativação da PKA (Venkataraman *et al*, 1998). Esta molécula também é capaz de inibir a via de sinalização induzida por ligantes de receptores tipo-Toll, mais especificamente TLR4, através da diminuição da fosforilação do I κ B (Minguet *et al*, 2005).

A ação da PKA, ativada pelo cAMP, em linfócitos B, pode estar relacionada com a indução dos mecanismos pró-apoptóticos e à inibição do crescimento celular através da modulação de fatores de sobrevivência como Bcl-XL. Já 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; Smith *et al*, 2005). Por outro lado, já foi descrito que vias de sinalizações complexas como a do CD40 e do CD72 não são alteradas pelo aumento da concentração de cAMP (Minguet *et al*, 2005).

2) OBJETIVOS GERAIS

Essa dissertação de mestrado tem por objetivo geral verificar se a warifteína, alcalóide majoritário presente na fração aquosa do extrato hidroalcoólico da *Cissampelos sympodialis* (AFL), seria o composto ativo presente no mesmo e o responsável pelas ações imunomodulatórias do extrato já descritas anteriormente. Além disso, pretendemos caracterizar o mecanismo de ação desta substância utilizando como modelo os linfócitos B.

3) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a toxicidade da warifteína quando adicionada a culturas de células B primárias e em cultura de linhagens de células B humanas (DAUDI).
- Avaliar a se a warifteína possui ação inibitória sobre a proliferação de linfócitos B murinos estimulados com ligantes de TLR ou anti-IgM.
- Avaliar se a warifteína inibe a secreção de imunoglobulinas *in vivo* e *in vitro*.
- Avaliar, através de estudos cinéticos, a etapa da ativação de linfócitos B inibida pela warifteína.
- Verificar se o efeito inibitório da warifteína seria revertido pelo estímulo com acetato mirístico de forbol e A23187.
- Investigar as possíveis vias de sinalização nas quais a warifteína poderia atuar: mobilização de cálcio, fosforilação de proteínas com resíduos de tirosina, fosforilação de ERK, ativação de NFκB e indução de aumento intracelular de cAMP.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Reagentes.

Meio de Cultura RMPI 1640, soro fetal bovino e o antibiótico gentamicina (utilizado na concentração de 50 µg/ml) foram obtidos da Gibco (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). Suplementos para cultura (hepes, bicarbonato de sódio, Glutamina e β-mercaptoetanol), os reagentes acetato mirístico de forbol (PMA), ionóforo de cálcio (A23187), ligante de TLR4 (LPS extraído de *E. coli*, sorotipo (O111:B4) e o anticorpo policlonal de cabra anti-IgM de camundongo foram obtidos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA). O reagente TNP-Ficoll foi fornecido pelo Dr. Andrew Lees (Biosynexus, Rockville, MD, EUA). Ligante de TLR2 (lipopeptídeo bacteriano sintético Pam3CysSerLys4) foi obtido da EMC Micro-collections (Tubingen, Alemanha); ligante de TLR9 foi obtido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Esses dois reagentes foram gentilmente cedidos pelo Dr. Alberto Nóbrega do Departamento de Imunologia do IMPPG da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.2) Purificação da warifteína.

A warifteína foi isolada da planta *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). Ela foi gentilmente fornecida pela Dra Marcia Regina Piuvezam do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba. A planta foi crescida no Jardim Botânico do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A planta foi identificada pela Dr^a Maria de Fátima Agra (UFPB) e a espécie padrão está depositada no Herbário Lauro Pires Xavier da UFPB. A warifteína foi purificada como descrita previamente (Costa *et al*, 2008). As folhas foram desidratadas 50°C e depois pulverizadas. O extrato hidroalcoólico (AFL) foi obtido através do tratamento com solução de etanol 80% em água a 70°C por cinco dias. O material obtido foi dissolvido em ácido clorídrico (HCl) 3% e extraído diversas vezes com clorofórmio (CHCl₃). A fração aquosa obtida foi alcalinizada com hidróxido de amônio (NH₄OH) pH 9,0 e mais uma vez extraído com clorofórmio (CHCl₃). Esse extrato foi lavado com água, foi adicionado sulfato de magnésio até que o solvente evaporasse totalmente e fosse obtida a fração total de alcalóides terciários (TTA). A TTA foi purificada em uma coluna de cromatografia de alumínio eluída com hexano contendo concentrações crescentes de

clorofórmio, seguida de eluição com clorofórmio contendo concentrações crescentes de metanol e finalmente eluição com metanol. A fração eluída com clorofórmio-Metanol (CHCl₃:MeOH – 49:1) foi submetida a uma cromatografia de camada fina (TLC, com 1 mm de espessura); e a warifteína foi purificada obtendo um rendimento final de 0.031%. A identificação da warifteína foi realizada através de análise do espectro de ¹H e ¹³C por ressonância magnética nuclear espectral (NMR) e o resultado foi comparado com dados conhecidos da literatura (Costa *et al*, 2008). A warifteína isolada foi obtida com 100% de pureza em dados avaliados por NMR e espectrometria de massa (Costa *et al*, 2008).

4.3) Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade fornecidos pelo biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.4) Isolamento de linfócitos B murinos e preparo das culturas

Os linfócitos B murinos foram isolados de baço através da depleção de linfócitos T pela utilização de anticorpos que se ligam a moléculas de superfície de célula T (anti-CD4, anti-CD8 e anti-Thy). A incubação com estes anticorpos foi seguida do tratamento com anticorpo anti-cadeia *kappa* de Ig de ratos (MAR18.5) e complemento de coelho (Low Tox Rabbit Complement, Cedarlane Inc., Canadá).

Em seguida, as células B foram obtidas por fracionamento em gradiente de Percoll descontínuo (Sigma Chem Co; St Louis, MO, EUA). Para esse procedimento a solução de Percoll foi diluída em solução salina 10 vezes concentrada (NaCl 9%), na proporção 1:10 (1 mL de salina 10X + 9 mL de Percoll). Após isso, essa solução diluída de Percoll e salina (100%) foi utilizada para o preparo do gradiente descontínuo. Foram utilizadas as concentrações de 50%, 60%, 65% e 70%, diluídas em meio RPMI. Para um melhor rendimento as frações de Percoll foram mantidas a 4°C até o momento da montagem do gradiente descontínuo. Foram recolhidas as células de alta densidade (presentes entre as frações de 65 % e 70%), que representam as células B virgens.

Os linfócitos B isolados foram adicionados a placas de cultura contendo meio RPMI suplementado (com β-mercaptoetanol – 50 μM, L-glutamina - 2 μM, bicarbonato

de sódio - 2 µg/mL e Hepes – 2,4 µg/mL) contendo gentamicina (50 µg/mL) e 10% de soro fetal bovino. Estas culturas foram tratadas com diferentes doses de warifteína (0,02µM, 0,2 µM e 2 µM) e os diferentes estímulos. Todas as culturas foram realizadas em triplicata e foram incubadas em estufa de CO₂ (7%) à temperatura de 37°C.

A pureza da preparação de linfócitos B nos diferentes experimentos foi verificada periodicamente através de marcação com anticorpo anti-B220 (Bencton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), um marcador de linfócitos B. Essa variava entre 80% e 90%.

4.5) Linhagem celular

Foi utilizado o linfoma B humano DAUDI (ATCC, Rockville, MD, EUA). A linhagem DAUDI foi mantida com meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e os suplementos descritos no item anterior e incubados em estufa de CO₂ (7%) à temperatura de 37°C.

4.6) Verificação da toxicidade da warifteína.

Ensaio de toxicidade utilizaram dois protocolos diferentes: incorporação do iodeto de propídeo avaliada por citometria de fluxo e medida da viabilidade celular por exclusão do azul de Trypan.

O iodeto de propídeo (PI) é um corante vital que não é internalizado por células vivas; quando submetido a presença de um feixe de laser este composto emite fluorescência no comprimento de onda cujo máximo é 630nm. Esta fluorescência foi medida por citometria de fluxo (utilizando um FACSCalibur – Bencton & Dickinson). Esse ensaio foi realizado com células B murinas isoladas e marcadas com anticorpo anti-B220 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Bencton & Dickinson, Franklin Lake, NJ, EUA) e o iodeto de propídeo (utilizado a 2,5 µg/ml diluído em PBS; Sigma St. Louis, MO, USA) foi acrescentado no momento da leitura.

O azul de Trypan é um corante vital e assim é possível avaliar a viabilidade celular através de microscopia óptica. Para estes ensaios, foi feita cultura do linfoma B DAUDI por um período de um ou dois dias na presença ou ausência de warifteína. Após este período, foi feita contagem do número de células mortas e viáveis após a adição do

corante Azul de Trypan (utilizado na concentração de 0,1 mg/mL; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA) com o auxílio da câmara de Neubauer, através de microscopia óptica.

4.7) Medida da resposta proliferativa de linfócitos B.

A medida de proliferação celular foi realizada pela técnica de incorporação de timidina tritiada conforme previamente descrito (Brunswick *et al*,1988). Células B frescas isoladas em gradiente de percoll foram estabelecidas como descrito anteriormente e adicionadas à cultura (2×10^5 células/ poço). Após 48 horas de incubação, foi adicionado 0,5 μ Ci de timidina tritiada e as culturas foram incubadas por mais 18hs. As culturas foram recolhidas em papel de filtro de vidro Whatman, que retém o DNA. Os filtros foram lavados, secos e foi adicionado líquido de cintilação. A incorporação de timidina tritiada foi avaliada através de um espectrômetro de cintilação líquida da Beckman Coulter, modelo LS6500. Foi utilizado um minuto de contagem para cada amostra e os resultados obtidos foram expressos em contagem por minuto (CPM). Após contagem, foi obtida a média dos valores de incorporação das triplicatas e calculou-se o desvio padrão das mesmas.

4.8) Avaliação da secreção de Imunoglobulinas induzida por moléculas ativadoras policlonais *in vitro*.

Para realizar a dosagem de imunoglobulinas (IgM) presente nos sobrenadantes de culturas, células B murinas foram cultivadas (5×10^4 por poço) e tratadas ou não com os seguintes reagentes: LPS bacteriano (10 μ g/mL), Pam₃Cys (10 μ g/mL), e warifteína (0,02 μ M, 0,2 μ M e 2 μ M). Estas culturas foram incubadas por 7 dias a 37°C em presença de CO₂ a 7%.

Após a incubação, as culturas (que foram realizadas em triplicatas) foram recolhidas e foi feito um “pool” dos sobrenadantes. Estes sobrenadantes foram utilizados para a dosagem de IgM, pela técnica de ELISA “sandwich” descrita por Sapper & Paul (1987). Para a efetuação do ensaio imunoenzimático foram utilizadas placas de poliestireno de fundo chato da Corning modelo Costar 3590 (Corning, NY, EUA) que foram cobertas com anticorpo de cabra anti-IgM de camundongo (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA) (5 μ g/m) diluído em PBS (50 μ l de solução por poço).

Essas placas foram incubadas de um dia para o outro (“overnight”) e depois lavadas quatro vezes com PBS. Após isso, foi realizada uma nova incubação por 1 hora com PBS contendo 1% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) à temperatura ambiente para bloquear ligações inespecíficas. Esse bloqueio foi seguido da adição das amostras diluídas em solução de PBS contendo 1% de soro-fetal bovino (diluídas a 1:1, 1:5, 1:25, 1:125). Simultaneamente, foram diluídas e plaqueadas as diluições do padrão de IgM purificada (ICN, Biomedicals, Irvine, CA, EUA) que serviram para elaboração de uma curva padrão a ser utilizada para cálculo da concentração de imunoglobulinas presente nas amostras testadas. Após nova incubação de 6h a temperatura ambiente, foi adicionado aos poços um anticorpo secundário anti-IgM marcado com fosfatase alcalina (Southern Biotechnology Ass Inc., Birmingham, AL, EUA) diluídas em PBS contendo 1% de soro fetal bovino e as placas foram incubadas de um dia para o outro.

A ligação do anticorpo e a revelação do ensaio foi realizada pela adição do substrato cromogênico *p*- nitrofenolfosfato (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA) diluído em tampão Tris-MgCl₂ pH 9,5. Esta etapa foi seguida da medida da A₄₀₅ nm realizada em um leitor de leitor de microplacas da BIORAD (modelo 550).

4.9) Avaliação da secreção de imunoglobulinas antígeno-específicas em soro de animais imunizados.

Animais foram tratados por via intraperitoneal com 50 µg de warifteína (diluídas em 200 µL de PBS). Após uma hora da injeção, os animais foram imunizados por via endovenosa com TNP-ficoll (50 µg/animal). Os soros foram obtidos por sangramento da veia caudal nos dias 7, 14, e 21 após o tratamento/imunização. Os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais: um grupo controle, um grupo somente imunizado, um grupo somente tratado e um grupo imunizado e tratado. Títulos séricos de anticorpos contra TNP-Ficoll foram determinados por ELISA, segundo metodologia previamente descrita (Mond *et al*, 1989). Foram utilizadas placas de cloreto de polivinil Falcon Microtest III (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, EUA). As placas foram cobertas com TNP-Ficoll na dose de 50 µg/mL em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,3 (foi feita incubação de 18hs a 4°C). Após a incubação, as placas foram bloqueadas por 1h

com PBS contendo 1% de soro fetal bovino. As amostras foram adicionadas em diferentes diluições e as placas foram incubadas por 4hs à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpos secundários marcados com fosfatase alcalina (anti-IgM, IgG1 e IgG2a de camundongo, obtidos da Southern Biotech. Assoc. Inc., Birmingham, AL, EUA). A reação foi medida utilizando o substrato cromogênico para-nitrofenolfosfato (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA). A_{405} foi medida utilizando leitor de microplacas da BIORAD (modelo 550). Os títulos de anticorpos foram obtidos a partir da diluição de soro de animal tratado/imunizado que apresentava densidade óptica equivalente à leitura do soro controle como descrito por Mond *et al* (1989).

4.10) Dosagem de cálcio.

Linfócitos B purificados (2×10^7 /mL) foram incubados com Fura-2-acetoxymethyl ester (Fura-2/AM) obtido da Calbiochem (La Jolla, CA, EUA) a 37°C por 40 min em ausência de luz. As células marcadas (10^6 /mL) foram lavadas em HBBS livre de cálcio e transferidas para uma cubeta de quartzo contendo um ímã magnético. Nesse momento foi adicionado 1 μ M de cloreto de cálcio. A variação de fluorescência foi avaliada a 37°C em um espectrofluorímetro Hitachi F4500. A concentração de cálcio ligado ao Fura-2 AM foi avaliada na excitação de 340 nm e com emissão 490 nm. O $[Ca^{+2}]_i$ foi calculado como descrito anteriormente (Grynkiewicz, Poenie & Tsien, 1985).

4.11) Análise da inibição da fosforilação total e de proteínas da família ERK por Western Blotting.

Culturas de células B esplênicas foram cultivadas na concentração de $5-10 \times 10^6$ células/mL. Estas foram estimuladas com anticorpo anti-IgM por 5 minutos (nas concentrações de 20 μ g/ml e 8 μ g/ml) ou LPS (na concentração de 10 μ g/ml) e tratadas com warifteína (na concentração de 2 μ M). A warifteína foi adicionada 15 minutos antes da estimulação.

Todos esses processos ocorreram a 37°C. Imediatamente após a estimulação/tratamento, essas culturas foram lisadas com 100 μ L tampão de lise NP-40 (Gibco, Grand Island, NY, EUA), contendo 1% de inibidor de protease (Calbiochem, San

Diego, CA, EUA). O lisado foi incubado por 20 minutos a 4°C, seguido de diluição em tampão de amostra diluído 1:3 (5% Tris pH 6,8 - 0,5M, 10% de SDS, 10% de β -mercaptoetanol, 10% de glicerol e azul de bromofenol, H₂O q.s.p.).

Em seguida, foi realizado um SDS-PAGE e, após a corrida eletroforética, foi efetuada a transferência para uma membrana de PVDF (Milipore) previamente ativada com metanol e foi realizado um Western Blotting. Para a realização dessa etapa, as membranas recém transferidas foram bloqueadas com TBS-2% BSA (Sigma Chem Co, Maryland, MO, EUA) e incubadas com os anticorpos primários de um dia para o outro.

Os anticorpos utilizados como primários foram o 4G10 (esse anticorpo monoclonal foi gentilmente cedido pelo Drº John Cambier - National Jewish Institute, e é proveniente do sobrenadante do hibridoma 4G10), que reconhece moléculas de tirosina fosforiladas (usado na diluição 1:10000 do sobrenadante do hibridoma 4G10) e o IgG de camundongo anti-pERK (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), que reconhece moléculas de ERK fosforiladas (utilizado na concentração de 200 ng/mL). Também foram realizados ensaios utilizando os anticorpos anti-ERK2 utilizado na concentração de 200 ng/mL (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), como anticorpo primário, a fim de demonstrar equivalência nas concentrações de proteínas utilizadas nas diferentes amostras carregadas nos géis. Nesses experimentos o mesmo gel que foi marcado com o anticorpo fosforilado foi utilizado para a marcação com a forma não fosforilada da proteína.

Após lavagem com TBS Tween (3X) as membranas foram incubadas por 2 horas com um anticorpo anti-Ig de camundongo conjugado à peroxidase (Jackson Immunoresearch, PA, EUA) utilizado na concentração 0,2 μ g/mL. Após esta incubação, a ligação dos anticorpos foi revelada utilizando um sistema de quimiluminescência (SuperSignal, Amersham Biosisences, UK) e filme fotográfico (Kodak, EUA).

Para uma melhor avaliação quantitativa das diferenças existentes entre as amostras tratadas ou não com a warifteína, foi realizada a dosagem e normalização do resultado experimental do Western Blotting. Para isso, foi utilizado o software Scion Image (Scion Corporation, Maryland, EUA).

4.12) Dosagem de NFκB em extratos nucleares por EMSA.

Os extratos nucleares provenientes de culturas de células B murinas estimuladas por LPS (10 µg/ml) e tratadas com warifteína (2 µM) por 16hs foram obtidos como descrito anteriormente (Scheinman, *et al*, 1995). As células foram lavadas em PBS e transferidas para tubos de microcentrífuga. O “pellet” foi ressuscitado em 100 a 200 µl de tampão de lise (10 mM Tris pH 8.0, 60 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de dithiothreitol - DTT, 0,1% de NP-40, 1 mM dephenylmethylsulfonyl fluoride - PMSF) e incubado a 4°C por 5 minutos. O lisado celular foi novamente centrifugado e o “pellet” contendo o núcleo foi imediatamente ressuscitado em tampão de lise (sem NP-40) e incubado por 5 minutos a 4°C. O novo lisado foi ressuscitado em 50 µl de tampão C (contendo 20 mM HEPES pH 7.9, 0.75 mM espermidina, 0.15 mM espermina, 0.2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 20% glycerol, 1mM PMSF). Em seguida, foi adicionado a essa solução 5M de NaCl para que a molaridade final da solução ficasse em 0,4 M. Após isso, essa solução foi incubada a 4°C por 10 minutos e novamente centrifugada. O sobrenadante, contendo o lisado nuclear foi recolhido e armazenado a -80°C.

O EMSA (“Electrophoretic mobility shift assay”) foi realizado através da incubação do extrato de proteína nuclear com 40,000 cpm de ³²P associado a seqüência dupla-fita consenso de oligonucleotídeo de NFκB (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) em tampão de ligação (10 mM Hepes, pH 7.9, 4% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, and 0.1 µg BSA). Um oligonucleotídeo dupla-fita mutante (Santa Cruz Biotechnology) foi utilizado para verificar a especificidade da ligação do DNA com o NFκB. A incubação foi realizada por 30 minutos a 25°C.

O complexo proteína-DNA foi separado das seqüências livres através de um gel de poliacrilamida nativa (4%). Após secagem, este complexo foi visualizado pelo programa PhosphoImage analysis (Molecular Dynamics, Amersham).

4.13) Dosagem de adenosina monofosfato cíclico (cAMP).

Para verificar a concentração de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) presentes em culturas de células B foi utilizado o kit cAMP Enzymeimmunoassay Biotrak™ (EIA) System (dual range) (Amersham Biosciences, UK). Culturas de células

B (2×10^5 células/poço) foram isoladas no dia anterior e incubadas durante a noite a 37°C com 7% de CO_2 .

Após 24hs, as culturas foram estimuladas com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$), Rolipran (inibidor de fosfodiesterases) e Forskolin (ativador da proteína quinase A), os dois últimos gentilmente cedidos pela Dr^a Patrícia Silva (IOC, FIOCRUZ) (utilizados na concentração de $10 \mu\text{M}$). Após duas horas de incubação as células foram lisadas e foi realizado um ELISA de competição de acordo com as especificações do fabricante.

Os resultados foram obtidos através de leitura da determinação do A_{450} em leitor de microplacas e a concentração de cAMP foi determinada a partir de uma curva padrão relacionando concentrações conhecidas deste nucleotídeo cíclico.

4.14) Análises estatísticas

Foi realizado o teste *t* de *Student* para amostras não pareadas através do assistente gráfico PrimGraphPad 4. Os dados foram expressos com significância estatística quando $p \leq 0,05$.

5) RESULTADOS

5.1) Warifteína não apresenta efeito citotóxico sobre a célula B.

Inicialmente foi analisado se a warifteína teria efeito inespecífico induzindo morte celular de linfócitos B. Para isso, verificamos a presença de células não viáveis em nossas culturas.

Foi realizado um ensaio de incorporação de iodeto de Propídeo (PI) em culturas de células B murinas purificadas. As culturas foram tratadas ou não com warifteína e estimuladas ou não com LPS. Após 24hs as células foram marcadas com anticorpo anti-B220 (marcador de células B murinas), tratadas com PI e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Foi avaliada na população B220⁺ a porcentagem de células que incorporaram do iodeto de propídeo (Figura 1). Não foram observadas alterações significativas no percentual de células não viáveis quando era adicionado warifteína (nas concentrações de 0,2 e 2 μ M) a essas culturas, independente da célula estar ativada ou não.

Adicionalmente analisamos o efeito da warifteína no crescimento da linhagem tumoral DAUDI. Observamos que a adição de warifteína (em diferentes concentrações) não induz morte celular quando os números de células viáveis e não viáveis foram contadas diretamente utilizando o corante azul de Trypan (Figura 2).

5.2) Warifteína inibe a proliferação celular induzida por diversos ativadores policlonais da célula B.

Inicialmente foi investigado se a warifteína teria efeito inibitório na resposta proliferativa de linfócitos B. Foram estabelecidas culturas estimuladas com LPS e tratadas com diferentes doses de warifteína. A seguir foi feita medida da resposta proliferativa destas células. Foi observado um efeito dose-dependente. Na dose de 2 μ M, a warifteína tem efeito inibitório marcante na proliferação de linfócitos B (Figura 3).

Testamos, a seguir, se outros ativadores policlonais de linfócitos B teriam seu efeito estimulatório inibido pela warifteína. Observamos que este alcalóide, além de inibir a resposta proliferativa estimulada por LPS, inibe a resposta proliferativa induzida por outros ligantes de receptores tipo-Toll (como o ligante de TLR2 Pam3Cys e pelo ligante de TLR9, oligodeoxinucleotídeo com seqüências CpG) (Figura 4). Também foi

observada a inibição da proliferação celular quando as células foram estimuladas pela ligação direta ao BCR, através da utilização de anticorpo estimulatório anti-IgM (Figura 4).

5.3) Efeito inibitório da warifteína ocorre mesmo em etapas mais tardias do processo de ativação da célula B.

Para verificar se a warifteína estaria bloqueando etapas iniciais ou tardias da sinalização celular foram realizados estudos cinéticos para estabelecer em que etapa do processo de ativação de linfócitos B a warifteína teria efeito. Foi realizada uma cinética medindo resposta proliferativa estimulada pelo ligante de TLR4 (LPS), pelo ligante de TLR2 (PamCys3), pelo ligante de TLR9 (oligodeoxinucleotídeo com sequências CpG) e por anticorpo anti-IgM. (Figura 5). Nesse ensaio a warifteína foi adicionada no início da cultura e após 2h, 4h, 8h e 24h. O efeito inibitório da warifteína ocorreu mesmo quando esta droga era adicionada em etapas mais tardias da cultura.

5.4) A warifteína reduz a secreção de imunoglobulinas *in vitro* e *in vivo*.

Verificamos a seguir a ação da warifteína sobre a secreção de imunoglobulinas *in vitro*. Observamos que a warifteína inibiu significativamente a secreção de IgM quando as células foram tratadas com warifteína e estimuladas com LPS ou Pam₃Cys. (Figura 6). Adicionalmente, foram realizados estudos cinéticos, onde os estímulos (LPS ou Pam₃Cys) foram adicionados às culturas no momento inicial e o tratamento com a warifteína foi efetuado no início da cultura, e nos tempos de 2hs, 4hs, 6hs, 8hs e 24hs após o início da cultura. Nesses ensaios verificamos que a warifteína continuou a inibir a secreção de IgM mesmo quando adicionada em momentos mais tardios da cultura (Figura 7).

Após estes estudos realizados *in vitro*, passamos a testar se a warifteína também teria o mesmo efeito na secreção de imunoglobulinas em animais tratados com este composto *in vivo*. Foi avaliado o efeito inibitório da warifteína “*in vivo*” sobre a secreção de imunoglobulinas das classes IgM e IgG (IgG1 e IgG2a) após a imunização com TNP-Ficoll (antígeno T-independente tipo II). Observou-se uma redução significativa nos níveis séricos de anticorpos anti-TNP-ficoll de ambas as classes. Este

efeito inibitório foi mais acentuado nos dias 7 e 14 após a imunização no caso da imunoglobulina da classe IgM; e no dia 21 após a imunização no caso da imunoglobulina da classe IgG (IgG1 e IgG2a) (Figura 8).

5.5) Efeito inibitório da warifteína ocorre mesmo quando PMA e A23187 são adicionados à cultura de linfócitos B.

Foi verificado a seguir, se o efeito inibitório da warifteína seria revertido quando fossem adicionados às culturas acetato mirístico de forbol e o ionóforo de cálcio (A23187). Já é sabido que esses dois estímulos mimetizam a ativação de PKC e o influxo de cálcio observado inicialmente quando o linfócito é ativado pela ligação do antígeno ao BCR. O acetato mirístico forbólico se insere na membrana e induz a ligação e a ativação da PKC.

O efeito inibitório da warifteína não foi revertido nem pela adição de acetato mirístico de forbol e ionóforo de cálcio (A23187) à cultura (Figura 9). Esses dados sugerem que a warifteína provavelmente bloqueie a sinalização celular em etapas posteriores durante o processo de ativação de linfócitos B.

5.6) A warifteína bloqueia o influxo de cálcio em linfócitos B murinos estimulados por anti-IgM.

Até o momento observamos que a warifteína é capaz de modular negativamente tanto a proliferação celular quanto a secreção de imunoglobulinas. Além disso, verificamos que provavelmente a warifteína atue em etapas mais tardias da sinalização celular. Para tentar esclarecer que etapas poderiam estar relacionadas e também com objetivo de avaliar o possível mecanismo de ação da warifteína, começamos a investigar uma possível ação da warifteína sobre as principais vias de sinalização em linfócitos B. Uma das vias iniciais de sinalização é a via que culmina na mobilização de cálcio. Para avaliar diretamente se a warifteína atua bloqueando o influxo de cálcio nós realizamos um ensaio de dosagem de cálcio intracelular. Nós observamos que a warifteína reduz em níveis significativos a concentração intracelular de cálcio em células estimuladas por anticorpo anti-IgM (Figura 10).

5.7) A warifteína não altera o padrão de fosforilação total em resíduos de tirosina de moléculas de células B, porém inibe a fosforilação da proteína ERK presente em linfócitos B tratados e estimulados por LPS.

Outro sinal importante durante o processo de ativação inicial do linfócito B é a fosforilação de resíduos de tirosina. Assim, nós avaliamos o perfil de fosforilação total de resíduos de tirosina (utilizando o anticorpo 4G10) em células B murinas tratadas ou não com warifteína e estimuladas ou não com LPS e anti-IgM. Nenhuma alteração no perfil de fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas totais foi observada (Figura 11).

Também avaliamos o padrão de fosforilação à molécula ERK da família das MAPK, após o tratamento ou não com warifteína e a estimulação ou não com LPS ou anti-IgM. Verificamos que, quando a célula B murina era estimulada com LPS e tratada com warifteína, ocorria uma inibição marcante na fosforilação dessa molécula. Porém, não foi observada alteração na fosforilação de ERK nos linfócitos estimulados com o anti-corpo anti-IgM e tratado com a warifteína (Figura 12).

5.8) Redução na concentração de NFκB no núcleo de células B estimuladas com LPS e tratadas com warifteína.

Adicionalmente, avaliamos os níveis de NFκB presentes nas frações nucleares de células B murinas tratada ou não com warifteína e estimuladas ou não por LPS. Observamos uma redução nos níveis nucleares desse fator de transcrição quando a célula estimulada era tratada com warifteína (Figura 13).

5.9) Warifteína induz aumento na concentração intracelular de cAMP.

Avaliamos, a seguir, se um aumento intracelular de cAMP seria um dos possíveis mecanismos de ação da warifteína. Para isso, nós realizamos a dosagem do cAMP em culturas de células B tratadas ou não com warifteína a 0,2 μM e 2 μM por 2h e estimuladas ou não com LPS. Culturas controles foram tratadas com Rolipran (inibidor de PDE). A partir dessas culturas verificamos que a warifteína induz um aumento nos níveis intracelulares de cAMP (evidente nas culturas tratadas com rolipran), indicando que esse poderia ser seu mecanismo de ação (Figura 14).

6) FIGURAS

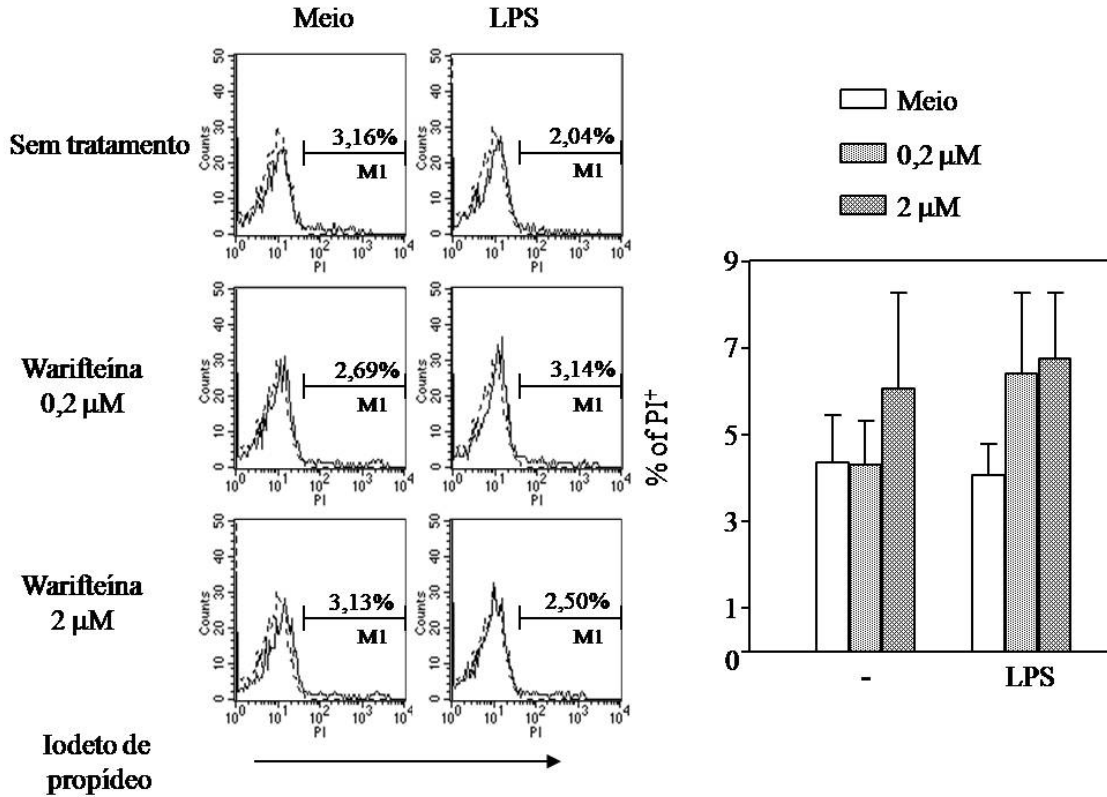


Figura 1. Efeito da Warifteína na viabilidade de linfócitos B medida por incorporação de iodeto de propídeo. Culturas de linfócitos B esplênicos murinos foram estabelecidas na concentração de 2×10^6 células/ml de meio de cultura. As células foram tratadas e estimuladas por 24 hs com as doses indicadas de warifteína e LPS (10 $\mu\text{g/ml}$). Após isso, as células foram marcadas com o anticorpo anti-B220-FITC. No momento da leitura foi adicionado o PI (2,5 $\mu\text{g/ml}$) e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Histogramas representativos de um experimento que indica a incorporação de PI nas culturas. A área delimitada por M1 indica o percentual de células PI⁺ (B) Valores médios do número de células mortas (na região M1) obtidas em gráficos como mostrados em A, estes valores representam dados de 4 experimentos independentes. Os grupos foram estatisticamente comparados através do teste *t* de Student para amostras não pareadas e não foi observada diferença estatisticamente significativa.

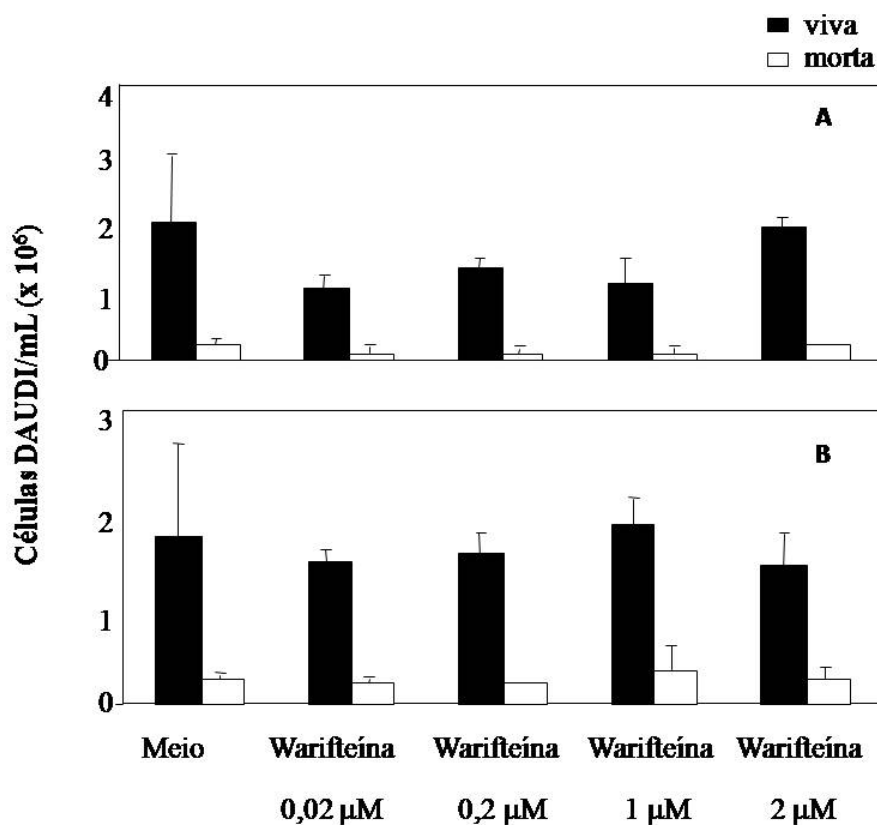


Figura 2. Efeito da warifteína na viabilidade da linhagem tumoral DAUDI. Culturas de células DAUDI foram estabelecidas em microplacas de 96 orifícios na concentração de 2×10^5 células em 0,2mL. As células foram tratadas por 24 hs (figura A) ou 48hs (figura B) com as doses de warifteína indicadas. As culturas controle não receberam warifteína. Após os determinados períodos de incubação, adicionou-se às culturas o corante azul de Trypan e o número de células mortas e viáveis foi determinado por contagem em microscópio óptico. Os dados mostram um experimento representativo de dois experimentos feitos independentemente. Os grupos foram comparados através do teste estatístico *t* de *Student* para amostras não pareadas e não foi observada diferença estatisticamente significativa.

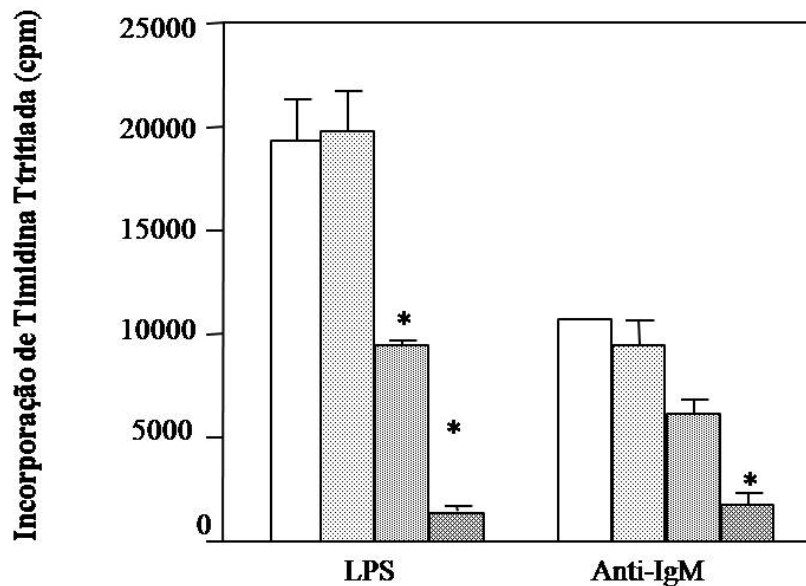


Figura 3. Warifteína inibe a resposta proliferativa de células B induzida por LPS e anti-IgM de maneira dose-dependente. Células B esplênicas de alta densidade foram cultivadas (2×10^5 células por poço em volume de 0,2 ml) por 72 hs na presença ou ausência das doses de LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) ou anti-IgM (10 $\mu\text{g/ml}$). As culturas representadas por barras conforme a legenda, foram tratadas com diferentes doses de warifteína. A proliferação de células B foi medida pela incorporação de 1 μCi de timidina tritiada adicionada nas últimas 18 hs de cultura. As culturas foram feitas em triplicata e os dados mostrados indicam as médias \pm SD. Os grupos foram comparados através do teste t de *Student* para amostras não pareadas e o símbolo * indica $p \leq 0,05$ em relação ao controle estimulado. Um experimento representativo de outros três é mostrado.

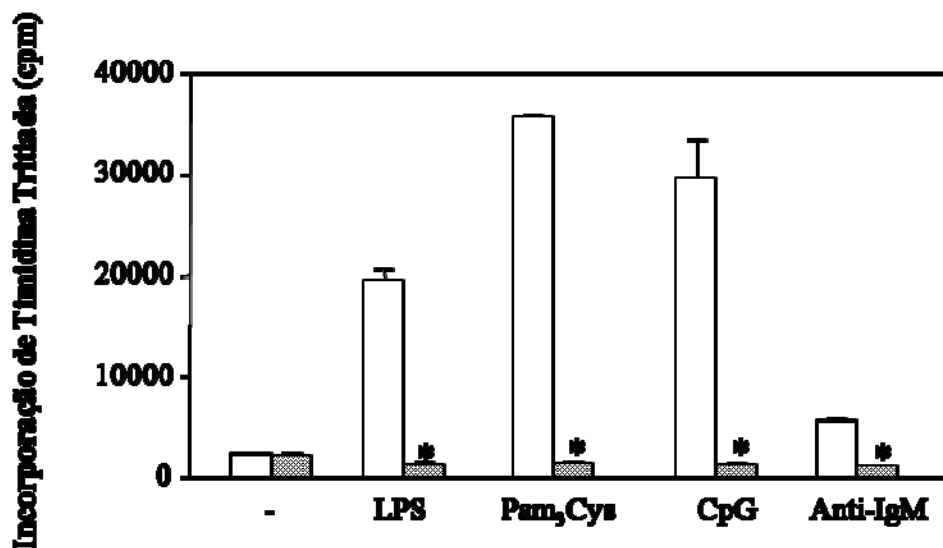


Figura 4. Comparação do efeito inibitório da warifteina em culturas de células B estimuladas com diversos ativadores policlonaes. Linfócitos B murinos foram obtidos e fracionados em gradiente de Percoll. Células B de alta densidade foram cultivadas (2×10^5 células/poço em 0.2 ml) por 72hs na presença ou ausência de LPS (utilizado a 10 $\mu\text{g/ml}$), anticorpo de cabra anti-IgM de camundongo (utilizado a 10 $\mu\text{g/ml}$), ligante de TLR2 Pam₂Cys3 (usado a 1 $\mu\text{g/ml}$) e ligante de TLR 9 oligodeoxinucleotídeo-com seqüências CpG (usado a 1,5 $\mu\text{g/ml}$). As culturas representadas por barras cinzas foram tratadas com 2 μM de warifteina. A proliferação celular foi avaliada pela incorporação de 1 μCi de timidina tritiada após 18 hs do pulso. As culturas foram realizadas em triplicatas e os dados indicam a média \pm SD. Um experimento significativo de três experimentos é mostrado. Os grupos foram comparados através do teste t de *Student* para amostras não pareadas e o símbolo * indica $p \leq 0,05$ significância estatística comparado com o controle estimulado.

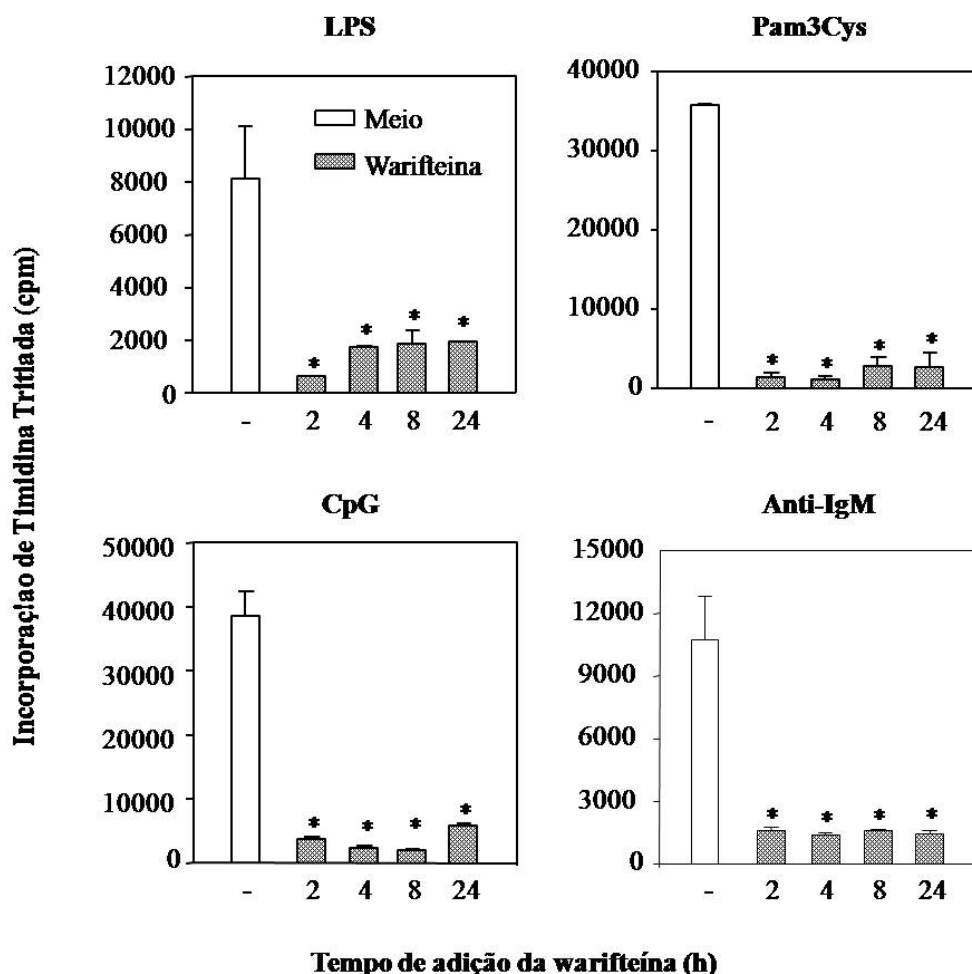


Figura 5. Cinéticas da inibição da proliferação celular em culturas de células B tratadas com warifteína e estimuladas com diversos ativadores policlonais. Linfócitos B murinos foram obtidos e fracionados em gradiente de Percoll. Células B de alta densidade foram cultivadas (2×10^5 células/poço em 0.2 ml) por 72hs na presença ou ausência de (A) LPS (utilizado a $10 \mu\text{g/ml}$); (B) de TLR2 Pam₃Cys (usado a $1 \mu\text{g/ml}$); (C) de ligante de TLR 9 oligodeoxinucleotídeo- com seqüências CpG (usado a $1,5 \mu\text{g/ml}$) e de (D) anticorpo de cabra anti-IgM de camundongo (utilizado a $10 \mu\text{g/ml}$). As culturas representadas por barras cinzas, foram tratadas com $2 \mu\text{M}$ de warifteína. Este alcalóide foi adicionado nos tempos indicados após o início da cultura. Todas as culturas foram encerradas simultaneamente (após 72h de seu estabelecimento). A proliferação celular foi avaliada pela incorporação de $0,5 \mu\text{Ci}$ de timidina tritiada adicionadas nas últimas 18 hs do de cultura. As culturas foram realizadas em triplicatas e os dados representam a média \pm SD. Um experimento significativo de dois experimentos é mostrado. Os grupos foram comparados através do teste t de *Student* para amostras não pareadas e o símbolo * indica $p \leq 0,05$ em relação ao controle estimulado sem adição de warifteína.

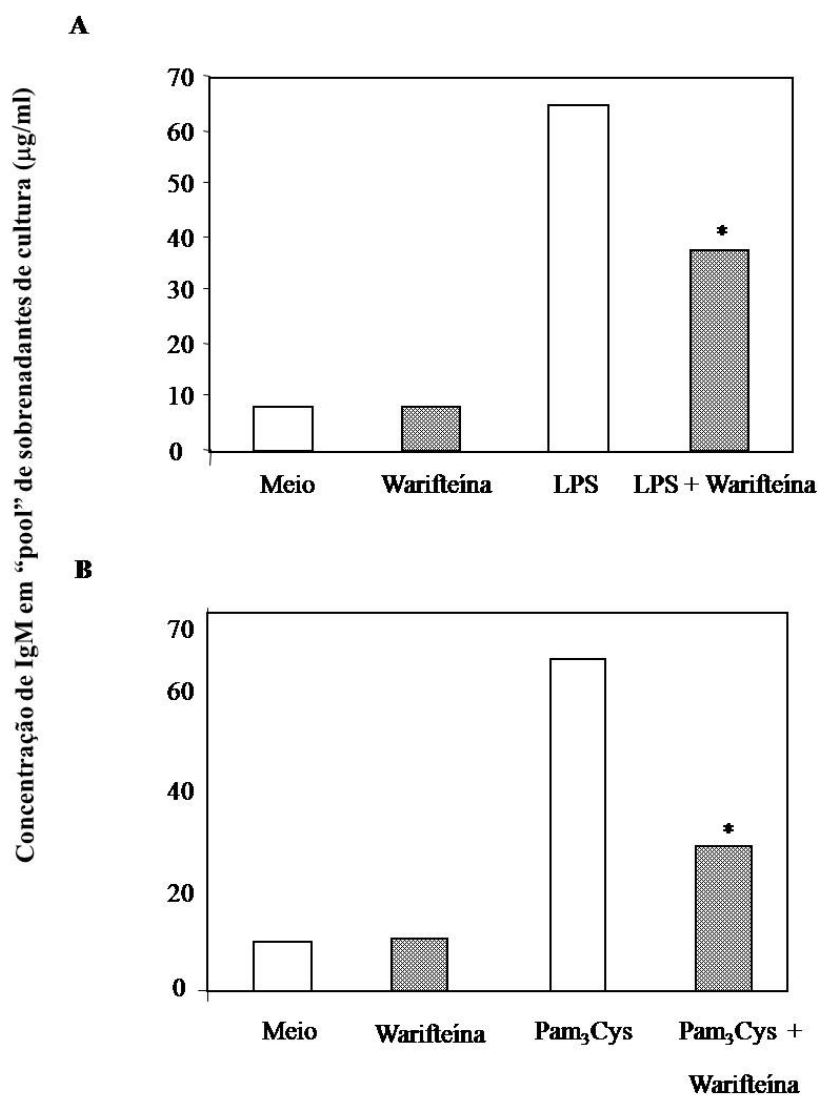


Figura 6. Inibição da secreção de IgM *in vitro* em culturas de células B tratada com warifteína e estimulada com LPS ou Pam₃Cys. Linfócitos B murinos foram obtidos e fracionados em gradiente de Percoll. Estas células foram cultivadas (5×10^4 células/poço em 0.2 ml) por 7 dias na presença ou ausência de LPS (utilizado a 10 µg/ml) (A) ou ligante de TLR2 Pam₃Cys (utilizado a 1 µg/ml) (B). As culturas representadas por barras cinzas foram tratadas com 2 µM de warifteína. A concentração de IgM foi avaliada por ELISA sandwich. As culturas foram realizadas em triplicata e um "pool" de sobrenadantes foi feito. A figura representa um experimento representativo de três realizados. Os grupos foram comparados através do teste t de *Student* para amostras não pareadas e o símbolo * indica $p \leq 0,05$ em relação ao controle estimulado sem adição de warifteína.

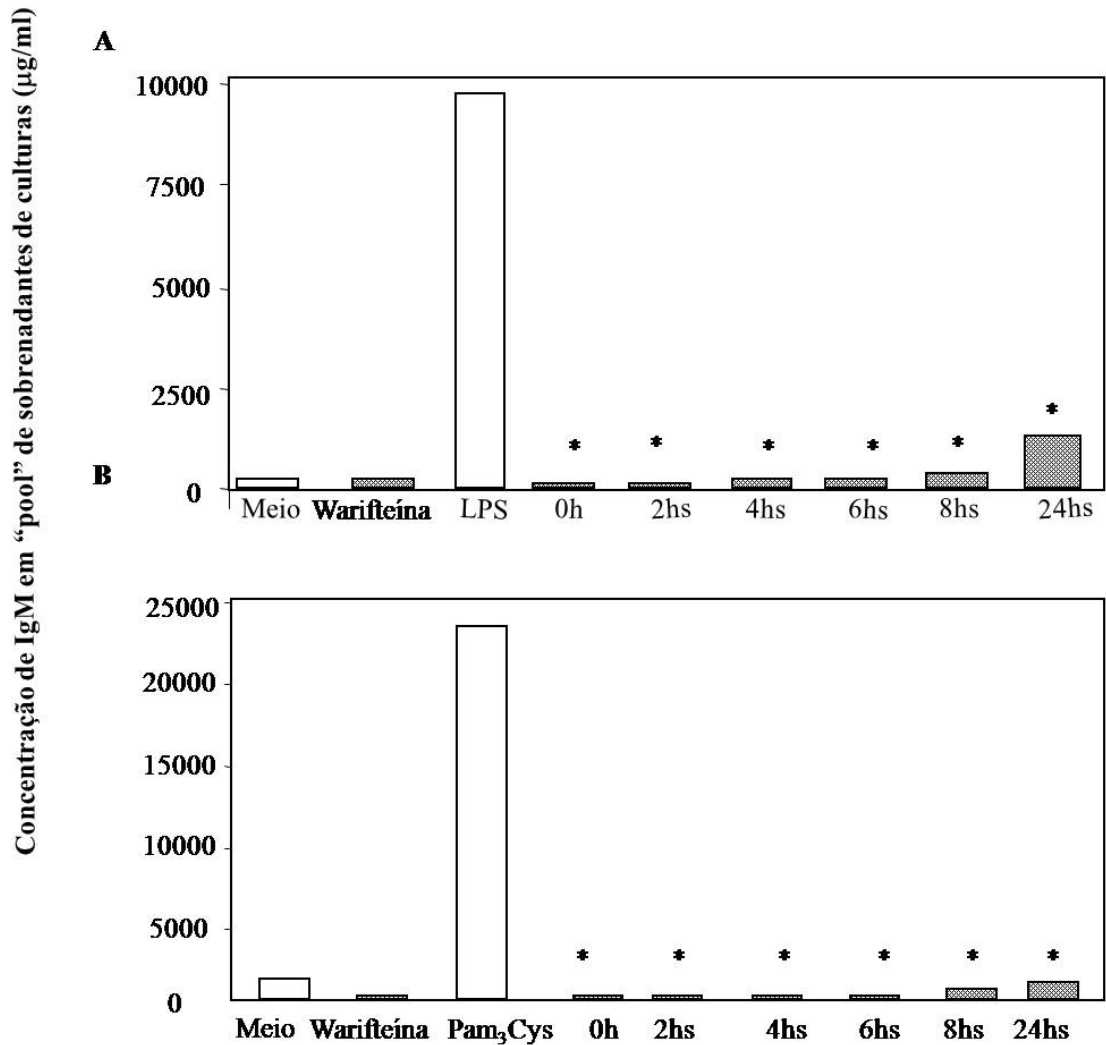


Figura 7. Cinética do efeito da warifteína na inibição da secreção de IgM *in vitro* em culturas de células B tratada com warifteína e estimulada com LPS ou Pam₃Cys. Linfócitos B murinos foram obtidos e fracionados em gradiente de Percoll. Estas células foram cultivadas (2×10^5 células/poço em 0.2 mL) por 7 dias na presença ou ausência de LPS (utilizado a 10 µg/mL) (A) ou ligante de TLR2 Pam₃Cys (utilizado a 1 µg/mL) (B). As culturas representadas em cinza foram tratadas com 2 µM de warifteína. A warifteína foi adicionada nos tempos indicados após o início da cultura. A concentração de IgM foi avaliada por ELISA sandwich. As culturas foram realizadas em pool de sobrenadantes. A figura representa um experimento significativo de dois experimentos. As culturas foram realizadas em triplicata e um “pool” de sobrenadantes foi feito. Os grupos foram comparados através do teste t de *Student* para amostras não pareadas e o símbolo * indica $p \leq 0,05$ em relação ao controle estimulado sem adição de warifteína.

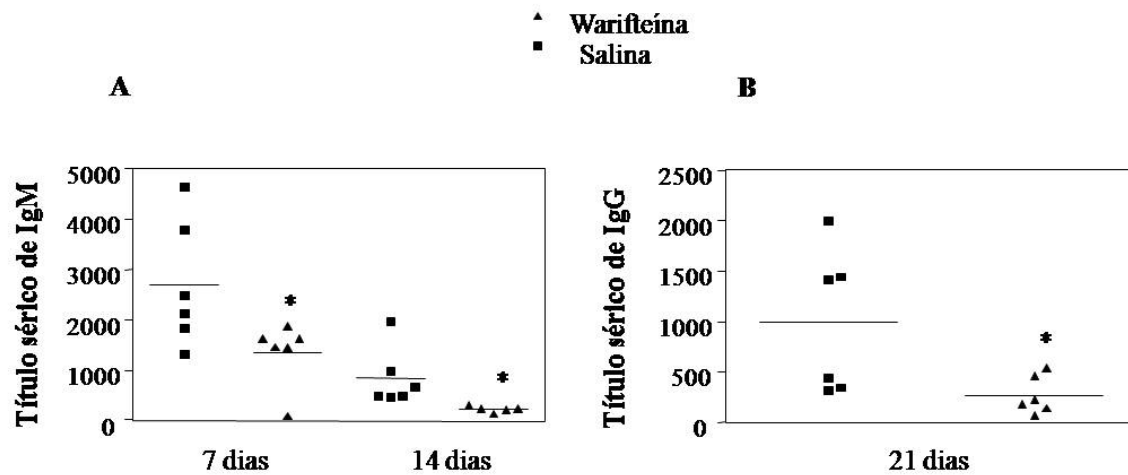


Figura 8. Medida dos títulos de IgM e IgG em soros de animais imunizados com TNP-Ficoll e tratados com warifteína. Camundongos BALB/c foram tratados com warifteína (50 µg/animal, via i.p.) e uma hora depois, foram imunizados com TNP-Ficoll por via endovenosa (50µg). Sangue foi retirado pela veia da cauda nos dias 7, 14 e 21 após imunização e foram obtidos soros. Dosagem de anticorpo anti-TNP foi feita por ensaio de ELISA antígeno-específico que foi revelado utilizando os isotipos específicos marcados com fosfatase alcalina. **(A)** Título sérico de IgM **(B)** Título sérico de IgG. Os dados mostrados são representativos da análise de animais individuais provenientes de 2 experimentos independentes. Os grupos foram comparados através do teste t de *Student* para amostras não pareadas e o símbolo * indica $p \leq 0,05$ em relação ao controle e sem adição de warifteína.

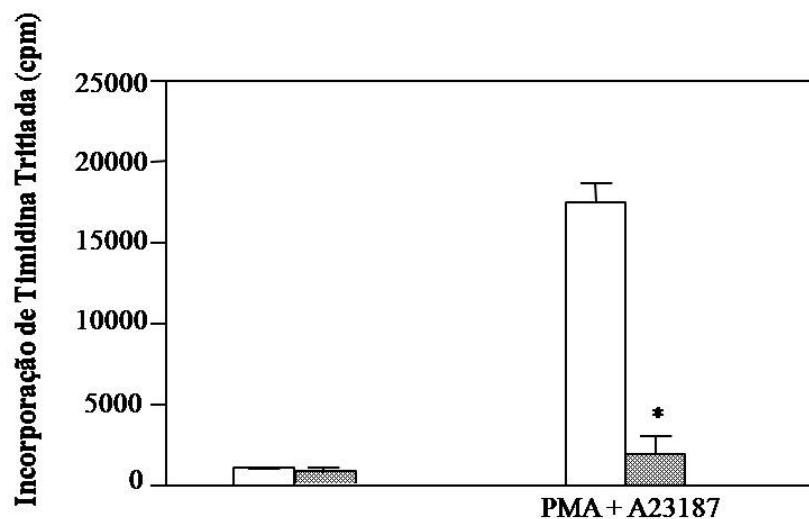


Figura 9. Efeito da warifteína na estimulação farmacológica de linfócitos B com acetato mirístico de forbol e ionóforo de cálcio. Linfócitos B murinos foram obtidos e fracionados em gradiente de Percoll. Células B de alta densidade foram obtidas e cultivadas (2×10^5 células/poço em 0.2 mL) por 72hs na presença ou ausência do PMA ($1 \mu\text{M}$) e do A23187 (10 nM). As culturas representadas por barras cinzas foram tratadas com $2 \mu\text{M}$ de warifteína. A proliferação celular foi avaliada pela incorporação de $0,5 \mu\text{Ci}$ de timidina tritiada adicionados nas últimas 18 hs da cultura. As culturas foram realizadas em triplicatas e os dados representam a média \pm SD. A figura representa um experimento significativo de três experimentos. Os grupos foram comparados através do teste t de *Student* para amostras não pareadas e o símbolo * indica $p \leq 0,05$ em relação ao controle estimulado sem adição de warifteína.

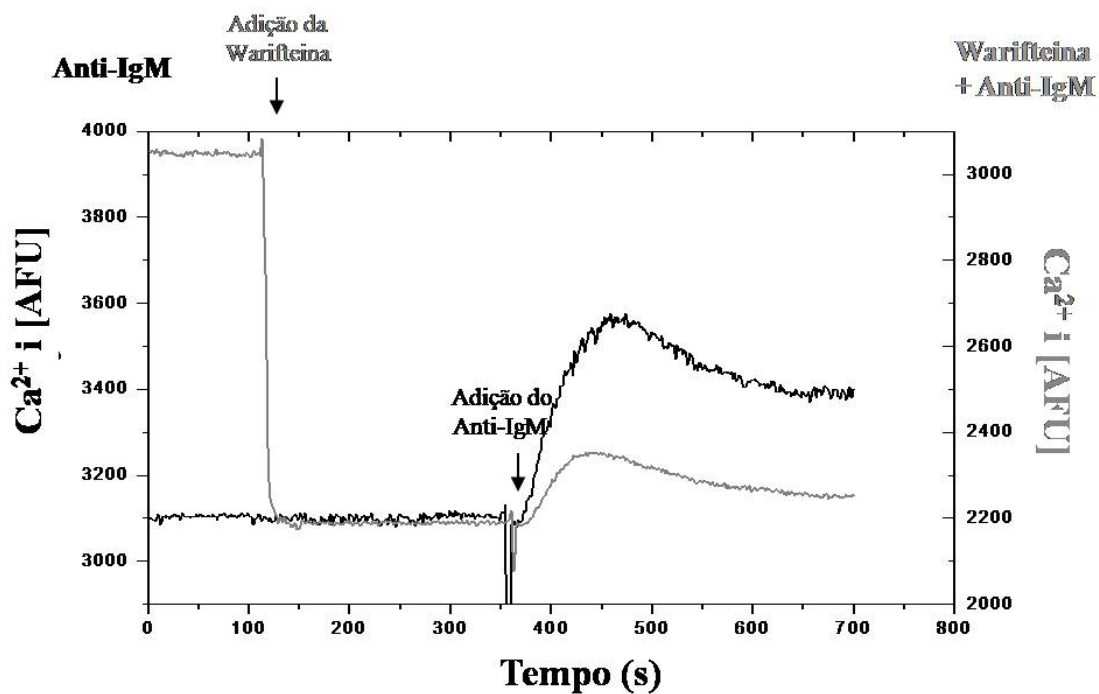


Figura 10. Warifteína diminui o influxo intracelular de Ca^{+2} . Linfócitos B murinos foram isolados e incubados no escuro por 40 min a 37°C com 5 μM de fura 2-AM, Após isso, 1 x 10⁶ células/mL marcadas com fura 2-AM foram estimuladas com anticorpo anti-IgM na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (linha negra) ou tratada com a mesma dose de anticorpo combinada com 2 μM de warifteína (linha cinza). A warifteína foi adicionada no tempo de 100s (na cultura tratada com o alcalóide) e o anticorpo anti-IgM foi adicionado no tempode 400s em ambas situações. As linhas indicam o influxo de cálcio em unidades arbitrárias de fluorescência (Ca^{+2} i [AFU]). Uma figura representativa de três repetições de dois experimentos individuais é mostrada.

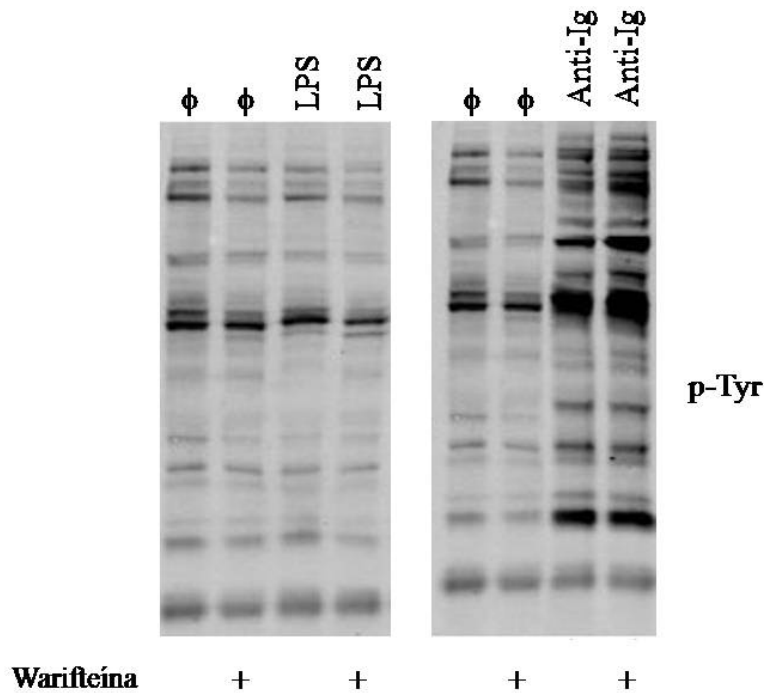


Figura 11. Padrão de fosforilação de resíduos de tirosina de proteínas intracelulares em culturas de linfócitos B tratados com warifteína. Linfócitos B murinos foram obtidos e fracionados em gradiente de Percoll. Células B esplênicas de alta densidade foram cultivadas (1×10^7 células/ml) por 5 min na presença ou ausência de LPS (usado a $10 \mu\text{g/ml}$) ou anticorpo de cabra anti-IgM de camundongo (usado a $8 \mu\text{g/ml}$). As culturas sinalizadas representam o tratamento com a warifteína (adicionada a $2 \mu\text{M}$) por 15 min antes da estimulação. As culturas foram lisadas e foi realizado um SDS-PAGE, seguido de transferência para membrana de PVDF, e de Western Blotting com anticorpo anti-tirosina fosforilada. O anticorpo utilizado foi o anti-pTyr 4G10. Os resultados mostrados são representativos de dois experimentos independentes.

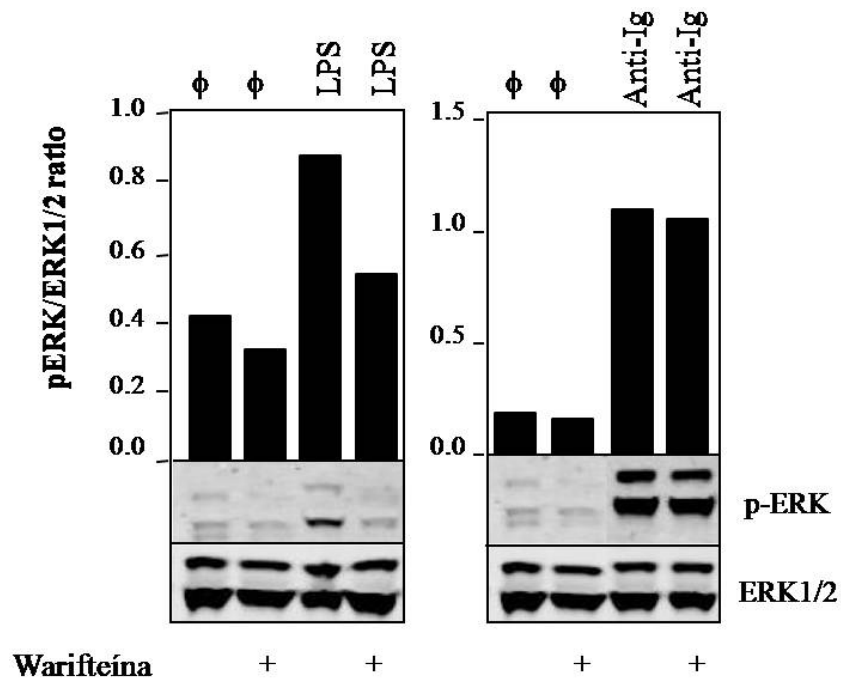


Figura 12. Padrão de fosforilação de proteínas ERK em culturas de células B estimuladas por LPS e anticorpo anti-IgM e tratadas com warifteína. Linfócitos B esplênicos murinos foram obtidos e fracionados em gradiente de Percoll. Células B de alta densidade foram cultivadas (1×10^7 células/mL) por 5 na presença ou ausência de LPS (usado a $10 \mu\text{g/ml}$) ou anticorpo de cabra anti-IgM de camundongo (usado a $8 \mu\text{g/ml}$). As culturas sinalizadas representam o tratamento com a warifteína (adicionada a $2 \mu\text{M}$) por 15 min antes da estimulação. Em seguida, as culturas foram lisadas e foi realizado um SDS-PAGE, seguido de transferência para membrana de PVDF, e de Western Blotting utilizando o anticorpo anti-pERK e o anti-ERK. As barras indicam os valores relativos da razão entre a densidade da banda do experimento marcado com anticorpo anti-pERK em relação a mesma banda marcada com anticorpo anti-ERK. Essa razão foi realizada utilizando o programa ScionImage. Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes.

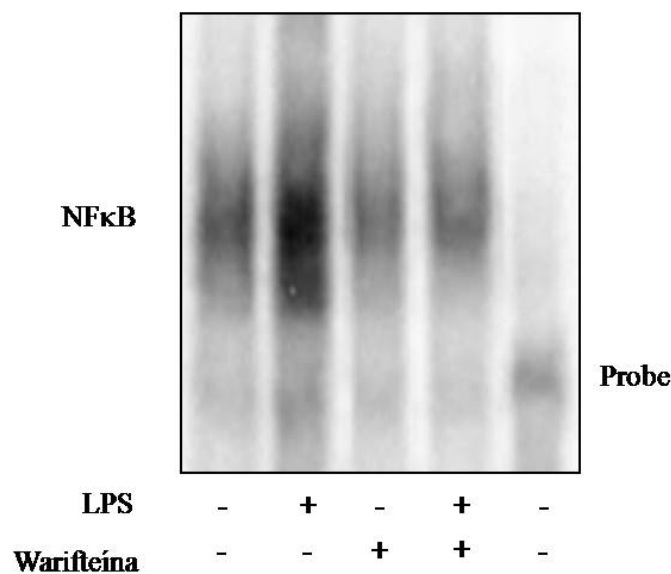


Figura 13. Níveis intranucleares de NFκB em culturas de linfócitos B tratadas com warifteína. Linfócitos B esplênicos murinos foram obtidos e fracionados em gradiente de Percoll. Células B de alta densidade foram cultivadas (1×10^7 células/mL) por 24 hs e estimulas ou não por LPS (usado a $10 \mu\text{g/mL}$). As culturas sinalizadas foram tratadas por 24h com warifteína ($2 \mu\text{M}$). As células foram lisadas e a fração nuclear foi obtida. A partir dela foi realizado um EMSA (Electrophoretic mobility shift assay). Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes.

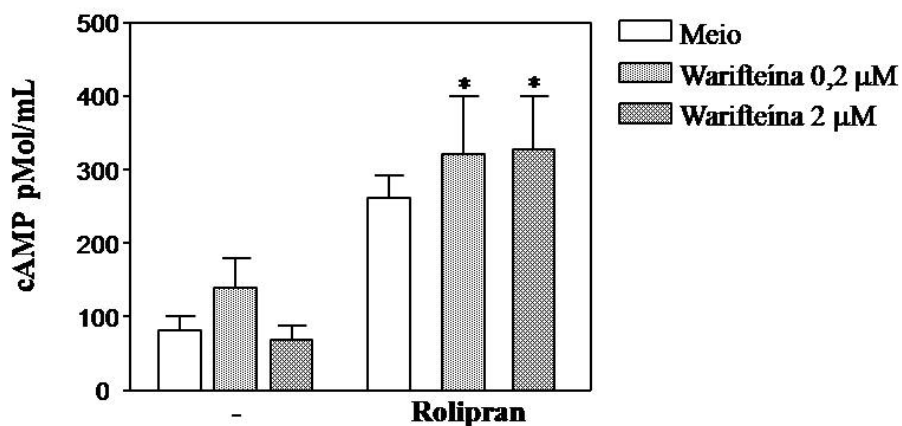


Figura 14. Medida dos níveis celulares de cAMP em culturas de linfócitos B tratados com Warifteína. Linfócitos B esplênicos foram obtidos e fracionados em gradiente de Percoll. Células B de alta densidade foram cultivadas (1×10^5 /poço em 0,2 mL) por 2h na presença ou ausência de Rolipran (10 µM). As culturas representadas em cinza foram tratadas com warifteína nas doses indicadas. Após o período de incubação, o nível de cAMP foi dosado utilizando o kit cAMP Enzymeimmuassay Biotrak™ (EIA) System (dual range) (Amersham Biosciences, UK). Os valores mostrados são representativos de quatro experimentos independentes e o símbolo * indica $p \leq 0,05$ em relação ao controle não tratado com warifteína. A análise estatística foi feita utilizando o teste t de *Student* para amostras não pareadas.

7. DISCUSSÃO

A *Cissampelos sympodialis* é uma planta largamente encontrada no nordeste e sudeste do Brasil. Essa planta é utilizada popularmente no tratamento de quadros de inflamação e asma (Barbosa-filho, Agra & Thomas, 1997). Estudos fitoquímicos levaram ao isolamento de vários alcalóides do extrato de folha dessa planta (Lira *et al*, 2002). A warifteína é o alcalóide presente em maior quantidade (Barbosa-filho, Agra & Thomas, 1997). O IC₅₀ da warifteína já foi descrito anteriormente em estudo realizado por Melo *et al* (2003) utilizando culturas de células hepáticas. Esse dado é uma medida importante na determinação da citotoxicidade de uma substância. O experimento foi realizado em células de hepatócitos e em fibroblastos V79, e o valor do IC₅₀ estava na faixa de 10 µM a 35 µM. Esta é cerca de cinco vezes maior do que a maior dose utilizada por nós em nossa pesquisa (2 µM). Esse dado é confirmado pelos resultados observados por nós de que as doses utilizadas em nosso estudo não são tóxicas para os linfócitos B.

A fim de verificar se os efeitos inibitórios do extrato de *Cissampelos sympodialis* seriam mediados pela warifteína investigamos seu efeito na proliferação de linfócitos B e na secreção de imunoglobulinas. Detectamos uma inibição da proliferação nas culturas tratadas com warifteína. Foi observada uma inibição na proliferação célula de cerca de 90% quando as células eram estimuladas com o ligante de TLR4 LPS, de 75% nas culturas estimuladas pelo ligante de TLR9 oligodeoxinucleotídeos com seqüências CpG e de cerca de 50% quando as células eram estimuladas pelo ligante de TLR2. Além da inibição das vias de sinalização dos receptores tipo-Toll, a warifteína também inibiu a proliferação celular induzida por estimulação via BCR (estimulado pela adição de anticorpo anti-IgM às culturas) e o percentual de inibição foi de aproximadamente 60% em relação ao controle não tratado.

A warifteína inibiu a proliferação celular mesmo se adicionada em tempos tardios de cultura (mesmo após 24h), indicando que ela poderia atuar em etapas tardias do processo de sinalização celular. Associada a esse fato foi observada uma inibição da resposta induzida pela adição combinada de acetato mirístico de forbol (PMA) e ionóforo de cálcio (A23187) às culturas. Esta inibição foi de cerca de 80%, indicando uma inibição mesmo frente a estímulos que mimetizam eventos iniciais da ativação celular. Esses achados sugerem que a warifteína, assim como o extrato de *Cissampelos sympodialis*,

inibe eventos de sinalização que acontecem após etapas iniciais dos da sinalização nos linfócitos B.

A secreção de imunoglobulinas é um evento que envolve várias etapas diferentes que dependem de um conjunto de sinais fornecidos ao linfócito B. A secreção de imunoglobulinas depende das etapas iniciais de sinalização e, ocorre somente após a proliferação. Assim, a inibição da secreção de imunoglobulinas pode ser uma consequência do bloqueio da proliferação celular. Observamos que a warifteína induz uma inibição de aproximadamente 50% na secreção do isotipo IgM quando as células foram estimuladas pelo ligante de TLR 2 Pam₃Cys e de cerca de 85% quando as células foram estimuladas pelo LPS (ligante de TLR4). Foi observada a redução da secreção de imunoglobulina mesmo quando a warifteína foi acrescentada após 24h do início da cultura, sendo o valor inibitório obtido foi maior que 70% do valor observado em culturas estimuladas pelo ligante de TLR4 LPS.

Além disso, a warifteína reduziu a secreção de imunoglobulinas antígeno específicas do isotipo IgM e IgG *in vivo* em até 50%, indicando uma correta absorção e uma possível ação sistêmica da droga. Esse dado está de acordo com dados anteriores da literatura que indica que a warifteína é capaz de inibir os níveis séricos de IgE em modelos experimentis de alergia (Costa *et al*, 2008).

Após avaliação do efeito inibitório da warifteína na resposta induzida por ligantes de receptores tipo-Toll ou estimulada pela ativação via BCR, avaliamos o mecanismo de ação da warifteína nessas vias de sinalização. Um dos eventos mais marcantes durante o processo de ativação celular do linfócito B, é o aumento dos níveis de cálcio após a ligação ao BCR. Assim, para avaliar qual o possível mecanismo da warifteína, nós avaliamos se ela era capaz de inibir esse aumento. A warifteína diminui os níveis de cálcio intracelular frente ao estímulo via BCR. A ligação ao BCR leva a ativação de diferentes vias de sinalização, inclusive as que medeiam a ativação da fosfolipase C γ (PLC γ), que culmina na liberação de do diacilglicerol (DAG) e no inositol trifosfato (IP₃). Essas moléculas atuam, respectivamente, através da ativação da PKC e da ativação de canais de calcio dependentes de IP₃ (IP₃R), esses presentes na membrana do retículo endoplasmático (ER) e da mitocôndria (De Franco, 1994; Yamamura, 1998; Campbell, 1999).

A ativação dos IP₃R leva ao primeiro aumento de cálcio detectável frente a ligação ao BCR. Após sua ativação, e consequente queda nos níveis de cálcio do retículo plasmático, existe o recrutamento de canais de cálcio presentes na membrana plasmática que, ao serem recrutados, mantêm os níveis intracelulares de cálcio elevados. A ativação dos IP₃R é fundamental para a ativação dos canais de cálcio presentes na membrana. A partir de um mecanismo conhecido com entrada de cálcio dependente de reserva (SOCE – “store operated calcium entry”), a baixa de cálcio no ER leva ao recrutamento de proteínas da família STIM (“stromal interaction molecules”) que, ao se ligarem conformacionalmente com as moléculas de cálcio presentes no citoplasma, são ativadas e interagem com os canais de cálcio dependente de cálcio (CRAC – “calcium reactivated calcium channels”) presentes na membrana plasmática (Scharenberg, Huphries & Rawlings, 2007). Além do SOCE, um mecanismo interdependente de manutenção dos níveis intracelulares de cálcio, existe a possibilidade da ativação direta de canais de cálcio que não os CRAC na membrana. Eles auxiliariam na manutenção dos níveis intracitoplasmático de cálcio, e na manutenção da sinalização dependente do mesmo. Canais de troca de íons, como as proteínas da família TRPC (“transient receptor potential cations channels”) poderiam atuar independente do mecanismo dependente do IP₃R (Engelkel *et al*, 2007).

O aumento de cálcio intracelular vai induz a ativação da calmodulina (por alteração conformacional - devido contato direto com as moléculas de cálcio) que atua ativando a fosfatase calcineurina. Esta por sua vez, atua desfosforilando do fator nuclear NFAT, que é, assim, induzido a translocar-se para o núcleo (De Franco, 1994; Yamamura, 1998; Campbell, 1999). O aumento nos níveis intracitoplasmático de cálcio também leva a translocação do fator de transcrição NFκB para o núcleo. Nessa situação, existe a ativação da proteína quinase C-β (PKC-β) que é ativada pelo acúmulo intracitoplasmático de cálcio e assim, inicia a via de sinalização que leva a translocação do NFκB ao núcleo (Engelkel *et al*, 2007).

Já foi descrito que diferentes alcalóides bisbenzilisoquinolínicos são capazes de inibir vias de sinalização dependentes de cálcio. Dentre eles, a berberina (derivada da planta *Berberis chilensis*) possui atividade inibitória da enzima calmodulina, que e

ativada após o aumento dos níveis intracitoplasmático de cálcio. Nesse estudo foi avaliada que essa substancia inibe a ativação da calmodulina, assim, inibindo a capacidade da calmodulina ativar a fosfodiesterase-dependente de calmodulina (CaM-PDE). Esse dado indica que alcalóides bisbenzilisquinolinicos podem alterar o metabolismo dos derivados da adenilato ciclase (cAMP), moléculas essas alvo da ação das fosfodiesterases (Zy *et al*, 1989). Outros compostos bisbenzilisquinolinicos já foram descritos como antagonistas da vias de sinalização dependentes de cálcio, dentre eles a dauricina e a cycleanina (Zy *et al*, 1989; Martinez *et al*, 1998).

Assim, a warifteína poderia estar atuando em diferentes etapas do processo de sinalização mediante o acúmulo de cálcio, já que foi observado por nós que ela é capaz de inibir o acúmulo dessa molécula frente a ligação ao BCR. Ela poderia atuar em etapas iniciais da via de sinalização, tal qual inibindo os mecanismos que levam ao acúmulo do IP₃ e da formação dos canais de membrana, Além disso, ela poderia estar atuando de acordo com os outros alcalóides bisbenzilisquinolinicos que inibem vias de sinalização dependentes de cálcio, assim inibindo a ação da calmodulina e, até mesmo alterando o metabolismo do cAMP, induzindo seu aumento e conseqüentemente, inibindo diferentes funções dos linfócitos B (Wishler *et al*, 1992).

Ainda, para melhor elucidar o papel da warifteína na via de sinalização induzida pelo acúmulo de cálcio, nós adicionamos acetato mirístico de forbol (PMA) e ionóforo de cálcio (moléculas que ativam vias que culminam no acúmulo intracelular de cálcio) e observamos que mesmo sendo induzido um acúmulo intracelular de cálcio artificial (pela presença do ionóforo de cálcio), a warifteína ainda era capaz de inibir a proliferação celular dos linfócitos B. Esse dado indica que a warifteína nesse modelo estava utilizando um outro alvo molecular que não a inibição direta do acúmulo de cálcio, indicando que outras vias de sinalização deveriam ser investigadas por nós.

Ainda no contexto de investigação do mecanismo de ação da warifteína avaliamos se a sua presença alteraria o padrão de fosforilação total de resíduos de tirosina em proteínas celulares. Não observamos nenhum efeito importante. No entanto, observamos uma inibição da fosforilação da MAPK ERK quando as culturas eram estimuladas por LPS. Esse padrão de inibição, no entanto, não foi observado quando avaliamos a ativação induzida por anticorpo anti-IgM. Uma hipótese para tentar

esclarecer essa diferente ação em vias que convergem para um mesmo alvo molecular (como as vias de ativação via BCR e via TLR4, onde ambas levam a fosforilação da proteína ERK), poderia estar relacionada a ação da warifteína pode possuir diferentes alvos moleculares, em diferentes etapas do processo de ativação celular. Assim, ela atuaria de maneira distinta dependendo da via de ativação do linfócito B que foi estimulada, tal qual foi observado quando foi investigada a ação da warifteína frente a indução farmacológica do acúmulo de cálcio.

Avaliamos, ainda, o efeito da warifteína na migração para o núcleo da proteína NFκB, já que esse fator de transcrição participa das etapas tardias da sinalização via receptores tipo-Toll e da sinalização via BCR. Observamos uma inibição marcante na localização nuclear desse fator de transcrição, tendo o mesmo atingido níveis similares ao controle não estimulado nas culturas estimuladas e tratadas com a warifteína. Nos avaliamos o papel da warifteína sobre o NFκB somente frente ao estímulo via TLR4; não avaliamos frente a ligação direta ao BCR.

Já é conhecida a ação imunossupressora do cAMP em diversos tipos celulares do sistema imunológico, incluindo em células B (Wishler *et al*, 1992; Apasov & Sitkovsky, 1999; Apasov *et al*, 2000). Em contraste, somente recentemente na literatura, alguns mecanismos moleculares sobre a ação do acúmulo intracelular de cAMP nas células B, foram descritos (Minguet *et al*, 2005). Além disso, já foi observado um aumento na concentração de cAMP em células B tratadas com o extrato de *Cissampelos sympodialis* (Alexandre-Moreira, Piuvezam & Peçanha, 2003b). Para verificar se o efeito inibitório da warifteína sobre os linfócitos B estaria relacionado ao aumento intracelular de cAMP, avaliamos a concentração dessa molécula em culturas de linfócitos B. Utilizamos como controle nesses experimentos a droga Rolipran (um inibidor das fosfodiesterases, que atua aumentando os níveis intracelulares de cAMP). Verificamos um aumento de em média 50% nos níveis intracelulares de cAMP quando as culturas eram tratadas com warifteína em associação ao Rolipran.

Já foi descrito que o acúmulo de cAMP leva a uma inibição na proliferação celular quando as células são estimuladas via BCR (Wishler *et al*, 1992). Também foi observado que esse aumento leva à inibição na via de sinalização induzida por TLR4 (Minguet *et al*, 2005). Esses achados estão de acordo com a ação da warifteína descrita

em nosso estudo, já que nossos dados sugerem que a warifteína atuaria inibindo a ativação de linfócitos B por aumento da concentração de cAMP.

Estudos anteriores mostraram que, em nível molecular, o acúmulo de cAMP, através da adição de IBMX (inibidor de fosfodiesterases) e Forskolin (ativador da adenilato ciclase), inibiu a fosforilação das proteínas ERK 1 e 2, e essa ação foi revertida pela adição de H-89 (inibidor de PKA) (Minguet *et al*, 2005). Estes estudos sugerem que o aumento de cAMP levaria a uma inibição da via MEK-ERK de sinalização, e que essa inibição seria dependente da atividade da PKA (Minguet *et al*, 2005). Baseado nesses achados, testamos se a inibição da fosforilação da proteína ERK seria observada quando a warifteína é adicionada à cultura e observamos que em nosso modelo, onde a ação da warifteína aumenta a concentração de cAMP, também ocorre a inibição da ativação de ERK.

Nossos dados sugerem que a warifteína, através do aumento intracelular de cAMP, induz uma redução nos níveis nucleares de NFκB em linfócitos B. Estudos anteriores mostraram que o acúmulo de cAMP leva a uma inibição da localização nuclear do fator de transcrição NFκB, tanto em células estimuladas via BCR, quanto em células estimuladas via TLR4 (Neumann *et al*, 1995; Minguet *et al*, 2005). Além disso, já foi sugerido que, em células estimuladas via BCR e via TLR4 a ação inibitória sobre o NFκB ocorreria por ação da PKA, já que foi observada uma reversão na inibição da resposta pela adição do inibidor de PKA H-89 (Minguet *et al*, 2005). Esses achados da literatura estão de acordo com o efeito da warifteína na localização nuclear do NFκB observada nesse estudo.

Observamos em nosso estudo que a warifteína inibe a resposta induzida por ionóforo de cálcio e PMA, substâncias que mimetizam a sinalização via BCR por levar a um aumento nos níveis de cálcio intracelulares e ativação de PKC, respectivamente. Além disso, também foi observada por nós uma significativa redução no influxo de cálcio quando a warifteína foi adicionada. Estudos anteriores demonstraram que o aumento de cAMP, provável mecanismo de ação da warifteína, não bloqueia a ativação induzida por ionóforo de cálcio e PMA (Whishler *et al*, 1992). Esses achados não estão em concordância com o que observamos, o que sugere que, apesar da warifteína induzir aumento de cAMP, talvez esta droga inibiria outras vias de sinalização em adição a esse

efeito. De fato, observamos em estudos cinéticos que, independente do estímulo utilizado, a warifteína inibe a resposta de linfócitos B mesmo se adicionada após 24h do início da cultura, etapa que é posterior aos sinais mediados por ativação de PKC e aumento intracelular de cálcio.

Tomados em conjunto, nossos dados indicam que, provavelmente, um dos possíveis mecanismos de ação da warifteína seria a indução do aumento intracelular de cAMP, que é seguido da ativação da PKA, assim alterando a ação do NFκB, e inibindo tanto a proliferação celular quanto a secreção de imunoglobulinas. O aumento na concentração de cálcio e a ativação de PKC são eventos que ocorrem rapidamente e atingem seu nível máximo alguns minutos após a ativação. Além destes efeitos iniciais, no entanto, nossos dados sugerem que outras vias de sinalização tardias também seriam bloqueadas pela warifteína.

Ja foi mostrado que o extrato de *Cissampelos sympodialis* apresenta efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores e anti-alérgicos (Costa *et al*, 2008). No presente estudo mostramos que a warifteína atua como um inibidor farmacológico da resposta dos linfócitos B. Estudos prévios mostraram que o uso do produto natural curcumina teve efeito terapêutico no modelo de doença auto-imune encefalomielite autoimune alérgica (Natajaram & Byth, 2002). Nossos achados de que a warifteína inibe a produção de anticorpos tanto *in vitro* quanto *in vivo* abrem a possibilidade de uso dessa substância no tratamento de doenças onde o controle da resposta de linfócitos B diminuiria a morbidade.

8. CONCLUSÕES

- A warifteína não apresenta toxicidade sobre linfócito B e a linhagem tumoral DAUDI.
- Foi observada inibição da proliferação celular em culturas de linfócitos B tratadas com warifteína e estimuladas por diversos ativadores policlonais (LPS, Pam3Cys, oligodeoxinucleotídeo com seqüências CpG e anticorpo anti-IgM).
- Foi observado que a inibição da proliferação celular estimulada por diversos estímulos policlonais (LPS, Pam3Cys, anticorpo anti-IgM e oligodeoxinucleotídeo com seqüências CpG) ocorre mesmo quando a warifteína é acrescentada em etapas posteriores da cultura, indicando possivelmente uma ação tardia na via de sinalização da célula B.
- A warifteína induz inibição da secreção de imunoglobulinas *in vivo* em animais imunizados com TNP-Ficoll e *in vitro* em culturas estimuladas por ligantes de receptores tipo-toll. Esse efeito inibitório ocorre mesmo quando a warifteína é acrescentada em etapas mais tardias da cultura.
- Também é observado que a ação inibitória da warifteína não é revertida quando são adicionados a cultura acetato mirístico de forbol (PMA) e ionóforo de cálcio (A23187), reforçando a possibilidade da warifteína atuar em etapas posteriores da sinalização em células célula B.
- O tratamento com warifteína inibe o influxo de cálcio em culturas de linfócitos B estimulados com anticorpo anti-IgM.
- Em culturas estimuladas por LPS, a warifteína não induz alteração no padrão de fosforilação de resíduos de tirosina, porém ela diminui a indução da forma

fosforilada da proteína ERK. Esses dados indicam que um dos possíveis mecanismos de ação da warifteína é a inibição da via das MAPK.

- A warifteína induz uma redução na migração para o núcleo do fator de transcrição NF κ B em células B tratadas e estimuladas por LPS.
- A warifteína aumentou os níveis intracelulares de cAMP, indicando que este é um dos mecanismos de indução do bloqueio da resposta de linfócitos B induzido por esta substância.

9) REFERENCIAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K.. **Toll-like receptor signalling.** Nat. Rev. Immunol., 4:499-511, 2004.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. **Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.** Nat. Immunol., 2:675–80, 2001.
- ALEXAMDRE-MOREIRA M.S., PIUVEZAM M.R. & PEÇANHA L.M.T. **Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae).** Br. J. Med. Biol. Res., 36, 1511-1522, 2003.
- ALEXAMDRE-MOREIRA M.S.; FREIRE DE LIMA C.G.; TRINDADE M.N.; CASTRO FARIA NETO H.C.; PIUVEZAM M.R.; PEÇANHA L.M.T. ***Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract induces interleukin-10 dependent inhibition of *Trypanosoma cruzi* killing by macrophages.** Br. J. Med. Biol. Res., 36, 199-255, 2003.
- APASOV, S.G.; CHEM, J. F.; SMITH, P.; SITKOVSKY, M.V. **A (2A) receptor dependent and A(2A) independent receptor of extracellular adenosine on murine thimocytos in condiction of adenosine deaminase defdiciency.** Blood, 195, 3859-3867, 1999.
- APASOV, S.G.; SITKOVSKY, M.V. **The extracelular versus the intracellular mechanisms oh inhibition of TCR-triggered activation in thimocytes by adenosine under conditions inhibited adenosine deaminase.** Int. Immunol., 11, 179-189, 1999.
- BALANDRIN, F.M.; KLOCLE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H.; **Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials.** Sci., 228,1154–1160,1985.
- BANCHEREAU, J.; BAZAN, F.; BLANCHARD, D.; BRIORE, F.; GALIZZI, J.P.; VAN KOOTEN, C.;LIU, Y.J.;ROUSSET, F.;SAELAND, S. **The CD40 antigen and its ligand.** Annu. Rev. hnmunol. 12,881-922, 1993.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F. & THOMAS, G. **Botanical, chemical and pharmacological investigation on *C. sympodialis* from Paraíba (Brazil).** Ciência e Cultura; 49: 386-394, 1997.
- BATISTA-LIMA, K.V; RIBEIRO, R.A.; BALESTIERI F.M.; THOMAS, G.; PIUVEZAM, M.R. **Anti-inflammatory activity of *Cissampelos sympodialis* EICHL. (Menispermaceae) leaf extract.** Acta Farmacol. Bonaer., 20, 257-259, 2001.
- BERNASCONI, N. L.; TRAGGIAI, E.; LANZAVECCHIA, A. **Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells.** Science, 298, 2199–2202, 2002.
- BERNASCONI, N.L.; ONAI, N.; LANZAVECCHIA, A. **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, 2003.
- BEZERRA-SANTOS, C.R.; BALESTIERI, F.M.P.; ROSSI-BERGMANN, B.; PEÇANHA, L.M.T.; PIUVEZAM, M.R.. ***Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decrteases IgE levels and induces a Th1- skewed cytokine production in ovoalbumin-sensitized mice.** J. Ethnopharmacol., 95,191-197, 2004.
- BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J.M., MANDEIRA-MELO, C.; PIUVEZAM, M.R., BOZZA, P.T. **Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine.** Int. Immunopharmacol., 6, 1152-1160, 2006.
- BISHOP, G. A.; HOSTAGER, B. S. **The CD40–CD154 interaction in B cell–T cell liaisons.** Cytokine Growth Factor Rev., 14,297–309, 2003.

- BORDOR, J.; BORODOVA, J. BARE, J. HOGGE, D. L.; YONG, H. T.; GRESS, R. E. **Transcriptional receptor ICER and its role in modulation of Fas ligand expression on T and NK lymphocytes.** *Eur. J. Immunol.* 32, 203-12, 2007.
- BORDOR, J.; FELGENBAUM, L.; BODOROVA, J. BARE, C.; REITZ, Jr. GRESS, R. E. **Suppression of T cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER).** *J. Leuk. Biol.* 69, 1053-1059, 2001.
- BORIACK-SJODIN, P.; MARGARIT, S.M.; BAR-SAGI, D.; KURIYAN, J. **The structural basis of the activation of Ras by Sos.** *Nature*, 394,337-343, 1998.
- BOURKE, E.; BOSISIO, D.; GOLAY, J.; POLENTARUTTI, N.; MANTOVANI, A. **The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells.** *Blood*, 102, 956-963, 2003.
- BRUNSWICK, M.; FINKLELMAN, F.D.; HIGHET, P.F.; INMAN, J.K.; DINTZIS, H.M.; MOND, J.J. **Picogram quantities of anti-Ig antibodies coupled to dextran induce B cell proliferation.** *J. Immunol.*, 140, 3364-3372, 1988.
- CAMBIER, J.C. **New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL).** *Immunol. Today.* 16, 110, 1995.
- CAMBIER, J.C.; JULIES, M.H. **Early changes in quiescent B cell physiology subsequent to cognate and bystander interaction with helper T cell.** *Scand. J. Immunol.*, 27,59-63, 1987.
- CAMPBELL, K.S. **Signal transduction from the B cell antigen receptor.** *Curr. Opin. Immunol.*, 11,256-264,1999.
- CHEM, F.; SUN, S.; KUHN, D. C.; LU, Y.; GLAYDOS, L. J. **Tetrandrine inhibits signal-induced NF- κ B activation in Rat Alveolar Macrophages.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 231'99-102,1997.
- CHIRON, D.; BEKEREDJIAN-DING, I.; PELLAT-DECEUNYNCK, C.; BATAILLE, R.; GAETAN, J. **Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant B cells.** *Blood*, 112, 2205-2213, 2008.
- CHUNG, J.B.; BAUMEISTER, M.A.; MONROE, J.G. **Cutting edge: differential sequestration of plasma membrane-associated B cell antigen receptor in mature and immature B cells into glycosphingolipid-enriched domains.** *J. Immunol.*, 166, 736-740, 2001.
- CORREA, M.P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e Exóticas Cultivadas.** Ministério da Agricultura, Editado por IBDF, Rio de Janeiro, 1984.
- COSTA, H.F.; BEZERRA-SANTOS, J.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MARTINS, M.A.; PIUVEZAM, M.R. **Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals.** *Int. immunopharmacol.*, 8,519-525, 2008.
- COUTINHO, A.; GRONOWICZ, E.; BULLOCK, W.W.; MOLLER, G. **Mechanism of thymus-independent immunocyte triggering. Mitogenic activation of B cells results in specific immune responses.** *J. Exp. Med.*; 139: 74-92, 1974.
- CRESPO, P.; SCHUEBEL, K.E.; OSTROM, A.A.; GUTKIND, J.S.; BUSTELO, X. R. **Phosphotyrosine-dependent activation of Rac -1 GDP/GTP Exchange by Vav proto- oncogene product.** *Nature*, 258,169-172, 1997.
- DASSARI, P.; NICHOLSON, I. C.; HODGE, G.; DANDLE, G. W.; ZOLA, H. **Expression of toll-like receptors on B lymphocyte.** *Cell. Immunol.*, 236, 140-145, 2005.
- DE FRANCO, A. L. **Signaling pathways activated by protein tyrosine phosphorylation in lymphocyte.** *Curr. Opin. Immunol.*, 6, 364-371 1994.

- DIVANOVIC, S.; TROMPETTE, A.; PETINIOT, L. K.; ALLEN, J. L.; FLICK, L.M.; BELKAID, Y.; MADAN, R.; HAKY, J. J.; KARP, C. L. **Regulation of TLR4 signalin and the host interface with pathogens and danger: the role of RP105.** J. Leukoc. Biol. 82, 265-271, 2007.
- DREYFUSS, G.; ALLAIS, D. P.; GUINAUDEAU, H.; BRUNETON, J. **Study of antimalarial activity of various isoquinoline alkaloids in mice.** Ann. Pharm. Fr., 45, 351, 1987.
- ENGELKE, m.; ENGELS, N.; DITTMANN, K.'STORK, B.'WIENANDS,J. **Ca⁺² signaling in antigen receptor activated B lymphocyte.** Immunol. Rev., 218, 235=246, 2007.
- FANZIA, M. A. D.; SERVILLO, G., SASSONE-CROSSI, P. **Cyclic AMP signaling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM.** FEBS letters. 410:22-24, 1997.
- FELIX, J.P.; KING, V. S.; SHEVELL, J. L. **Bis(benzilisoquinoline) analogs of tetrandrine block L-type calcium chanel: evidence for interation at the diltiazem binding site.** Biochem., 31, 11793-11800, 1992.
- FERRANTE, A.; SEOW, W. K.; ROWAN-KELLY, B.; THONG, Y. H. **Tetrandrine a plant alkaloid inhibits the production of tumor necrosis factor-alpha (cathectin) by human monocytes.** Clin. Exp. Immunol, 80, 232-235, 1990.
- FERREIRA, A.M.; FREITAS, M.R.; KLUPPEL, B.L.; PIUVEZAM, M.R.; THOMAS, G. **Atividade do Extrato das folhas de *C. sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) na migração de células para o espaço broncoalveolar em cobaias sensibilizados.** XIV SIMPÓSIO DE PANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Florianópolis, SC, 1996.
- FITZGERALD, K.A.; MCWHIRTER, S.M.; FAIA, K.L.; ROWE, D.C.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D.T. **IKK epsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway.** Nat. Immunol., 5, 491-6, 2003.
- FOURNET, A.; FERREIRA, M. A.; ROJAS DE ARIAS, A.; SHIMINI, A.; NAKAYAMA, H.; TORRES, S.; SANABRIA, R.; GUINEAUDEAU, H.; BRUNETON, J. **The effect of the alkaloids on Trypanosoma cruzi infection mice.** Int. J. Antimicrob. Agents, 8, 163-170,1997.
- FOURNET, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; FERREIRA, M. A.; NAKAYAMA, H.; TORRES DE ORTIZ, S.; SHIMINI, A.; SAMUDIO, M.; BILBAO, N. V.; LAVVAULT, M.; BONTE, F. **Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and cronic trypanosome cruzi murine model.** Int. J. Antimicrob. Agents, 13, 189-195, 2000.
- FOURNET, A; BAIRROZ, A. A.; MUNOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. **Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American Lishmania sp. In BALB/c mice.** Phytother. Res., 7, 281-284, 1993.
- FREITAS, M.R.; CORTES, S.F.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J.M. **Modification of Ca²⁺ metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *C. sympodialis* Eichl. (Menispermaceae).** J. Phar. Pharmacol., 48, 332-336,1996.
- FULD, S.; BORLAND, G.; YARWOOD, S. J. **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 (1):161-73, 2005.
- GARSIDE, P.; INGULLI, E.; MERICA, R.R.; JOHNSON, J.G.; NOELLE, R.J.; JENKINS, M.K. **Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node.** Science, 281, 96-99, 1998.

GAVIN, A.L.; HOEBE, K.; DUONG, B.; OTA, T.; MARTIN, C.; BEUTLER, B. **Adjuvant-enhanced antibody response in absence of toll-like receptor signaling.** *Science*, 314, 1936-1938, 2006.

GENESTIER, L.; TALLAIDERT, M.; MONDIERE, P.; GHEIT, H.; BELLA, G.; DEFRANCE, T. **TLR agonists selectively promotes terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus independent responses.** *J. Immunol.*, 178, 7779-7786, 2007.

GORDON, J. **CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte Survival, growth and differentiation.** *Blood Rev.*, 9, 53-56, 1995.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. **New generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.** *J. Biol. Chem.*, 260, 3440-50, 1985.

GURURAJAM, M.; JACOB, J.; PULENDRAM, B. **Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal subsets.** *PLoS ONE*, 2, 836, 2007.

HALBEIRSTEIN, R. A.; **Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns.** *Ann. Epidemiol.*, 15, 686-699, 2005.

HORNG, T.; BARTON, G. M.; FLAVELL, R. A.; MEDZHITOV, R. **The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors.** *Nature*, 420, 329-333, 2002.

HSING, Y.; BISHOP, G. A. **Requirement for NF- κ B activation by a distinct subset of CD40-mediated effector functions in B lymphocytes.** *J. Immunol.*, 162, 2804-11, 1999.

HYUNG, S.; YOUN, A.; SHIN, I.; SAITOH, B.; KENSUKE, M.; HWANG, D. H. **Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin.** *Biochem. pharmacol.*, 72, 62-69, 2006.

IRVIN, B. J.; HANSSON, C. L.; SMITH, L. H.; DANIELS, C. K. **Cyclic AMP and IL-6 signaling cross-talk: comodulation of proliferation and apoptosis in the 7Td1 B cell hybridoma.** *Exp. Cell. Resch.* 256, 73-79, 2001.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. **Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.** *Nat. Immunol.*, 5, 987-995, 2004.

JEGERLEHNER, A.; MAURER, P.; BESSA, J.; HINTON, H. J.; KOPF, M.; BACHMANN, M. F. **TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a.** *J. Immunol.*, 178, 2415-2420, 2007.

KAUL, N. P.; **Drug Discovery: Past, Present and future.** *Prog. Drug. Res.*, 50, 12-103, 1998.

KESERU, G. M.; NOGRADI, M. **The biological activity of cyclic(bibenzil): a rational approach.** *Bioorganic Medic. Chem.*, 3, 1511-1517, 1995.

KLAUS, G. G.; CHOI, M. S.; LAM, E. W.; JOHNSON-LEGER, C.; CLIFF, J. **CD40: a pivotal receptor in the determination of life/death decisions in B lymphocytes.** *Int. Rev. Immunol.*, 15, 5-31, 1997.

KRIEG, A. M. **CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.** *Annu. Rev. Immunol.*; 20: 709-760, 2002.

KUROSAKI, T. **Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling.** *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 593-623, 1999.

KUTCHAN, T. M. **Alkaloids biosynthesis- the basis for metabolic engineering of medicinal plants.** *Plant Cell*, 7, 1059-1070, 1995.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J. A. 1996. **The dorsoventral regulatory gene cassette/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.** *Cell*, 86:973, 1996.

LIRA, G.A.; DE ANDRADE, L.M.; FLORENCIO, K.C.; DA SILVA, M.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; LEITÃO DA CUNHA, E.V. **Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots.** *Fitoterapia*, 73, 356-8, 2002.

MA, H.; YANKEE, T.M.; HU, J.; ASAI, D.J.; HARRISON M.L.; GEAHLEN, R. L. **Visualization of Syk-antigen receptor interactions using green B-cell antigen receptor signaling requirements.** *Curr.Opin. Immunol.*, 16, 382-387, 2004.

MARTINEZ, J.A.; BELLO, A.; RUBIO, L.L.; RODRIGUEZ, C; CAUDALES, E.; ALVAREZ, J.L. **Calcium antagonist properties of the bisbenzylisoquinoline alkaloid cycleanine.** *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 12, 182-187, 1998.

MELLO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; HAUN, M. **Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture an in V79 cells.** *Toxicol. Lett.*, 142,143-151, 2003.

MEYER-BAHLBURG, A.; KHIM, S.; RAWLINGS, D. J. **B cell-intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity.** *J. Exp. Med.*, 204, 3095-3101, 2008.

MEYER-BAHLBURG, A.; RAWLINGS, D. J. **B cell autonomus TLR signaling and autoimmunity.** *Autoimmunity Rev.*, 7, 313-316, 2008.

MINGUET, S.; HUBER, M.; ROSENKRANZ, L.; SCHAMEL, W.W.; RETH, M.; BRUMMER, T. **Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors.** *Eur. J. Immunol.*, 35, 31-41, 2005.

MITA, Y.; DOBASHI, K.; ENDOU, K.; KAWATA, T.; SHIMIZU, Y.; NAKAZAWA, T.; MORI, M. **Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4.** *Immunol Lett.*, 81, 71-75, 2002.

MOND, J.J.; HUNTER, K.; KENNY. J.J.; FINKELMAN; F.D., WITERSPOON, K. **8-Mercaptoguanosine mediated enhancement of in vivo IgG1, IgG2 and IgG3 antibody response to polysaccharide antigens in normal da xid mice.** *Immunopharmacol.*, 18, 205-211, 1889.

MOND, J.J.; VOS, Q.; LEES, A.; SNAPPER, C.M. **T cell independent antigens.** *Curr Opin Immunol.*, 3,349-54,1995.

MOSIER, D.E.; MOND, J.J.; GOLDINGS, E.A. **The ontogeny of thymic independent antibody responses *in vitro* in normal mice and mice with an X-linked B cell defect.** *J. Immunol.*, 119, 1874-1878, 1977.

MURAGUCHI, A.; MIYAZAKI, K.; KEHRL, J.H.; FAUCI, A.S. **Inhibition of humam 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, 1984

NARANJO P.; **Urgent need for the study of medicinal plants.** In: *Ethnobotany: Evolution of a Discipline*, 362-368. Edited by Von Reis, S., Portland, OR: Dioscorides Press, United States, 2003.

- NATARAJAN C, BRIGHT JJ. **Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus Kinase - STAT pathway in T lymphocytes.** J. Immunol., 168, 6506-13, 2002.
- NEMAZEE D.; GAVIN A.; HOEBE K.; BEUTLER B. **Immunology: Toll-like receptors and antibody responses.** Nature, 18;441, 2006.
- NEMAZEE D.; GAVIN A.; HOEBE K.; BEUTLER B. **Immunology: Toll-like receptors and antibody responses.** Nature, 18; 441 ,2006.
- NEUMANN, C.; GRIESHAMMER, T.; CHUVIPILO, S.; KNEITZ, B.; LOHOFF, M.; SHMPL, A.; FRANZA, B. R.; SHERFLING, E. **Real A/p65 is a molecular target for immunosuppressive action of protein kinase A.** ENBO. J. 14, 1991-2004, 1995.
- PARKER, D. C. **T cell-dependent B cell activation.** Annu. Rev. Immunol., 11, 331–360, 1993.
- PASARE C.; MEDZHITOV R. **Control of B-cell responses by Toll-like receptors.** Nature., 18;441, 2006.
- PAUL, W. E.; OHARA, J. **B cell stimulatory factor 1/interleukin 4.** Annu. Rev. Immunol., 5, 429, 1987.
- PELLETIER, S.W. **In: Alkaloids: chemical & biological perspectives (Kindle edition).** Editado por William W. Pelletier, Pergamon Press, Oxford, UK, 1982.
- PENG, S. L. **Signaling in B cells via Toll-like receptors.** Curr. Opin. Immunol., 17, 230–236, 2005.
- PIUVEZAM M.R.; PEÇANHA L.M.T. & THOMAS, G. A. **Cissampelos sympodioides Eichl leaf extract increases the production of IL-10 by concavalin – A treated BALB/c spleen cells.** J Ethnopharmacol., 67: 93-101, 1999.
- PUTMAM, M.A.; MOQUIN, A.E.; MERRIHEW, M.; OUTCALT, C.; SORGE, E.; CABALLERO, A.; GONDRE-LEWIS, T.A.; DRAKE, J.R. **Lipid raft-independent B cell receptor-mediated antigen internalization and intracellular trafficking.** J Immunol., 170, 905-912, 2003.
- RETH, M.; WIENANDS, J. **Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor.** Annu Rev Immunol., 15, 453-479,1997.
- RHEE, S.H.; HWANG, D. **Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase.** J. Biol. Chem., 275, 34035–40, 2000.
- RODHES, D.G. **A revision of the genus Cissampelos.** Phytologia, 30, 415–485,1975.
- ROPER, R. L.; LUDLOW, J.W.; PHIPPS, R. P. **Prostaglandin E2 inhibits B lymphocyte activation by a cAMP-dependent mechanism PGE-inducible regulatory proteins.** Cell. Immunol. 154:296-308, 1994.
- RUPRECHT, R. C.; LANZAVECCHIA, A. **Toll-like stimulation as third signal required for activation of human B cells.** Eur. J. Immunol., 36,810-816, 2006.
- SCHARENBERG, A.; HUPHRIES, A. L.; RAWLINGS, D. J. **Calcium signaling and cell fate choice in B cells.** Nat. Rev. Immunol, 7,778-789, 2007.

SCHEINMAN, A.; GUALBERTO, C.M.; JEWELL, J.A.; CIDLOWSKI, A.S.; BALDWIN JR. **Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors.** Mol. Cell. Biol., 15, 943–953, 1995.

SCHUSTER, B.G.; **A new integrated program for natural product development and the value of an ethnomedical approach.** J. Altern. Complement. Med., 7(1), 61-72, 2001.

SKALHEGG, B. S.; TASKÉN, K.; HANSSON, V., HUITFELDT, H. S.; JAHMSEN, T.; LEA, T. **Location of cAMP-dependent protein kinase type I with the TCR-CD3 complex.** Science, 263(5143): 84-87, 1994.

SKALHEGG, B. S.; FUNDEURUD, A.; HENANGER, H. H.; HAFTE, T. T.; LARSEN, A.C.; KVISSEL, A. K.; EIKVAR, S.; ORSTAVIK, S. **Protein kinase a (PKA): potential target for therapeutic intervention os dysfunctional immune cells.** Curr Drug Targets. 6, 655-664, 2005.

SMITH, P.G.; WANG, F.; WILKINSON, K.N.; SAVAGE, K.J.; NEUBERG, D.S.; BOLLAG, G.; SHIPP, M. A. ; AGUIAR, R. C. T. **The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3K/AKT-dependent apoptosis in B cells lymphoma.** Blood., 105, 308-316, 2005.

SNAPPER, C.M.; PAUL, W.E. **B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide.** J. immunol., 139, 10-17, 1987.

STODDART, A.; DYKSTRA, M.L.; BROWN, B.K.; SONG, W.; PIERCE, S.K.; BRODSKY, F.M. **Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization.** Immunity, 17, 451-462, 2002.

TAKATSU, K. **Cytokines involved in B-cell differentiation and their sites of action.1.** Proc Soc Exp Biol Med., 215, 121-33, 1997.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. **TLR signaling pathways.** Semin. Immunol., 16, 3–9, 2004.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. **Toll-like receptors.** Annu. Rev. Immunol., 21, 335–376, 2003.

THOMAS G.; C.C. ARAUJO, J.C.; DUARTE, D.P.; SOUZA, N.J. **Bronchodilatory activity of aqueous fraction of ethanolic extract of leaves of *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) in guinea-pig.** Phytomedicine, 4, 233-238, 1997a.

THOMAS, G.; BURNES, F.; PYNE, S.; PYNE, N.J. ***Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) on spontaneous tone of isolated trachea.** Phytoter. Res., 11, 496–499, 1997b.

THOMAS, G.; SELAK, M. & HENSON, P. M., **Effects of aqueous fraction of ethanol extract of leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in human neutrophils.** Phitother. Res., 13.9-13, 1999.

THORPY, T.J. **adrenoceptores, cAMP and airways smooth muscle regulation: challenges to the dogma.** Trends Pharmacol. Sci., 15:370-374, 1994.

TOAPANTA, F. R.; ROSS, T. M. **Complement-mediated activation of the adaptive immune responses: role of C3d in linking the innate and adaptive immunity.** Immunol. Res., 36, 197-210, 2006.

TORGERSEN, K. M.; VAAGE, J. T.; LEVY, F. O.; HANSSON, V.; ROLSTAD, B.; TASKÉN, K.. **Selective activation of cAMP-dependent protein kinase type I inhibits rat natural killer cell cytotoxicity.** J. Biol. Chem., 272, 5495-5500, 1997.

TORGERSEN, K. M.; VANG, T.; ABRHAMSEN, H.; YAQUB, S.; TASKÉN, K. **Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function.** Cell. Signal. 14,1-9, 2002.

VANDEN BUSH, T. J.; BISHOP, G. A. **TLR7 and CD40 cooperate in IL-6 production via enhanced JNK and AP-1 activation.** Eur. J. Immunol., 38, 400-409, 2008.

VENKATARAMAN, C.; CHELVARAJAN, R.L.; CAMBIER, J.C.; BONDADA, S. **Interleukin-4 overcomes the negative influence of cyclic AMP accumulation on antigen receptor stimulated B lymphocytes.** Mol Immunol., 35, 997-1014, 1998.

WEIH, F.; CARRASCO, D.; DURHAM, S.K.; BARTON, D.S.; RIZZO, C.A.; RYSEC, K.R. **Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family.** Cell., 80, 331-40, 1995.

WHISHLER, R. L.; BEIGING, L.; GRANTS, I.S.; NEWHOUSE, Y. G. **Cyclic AMP modulation of human B cell proliferative responses: role of cAMP-dependent protein kinases in enhancing B cell responses to phorbol ester and ionomycin.** Cell. Immunol, 142, 398-415, 1992.

YAKAMURA, H. **Phosphatases and kinases in lymphocyte signaling.** Immunol. Today, 19, 198-201, 1998.

YAMADA, H.; JUNE, C.H.; FINKELMAN, F. D., BRUNSWICK, M.; RING, M.S.; LEES, A.; MOND, J.J. 1993. **Persistent calcium elevation correlates with the induction of surface immunoglobulin-mediated B cell DNA synthesis.** J. Exp. Med., 177, 1613-1621, 1993.

YANG, Y.; WILSON, J.M. **CD40L-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40.** Science, 4, 273:1862, 1996.

YOO, S.; OH, S.; LEE, S.; LEE, B.; KO, W.; MOON, K.; LEE, B. **Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by tetrandrine.** J. Ethnopharmacol., 81, 225-229, 2002.

ZUBLER, R. H.; WERNER-FAVRE, C.; WEN, I.; SEKITA, K.; STRAUB, C. **Theoretical and practical aspects of B-cell activation: murine and human systems.** Immunol. Rev., 99, 281-299, 1987.

ZY, C.; SL, C.; ZG, H.; WL, H; SX, P. **Bisbenzylisoquinoline compounds inhibit the ability of calmodulin to activate cyclic nucleotide phosphodiesterase.** Cell. Signal., 1, 181-185, 1989.

10) ANEXO

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](#)