

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

**GISELE PASETTI**

**TRIAGEM *IN VITRO* DE COMPOSTOS NATURAIS OU  
SINTÉTICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE  
IMUNOMODULATÓRIA EM CÉLULAS JURKAT:  
PADRONIZAÇÃO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DA  
EXPRESSÃO DO mRNA DA INTERLEUCINA-2**

**FLORIANÓPOLIS  
2009**

GISELE PASETTI

TRIAGEM *IN VITRO* DE COMPOSTOS NATURAIS OU SINTÉTICOS COM  
POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA EM CÉLULAS JURKAT:  
PADRONIZAÇÃO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DA EXPRESSÃO  
DO mRNA DA INTERLEUCINA-2

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto  
Zanetti

Florianópolis  
2009

Pasetti, Gisele

Triagem *in vitro* de compostos naturais ou sintéticos com potencial atividade imunomodulatória em células Jurkat: Padronização de RT-PCR para detecção da expressão do mRNA da interleucina-2./ Gisele Pasetti. Florianópolis, 2009. 104 p.

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

1- Linfócitos T. 2- RT-PCR. 3- Ensaio de MTT. 4- Galatos. 5- Polissacarídeos *Agaricus blazei*. 6- Atividade imunomodulatória.

GISELE PASETTI

“TRIAGEM *IN VITRO* DE COMPOSTOS NATURAIS OU SINTÉTICOS  
COM POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA EM CÉLULAS  
JURKAT: PADRONIZAÇÃO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DA  
EXPRESSÃO DO mRNA DA INTERLEUCINA-2”

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

---

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

Comissão examinadora:

---

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

---

Prof. Dra. Tânia Silva Fröde  
ACL/CCS/UFSC

---

Prof. Dra. Ruth Camargo Vassão  
Instituto Butantan - SP

---

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

Florianópolis, 13 de Fevereiro de 2009.

**Dedico este trabalho aos meus pais, que me apoiaram em todos os passos desta caminhada, incentivando-me e dando coragem para seguir em frente.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado coragem, paciência e compreensão para concretizar mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais, Leodir e Janete, por todo o incentivo e o contínuo apoio em todos estes anos, me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória.

Aos meus irmãos, Giovani, que mesmo longe me incentivava a continuar na caminhada e Gelson, que esteve presente em todos os dias, pela compreensão e paciência.

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

À minha cunhada, Janaína e minha sobrinha e afilhada, Paola, por fazerem parte da nossa família e nos proporcionar um convívio tão alegre e feliz.

Ao amigo e professor, Carlos Roberto Zanetti, por todos os ensinamentos, pelo constante incentivo e confiança, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade.

Aos meus amigos, que de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho e por me ensinarem o verdadeiro significado da amizade, gostaria de expressar minha profunda gratidão, em especial aos amigos Ana Cristina Puhl, Bruno Costa da Silva, Catarina Figueiredo, Josiane Milanez, Suelen Bruschi e Viviane Polli.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada e amigos, Álvaro José Celmer, Caroline H. Seibert, Camila Zanluca, Douglas Bardini Silveira, Larissa Haut, Patricia Bräunig, Silvia Regina Lanza, Tiago Graf, Elis Amaral Rosa, Fernando Mafalda, Jonatan Ersching, Mariana Borsa, Mariana Silveira Duz, Ricardo de Carli da Silva e ex-integrantes, Ênio José Bassi, Jaqueline Flores, João Vicente, Patricia Monteiro e Rafael Diego da Rosa, por todo o incentivo, atenção, carinho, cumplicidade e pelo incansável e constante apoio.

Aos professores Aguinaldo Pinto, André Báfica, Carlos Pinto, Célia Regina Monte Barardi, Cláudia Maria Oliveira Simões, Edmundo Carlos Grisard e Mário Steindel pela orientação, amizade e convivência.

Aos colegas da Protozoologia, em especial Patricia Hermes Stoco, Thais Sincero, por todo o auxílio e por possibilitarem a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Aplicada, pela ajuda e disponibilidade.

À doutoranda Carla Maísa Camelini e a sua orientadora Prof. Dra. Margarida Matos Mendonça (MIP/CCB/UFSC) pelas amostras cedidas dos polissacarídeos de *Agaricus blazei*, ao doutorando Paulo César Leal e ao seu orientador Prof. Dr. Ricardo José Nunes

(QMC/CFM/UFSC) pelas amostras cedidas dos galatos, à Dra. Silvia Ferreira e à mestrandia Renata da Silva pelo auxílio nas análises de caracterização da imunofenotipagem das células por citometria de fluxo.

À Coordenadoria do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, representada pelo professor Dr. Edmundo Carlos Grisard, pelas orientações e apoio.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por possibilitar minha formação profissional e humana.

A todas as pessoas que não foram expressamente mencionadas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho, participaram da minha formação como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão.

“A vida é curta, quebre as regras, perdoe rapidamente, beije demoradamente, ame verdadeiramente, ria incontrolavelmente, e nunca deixe de sorrir, por mais estranho que seja o motivo”.

(Autor desconhecido).



## RESUMO

Neste estudo foi padronizada a reação de RT-PCR para detectar a expressão de mRNA de IL-2, para seleção *in vitro* de substâncias naturais ou sintéticas com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos T, visto que estes constituem uma das maiores classes de linfócitos e são importantes na regulação da resposta imune inata e adaptativa. Para isso foi utilizada a linhagem de células Jurkat, que são derivadas do tecido hematopoiético humano e produzem IL-2 após estimulação celular com lectinas. Para a realização da reação de RT-PCR, o RNA foi extraído das células Jurkat utilizando-se o reagente Trizol e posteriormente tratado com DNase para obter maior pureza do RNA. Para a padronização da reação de amplificação, foram testados diferentes tampões de reação e temperatura de ligação do iniciador. Os produtos de IL-2 foram confirmados por sequenciamento. Também foi padronizado o tempo e a concentração de Fitohemaglutinina (PHA) utilizada para estimular as células, que foi de 24 horas e 1 µg/ml, respectivamente. Além disso, a Ciclosporina A (CsA) foi selecionada como controle de inibição celular. Após padronização da RT-PCR, foram testados os galatos e os polissacarídeos de *Agaricus blazei*. Muitos estudos demonstraram que estes compostos possuem atividades farmacológicas, incluindo ações anticancerígenas, antibacteriana, antivirais, entre outras. A citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) dos compostos utilizados foi determinada pelos ensaios colorimétricos MTT e/ou Vermelho Neutro. Dos 15 galatos testados, somente os galatos de propila, butila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila e tetradecila, apresentaram atividade de estimulação celular e dos 15 polissacarídeos de *Agaricus blazei*, somente 3 mostraram-se positivos: polissacarídeo 3, extraído da frutificação e separado por membrana de ultrafiltração 1, polissacarídeo 4, extraído da frutificação e separado por membrana de ultrafiltração 2 e o polissacarídeo 7, extraído do micélio em grãos de trigo e separado por membrana de microfiltração. Paralelamente, foi realizada a imunofenotipagem das células Jurkat e feita à avaliação da estimulação celular por citometria de fluxo. Dentre os marcadores celulares testados (CD25/CD3) a frequência de células positivas para CD25 foi a que melhor refletia a ativação das células Jurkat, porém com menor sensibilidade do que a RT-PCR. Neste estudo, portanto, ficou evidenciada a utilidade de uma técnica *in vitro* para triagem de substâncias com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos T, o que permite vislumbrar a análise de grande número destas substâncias, sem utilização de animais de laboratório.

Palavras-chave: RT-PCR, linfócitos T, galatos, polissacarídeos *Agaricus blazei*, ensaio de MTT, atividade imunomodulatória.

## ABSTRACT

### IN VITRO SCREENING OF NATURAL OR SYNTHETIC COMPOUNDS WITH POTENTIAL IMMUNOMODULATORY ACTIVITY ON JURKAT CELLS: STANDARDIZATION OF A RT-PCR FOR DETECTION OF INTERLEUKIN-2 mRNA EXPRESSION

In this study a RT-PCR reaction to detect mRNA expression of IL-2 was standardized in order to select natural or synthetic substances with immunomodulatory activity potential on T lymphocytes *in vitro*, since these cells constitute one of the major classes of lymphocytes and are important in regulation of innate and adaptive immune responses. Jurkat cells, which are derived from human hematopoietic tissue and produce IL-2 after cell stimulation with lectins, were used. To perform the RT-PCR reaction RNA was extracted by the use of Trizol reagent followed by treatment with DNase for greater purity of RNA. To standardize the amplification reaction, different buffers and primer binding temperatures were tested. IL-2 products were confirmed by sequencing. Time and concentration of Phytohemagglutinin (PHA) used to stimulate the cells were also standardized, being the best results observed in 24 hours and 1 µg/ml, respectively. Furthermore, Cyclosporin A (CsA) was selected as control of cell inhibition. After standardization of RT-PCR, gallates and polysaccharides of *Agaricus blazei* were tested. Many studies have shown that these compounds have pharmacological activities, including antitumoral, antibacterial and antiviral actions. The cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) of the used compounds was determined by colorimetric MTT test and/or Neutral Red. Among the 15 gallates tested, only the propyl, butyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl and tetradecyl gallates have presented cell stimulation activity, and from the 15 polysaccharides of *Agaricus blazei*, only 3 were positive: polysaccharide 3, extracted from fructification and separated by the type 1 ultrafiltration membrane, polysaccharide 4, extracted from fructification and separated by the type 2 ultrafiltration membrane, and polysaccharide 7, extracted from mycelium of wheat grains and separated by microfiltration membrane. Simultaneously, immunophenotyping of Jurkat cells and cell stimulation measure by flow cytometry were performed. Among the tested cellular markers (CD25/ CD3), frequency of CD25 positive cells was shown to best reflect activation of Jurkat cells, despite its lower sensitivity in relation to RT-PCR. All in all, in this study the usefulness of an *in vitro* technique for screening of potential immunomodulatory substances with activity on T lymphocytes was evident. It may permit the analysis of many of these substances, without the need for laboratory animals.

Keywords: RT-PCR, T lymphocytes, gallates, polysaccharides of *Agaricus blazei*, MTT test, immunomodulatory activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ativação da célula T CD4.....	6
Figura 2.	Lise da célula-alvo por contato direto e citocinas pelo linfócito T citotóxico.....	9
Figura 3.	Eventos de sinalização intracelular durante a ativação da célula T.....	11
Figura 4.	Ativação dos fatores de transcrição nas células T.....	12
Figura 5.	Estrutura dos galatos.....	22
Figura 6.	Diagrama esquemático da maturação das células T ilustrando as mudanças da expressão antigênica.....	40
Figura 7.	Análise fenotípica de células Jurkat por citometria de fluxo.....	40
Figura 8.	Representação gráfica dos valores de densidade óptica obtida no ensaio do MTT, com diferentes densidades de células Jurkat/cavidade.....	42
Figura 9.	Representação gráfica dos valores percentuais de proliferação de células Jurkat, induzida com diferentes concentrações de PHA no ensaio do MTT, em relação ao valor obtido no controle celular sem estimulação.....	43
Figura 10.	Representação gráfica dos valores percentuais de viabilidade de células Jurkat tratadas com os galatos obtidos através dos ensaios colorimétricos do MTT e do Vermelho Neutro.....	44
Figura 11.	Representação gráfica dos valores percentuais de viabilidade celular dos polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> sobre as células Jurkat, obtidos através do ensaio colorimétricos do MTT.....	47
Figura 12.	Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 com diferentes iniciadores para a construção do cDNA.....	48
Figura 13.	Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 e $\beta$ -actina em diferentes tampões testados.....	49
Figura 14.	Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio evidenciando os produtos de amplificação do marcador IL-2 em diferentes temperaturas de anelamento.....	50
Figura 15.	Sequência amplificada do produto de RT-PCR de IL-2, demonstrando em vermelho, nas extremidades, a localização dos iniciadores.....	51

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 em diferentes tempos de incubação.....	51
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 em diferentes concentrações de incubação.....	53
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio, demonstrando o teste de inibição celular pela CsA, Dex e Cor.....	55
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 estimulado com 2 µM/ml dos compostos de galatos por 24 e 72 horas.....	57
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 com 2 µM/ml dos galatos por 24 horas.....	58
Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 estimulado com 10 µg/ml das amostras de polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> por 24 horas.....	59
Figura 22. Avaliação da ativação de células Jurkat por citometria de fluxo.....	61
Figura 23. Avaliação da potencial atividade imunoestimulatória dos galatos nas células Jurkat, por citometria de fluxo.....	62
Figura 24. Avaliação da potencial atividade imunoestimulatória dos polissacarídeos nas células Jurkat, por citometria de fluxo.....	63

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Genes representativos expressos por ativação de linfócitos T.....	13
Quadro 2.	Reagentes utilizados na caracterização fenotípica de células Jurkat por citometria de fluxo.....	21
Quadro 3.	Amostras de polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> testados neste trabalho.....	23
Quadro 4.	Sequência dos iniciadores específicos utilizados nas reações de RT-PCR...	28
Quadro 5.	Formulação e pH dos 12 tampões utilizados na otimização da reação de RT-PCR.....	30
Quadro 6.	Reagentes utilizados na avaliação da potencial atividade de estimulação de células Jurkat por citometria de fluxo.....	36
Quadro 7.	Marcadores celulares utilizados para caracterização das células Jurkat, através de citometria de fluxo.....	39
Quadro 8.	Comparação dos marcadores celulares para a avaliação da potencial atividade de estimulação de células Jurkat por citometria de fluxo.....	60
Quadro 9.	Comparação das técnicas de RT-PCR e citometria de fluxo (CD25) para a avaliação da atividade imunomodulatória dos galatos.....	64
Quadro 10.	Comparação das técnicas de RT-PCR e citometria de fluxo (CD25) para a avaliação da atividade imunomodulatória dos polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> .....	64

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1.	O Sistema imunológico.....	5
2.1.1.	Resposta Imune.....	5
2.1.2.	Linfócitos T.....	5
2.1.3.	Ativação dos Linfócitos.....	10
2.2.	Atividade imunomoduladora de produtos naturais.....	14
2.3.	Abordagens para avaliação da atividade imunomodulatória sobre células T.....	15
3.	OBJETIVOS.....	17
3.1.	Objetivo Geral.....	18
3.2.	Objetivos Específicos.....	18
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1.	CULTURA CELULAR.....	20
4.1.1.	Linhagem Celular.....	20
4.1.2.	Cultura Celular.....	20
4.2.	ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS JURKAT POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	20
4.3.	COMPOSTOS TESTADOS.....	22
4.3.1.	Galatos.....	22
4.3.2.	Polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> Murrill.....	23
4.4.	ENSAIO COLORIMÉTRICO.....	24
4.4.1.	Avaliação da ativação celular <i>in vitro</i> através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	24
4.4.2.	Determinação da citotoxicidade de fármacos imunossupressores, através do ensaio do MTT.....	25
4.4.3.	Determinação da citotoxicidade dos galatos, através do ensaio de MTT e do Vermelho Neutro.....	25
4.4.4.	Determinação da citotoxicidade dos polissacarídeos <i>Agaricus blazei</i> , através do ensaio do MTT.....	26
4.5.	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR.....	27
4.5.1.	Extração e isolamento de RNA total.....	27

4.5.2.	Tratamento do RNA com DNase.....	28
4.5.3.	Sequências de pares de iniciadores específicos utilizados.....	28
4.5.4.	Deteção da expressão da IL-2, através da reação de RT-PCR.....	28
4.5.5.	Amplificação do segmento gênico do marcador de ativação via RT-PCR.....	29
4.5.6.	Seleção do tampão de reação para a reação de RT-PCR.....	30
4.5.7.	Determinação da temperatura ideal de ligação do iniciador IL-2 à fita molde.....	31
4.5.8.	Protocolo de amplificação para o marcador de expressão IL-2.....	31
4.5.9.	Visualização dos produtos de RT-PCR.....	32
4.5.10.	Confirmação da identidade dos produtos de RT-PCR por sequenciamento de cDNA.....	32
4.5.11.	Determinação do tempo de estimulação das células Jurkat com PHA.....	33
4.5.12.	Determinação da sensibilidade da reação de RT-PCR para a deteção da atividade imunoestimulatória da PHA em células Jurkat.....	33
4.5.13	Seleção do fármaco imunossupressor para controle positivo da inibição celular.	33
4.6.	AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS GALATOS E DOS POLISSACARÍDEOS NAS CÉLULAS JURKAT, ATRAVÉS DA REAÇÃO DE RT-PCR.....	34
4.6.1.	Avaliação da potencial atividade estimulatória dos galatos e dos polissacarídeos.....	34
4.6.2.	Avaliação da potencial atividade imunossupressora dos galatos.....	34
4.7.	AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS GALATOS E POLISSACARÍDEOS NAS CÉLULAS JURKAT, ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	35
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1.	Avaliação imunofenotípica das células Jurkat, através da citometria de fluxo.....	39
5.2.	Padronização do ensaio colorimétrico do MTT para a avaliação das atividades estimulatória da fitohemaglutinina (PHA) e inibitória de fármacos imunossupressores.....	41
5.3.	Avaliação da citotoxicidade dos galatos através dos ensaios do MTT e do Vermelho Neutro.....	44
5.4.	Avaliação da citotoxicidade dos polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> , através do ensaio do MTT.....	47

5.5.	Padronização da reação de RT-PCR.....	48
5.5.1.	Seleção do tampão para a reação de RT-PCR.....	49
5.5.2.	Determinação da temperatura ideal de ligação dos iniciadores à fita molde.....	50
5.6.	Confirmação da identidade dos produtos de RT-PCR de IL-2 por sequenciamento de cDNA.....	50
5.7.	Determinação do tempo de estimulação das células Jurkat com PHA.....	51
5.8.	Determinação da sensibilidade do RT-PCR para detecção da atividade estimulatória da PHA em células Jurkat.....	52
5.9.	Seleção do imunossupressor para controle de inibição celular.....	53
5.10.	Avaliação da potencial atividade imunoestimulatória dos galatos.....	55
5.11.	Avaliação da potencial atividade imunossupressora dos galatos.....	57
5.12.	Avaliação da potencial atividade imunoestimulatória dos polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> .....	58
5.13.	Avaliação da potencial atividade imunoestimulatória dos galatos e dos polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> , através de citometria de fluxo.....	60
6.	CONCLUSÕES.....	65
7.	PERSPECTIVAS.....	67
	REFERÊNCIAS .....	69



## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO:

A busca de novos fármacos teve importantes avanços nos últimos anos, principalmente após o desenvolvimento de modelos biológicos realizados *in vitro*. Isso tem permitido a análise concomitante de várias amostras, possibilitando repetição dos experimentos, e propiciando uma análise estatística consistente dos resultados com consequente reprodutibilidade. Devido à ampla diversidade química dos produtos naturais e ao avanço das técnicas cromatográficas, espectroscópicas e de síntese orgânica, as substâncias bioativas podem ser isoladas, purificadas, caracterizadas e modificadas estruturalmente, alcançando maior eficácia e menor toxicidade.

Uma das estratégias na busca de novos fármacos derivados de produtos naturais é baseada na pesquisa de extratos de plantas medicinais. Várias atividades farmacológicas *in vitro* destes extratos já foram comprovadas, mas sua ação sobre as células do sistema imune foi pouco investigada, sendo que as técnicas utilizadas para a detecção de tal atividade baseiam-se, preponderantemente, na detecção da produção de citocinas.

O sistema imune atua na defesa do organismo contra agentes agressores e substâncias estranhas. Ele é composto por uma variedade de células e moléculas sinalizadoras e pode ser dividido em sistema imune inato e sistema imune adaptativo. A resposta do sistema imune inato envolve o reconhecimento não específico do agente agressor, enquanto a resposta imune adaptativa inclui o reconhecimento específico de epítopos do agente agressor e o posterior envolvimento de várias células e citocinas que, por sua vez, induzirão uma resposta imune celular e/ou humoral. As células que se destacam são os linfócitos T e os linfócitos B, com participação fundamental dos macrófagos.

Os linfócitos T são células que reconhecem antígenos específicos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B). Eles são normalmente ativados por antígenos específicos, porém existem compostos que podem agir de maneira inespecífica, modulando a resposta imune. Estas substâncias, denominadas imunomoduladoras, modificam o comportamento biológico, afetando a resposta imunológica de modo positivo ou negativo. A descoberta de novos compostos com atividade imunomoduladora abre a possibilidade de intervenções terapêuticas numa variedade de distúrbios, tais como neoplasias, imunodeficiências, doenças inflamatórias e doenças autoimunes.

Apesar da grande biodiversidade brasileira, que pode ser uma importante fonte de novas moléculas com capacidade de modular a resposta imune, poucos estudos relatando a atividade

de espécimes brasileiros têm sido estudadas com este propósito. Uma hipótese para explicar esta escassez de pesquisas na área poderia ser o fato de não existirem técnicas rápidas, sensíveis e reprodutíveis para a triagem de um grande número de amostras.

Assim sendo, este trabalho objetivou essencialmente padronizar a reação de RT-PCR para avaliar a atividade imunomodulatória sobre linfócitos T de compostos de origem natural ou sintética, através da expressão do mRNA da interleucina-2.

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:**

### **2.1. O sistema imunológico:**

#### **2.1.1. Resposta imune:**

O sistema imunológico é um sistema de defesa que protege o hospedeiro contra microrganismos patógenos invasores e outros agentes agressores, por meio de uma variedade de células e moléculas capazes de reconhecer, especificamente, e de eliminar uma grande diversidade de antígenos (ANDERSEN et al., 2006). Após o reconhecimento de um patógeno, ocorre uma resposta apropriada com conseqüente eliminação ou neutralização dessa ameaça por uma série de células e moléculas do sistema imune. A exposição subsequente ao mesmo patógeno, por sua vez, induz uma resposta imunológica, que é caracterizada por ser mais rápida, intensa e específica (ANDERSEN et al., 2006).

A imunidade inclui componentes não-específicos, que compõem a imunidade inata e, específicos, que fazem parte da imunidade adaptativa, que operam juntos para iniciar uma efetiva resposta imunológica (NETEA et al., 2005; ANDERSEN et al., 2006).

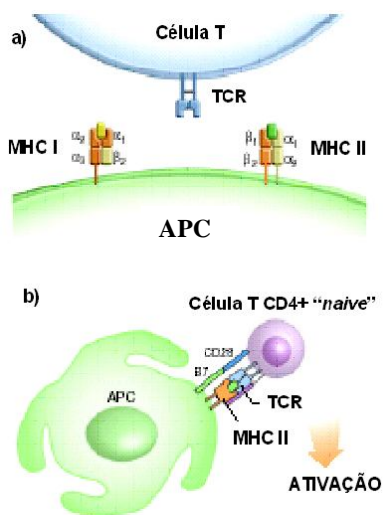
Dentre as células do sistema imune adaptativo, os linfócitos T desempenham um papel fundamental na regulação da resposta imune específica.

#### **2.1.2. Linfócitos T:**

Dentre as células do sistema imune, os linfócitos T constituem uma das maiores classes de linfócitos e são um importante instrumento da resposta imune adaptativa. Eles derivam de precursores da medula óssea com diferenciação no timo, onde são conhecidos como timócitos (KEENAN; LONG; KELLEHER, 1997; STARR; JAMESON; HOGQUIST, 2003). Apenas uma pequena quantidade destas células imaturas diferencia-se em células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, que são subseqüentemente exportadas para a periferia (PALMER, 2003; SURH et al., 2006). Assim que deixam o timo, as células agora denominadas T “naive”, dependem de sinais exógenos para a viabilidade. Um destes sinais é enviado pelo receptor da célula T (TCR), uma molécula antígeno-ligante, expressada na superfície da célula (ANDERSEN et al., 2006; SURH et al., 2006). Estes receptores consistem de duas proteínas integrais de membrana, compostos por uma cadeia  $\alpha/\beta$  e  $\delta/\gamma$  (MOSS; ROSENBERG; BELL, 1992). A variedade de TCR's é resultante de eventos de recombinação gênica ocorridos

durante o desenvolvimento da célula T no timo (SEBZDA et al., 1999). O heterodímero  $\alpha\beta/\gamma\delta$  associa-se com moléculas acessórias, os elementos CD3 ( $\zeta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$  e  $\delta$ ) que são especializados em transdução de sinal. O ligante para o TCR consiste de um peptídeo estranho ou próprio ligado ao complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) do hospedeiro (OHTSUKA; KAZIRO; SATOH, 1996; KALERGIS, 2003) (Figura1).

O MHC de classe II está localizado na superfície das células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cell* - APC), como por exemplo, células dendríticas, linfócitos B e macrófagos (CANTRELL, 1996). Existem dois tipos de MHC, de classe I e de classe II, que interagem com diferentes co-receptores nas células T, que são CD8 e CD4, respectivamente. Enquanto o MHC I é expresso em todas as células nucleadas, o de classe II é expresso somente em APCs (ANDERSEN et al., 2006). O MHC de classe I apresenta principalmente moléculas peptídicas derivadas da degradação de proteínas citosólicas por proteassomos; o MHC de classe II apresenta peptídeos derivados de proteínas extracelulares degradadas pela via endocítica (NEEFJES; SCHUMACHER; PLOEGH, 1991). Normalmente as APCs apresentam na sua superfície cerca de  $10^5$  complexos MHC-peptídeos, dos quais somente muitos poucos terão ligado o peptídeo que especificamente é reconhecido por um TCR particular (HUNT et al., 1992).



**Figura 1:** Ativação da célula T CD4: a) TCR reconhece o antígeno presente no MHC; b) Ativação da célula T CD4<sup>+</sup>, pela ligação do complexo peptídeo/MHC ao TCR e das moléculas co-estimulatórias B7 à CD28. Fonte: adaptado de ANDERSEN et al. (2006).

Os precursores das células T que deixam a medula óssea e migram para o timo, são diferenciados em células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (PALMER, 2003). O fenótipo CD4 geralmente corresponde à função da célula T “*helper*” (T<sub>H</sub>) enquanto a célula CD8 corresponde à função de célula T citotóxica (CTL) (KEENAN; LONG; KELLEHER, 1997).

As células T<sub>H</sub> produzem citocinas que são importantes para o início da resposta imune humoral e celular. As citocinas são glicoproteínas, que são reguladoras intercelulares cruciais e mobilizadoras de células engajadas na imunidade bem como na resposta inflamatória adaptativa do hospedeiro, crescimento, diferenciação e morte celular; angiogênese e processos de desenvolvimento e reparo que auxiliam a restauração da homeostase (ECKMANN; KAGNOFF, 2001; OPPENHEIM, 2001). As citocinas são de baixo peso molecular e embora sejam ocasionalmente produzidas constitutivamente, elas são, geralmente produzidas por qualquer tipo celular nucleado em resposta a um estímulo ofensivo (GIULIETTI et al., 2001; OPPENHEIM, 2001).

Após serem sintetizadas e/ou secretadas em resposta a um estímulo imune ou inflamatório, as citocinas podem agir à distância e modular a natureza e a intensidade da resposta imune (ASHWELL; LU; VACCHIO, 2000; BOYMAN et al., 2007).

A ativação das células T<sub>H</sub> é finamente regulada. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> “*naive*” tornam-se ativados somente se, concomitantemente à ligação do TCR ao complexo MHCII-peptídeo, houver a expressão e ligação de moléculas co-estimulatórias na superfície das APCs (STOCKWIN et al., 2000).

As células T são heterogêneas, considerando-se a produção e liberação de citocinas e suas funções (WANG et al., 2004). As células T helper CD4<sup>+</sup> se subdividem ainda em populações que podem ser distinguidas com base no padrão de citocinas que elas produzem (SERFLING et al., 2000). As células T<sub>H1</sub> produzem IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ , T<sub>H2</sub> produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (SERFLING et al., 2000), T<sub>H3</sub> produz TGF- $\beta$  e T<sub>H17</sub> produz IL-17 (VAN ROON; BIJLSMA; LAFEBER, 2006). A produção de IFN- $\gamma$  pelas células TH1, pode amplificar o desenvolvimento das células TH1 e inibir a proliferação celular de TH2, enquanto que, a produção de IL-4 pelas células TH2, bloqueia a função inflamatórias das células TH1 (YAZDANBAKHS; RODRIGUES, 2001). A diferenciação das células T helper para T<sub>H1</sub> ou T<sub>H2</sub> efectoras é induzida pela presença de diferentes citocinas no momento do reconhecimento do antígeno (SERFLING et al., 2000). As células T<sub>H1</sub> são fortemente induzidas pela IL-12, e são importantes para a imunidade contra microrganismos intracelulares, envolvendo a resposta inflamatória e a destruição de células infectadas. As respostas de T<sub>H2</sub>, direcionadas por IL-4, são importantes para a imunidade contra

microrganismos extracelulares, envolvendo primariamente produção de anticorpos e ativação de granulócitos (KEENAN; LONG; KELLEHER, 1997).

A Interleucina-2 (IL-2) é uma citocina sintetizada e secretada primariamente pelos linfócitos  $T_H1$  e, em menor quantidade pelas células  $CD8^+$ , sendo um importante fator de crescimento (SCHLUNS; LEFRANCOIS, 2003; MALEK, 2008), responsável pela expansão clonal das células T e diferenciação das células T *naive* em células efetoras e de memória (CHO et al., 2007; KAMIMURA; BEVAN, 2007) além de ser o pivô central da regulação e geração das respostas imunes (OKUMA; NOMURA, 2001). É o principal mediador de resposta imunológica envolvendo muitas doenças inflamatórias crônicas (LEWIS et al., 1993).

A IL-2 foi descoberta em 1976 por Morgan e colaboradores (MORGAN; RUSCETTI; GALLO, 1976) que inicialmente a denominaram de Fator de Crescimento da Célula T (TCGF). Em 1983, Taniguchi e colaboradores (TANIGUCHI et al., 1983) isolaram o DNA complementar da IL-2 humana a partir da linhagem celular leucêmica Jurkat e estabeleceram a sequencia nucleotídica do gene.

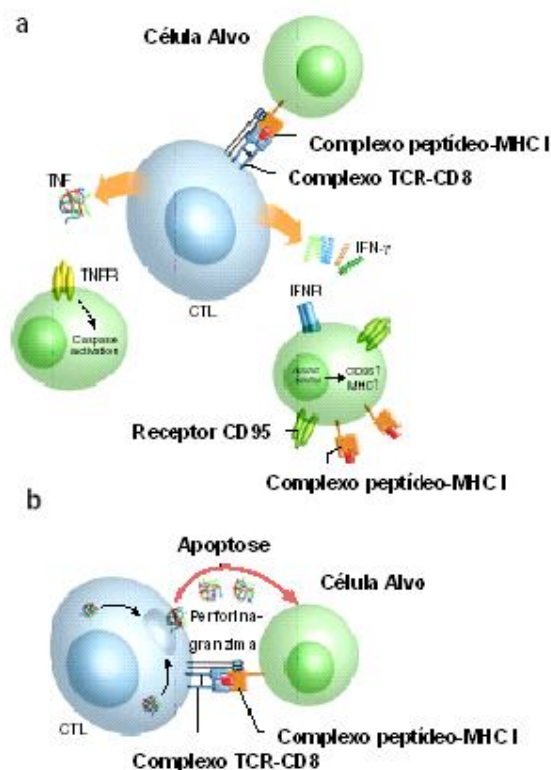
Sua ativação inicia-se pela estimulação da interação do TCR com o complexo peptídeo-MHC das células APCs, estimulando a transcrição do gene IL-2 e a síntese da proteína. As atividades biológicas da IL-2 são mediadas através da ligação ao receptor IL-2R (MATSUDA et al., 1998; SMITH, 2004; MALEK, 2008). O IL-2R é formado por três subunidades de glicoproteínas transmembrana ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) que fornecem a alta afinidade do receptor (TANIGUCHI; MINAMI, 1993). A IL-2 atua sobre as células B tanto como fator de crescimento quanto como estímulo para a síntese de anticorpos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

A produção e secreção de IL-2 ocorrem somente quando há a presença de sinais estimulatórios enviados pelo TCR e moléculas co-estimulatórias, caso contrário ocorre o silenciamento transcricional do gene da IL-2 e o mRNA presente é degradado (MALEK, 2008).

A regulação da resposta imune pelas células  $T_H1$  e  $T_H2$  permitem que, após a remoção de um agente infeccioso, o sistema imune fique em um estado de memória imunológica (KEENAN; LONG; KELLEHER, 1997). Esta memória pode ser definida como uma resposta rápida e forte do sistema imune através do reconhecimento de um mesmo patógeno (DUTTON; BRADLEY; SWAIN, 1998). Já os linfócitos T  $CD8^+$  estão envolvidos na eliminação de células infectadas por vírus (CASTELLI et al., 2000). Eles mediam a lise das células-alvo por três caminhos distintos. Dois envolvem o contato direto entre a célula-alvo e



a CTL e o terceiro é mediado por citocinas, como IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que são produzidas e secretadas pela estimulação do TCR (Figura 2.a). TNF- $\alpha$  liga-se ao receptor da célula-alvo e inicia a cascata de ativação de caspases, levando a apoptose. Além disso, a atividade citolítica pode se dar pela ligação do Fas-ligante (Fas-L) expresso na superfície das CTLs com seu receptor Fas (CD95), presente na célula-alvo (NAGATA, 1996). Já o IFN- $\gamma$ , induz a transcrição de MHC I, acarretando na apresentação endógena de peptídeos da célula-alvo e aumento da lise celular mediada pela enzima ácido graxo sintase (Fas) (ANDERSEN et al., 2006). No outro caso, a CTL libera perforinas e granzimas no espaço intercelular (Figura 2.b). Estas proteínas são altamente citotóxicas, pois a primeira forma um poro na membrana por onde as granzimas são internalizadas e digerem a célula internamente. As CTLs possuem um elaborado mecanismo para proteção própria e das células vizinhas contra seus próprios mecanismos citotóxicos (BLOTT; GRIFFITHS, 2002).



**Figura 2:** Lise da célula-alvo por contato direto e citocinas pelo linfócito T citotóxico: a) Morte da célula-alvo por meio da liberação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ; b) Liberação das enzimas perforina e granzima no espaço intercelular, pelo contato célula-célula. Fonte: adaptado de ANDERSEN et al. (2006).

### 2.1.3. Ativação de linfócitos:

A ativação dos linfócitos é controlada por uma cascata de sinalização iniciada por receptores antigênicos e moléculas co-estimulatórias (ACUTO; CANTRELL, 2000; ISAKOV; ALTMAN, 2002). A falha na ligação em qualquer um destes sinais, não se reflete na ativação, mas num estado de anergia celular (SCHWARTZ, 2003). Quando ativados, expressam moléculas de superfície, tais como MHC II, CTLA-4 e CD154, dentre outras. Na periferia, para a ativação de células maduras são necessários pelo menos dois sinais simultâneos (ACUTO; MICHEL, 2003). O primeiro sinal resulta da interação do TCR com o complexo peptídeo-MHC e o segundo sinal é fornecido por moléculas co-estimulatórias, como CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), ICAM-1, ICOS e CD40 expressos na superfície das APCs. Estas moléculas interagem com seus ligantes expressos na superfície da célula T, como CD28, LFA-1, ICOSL e CD40L, respectivamente (KANDULA; ABRAHAM, 2004).

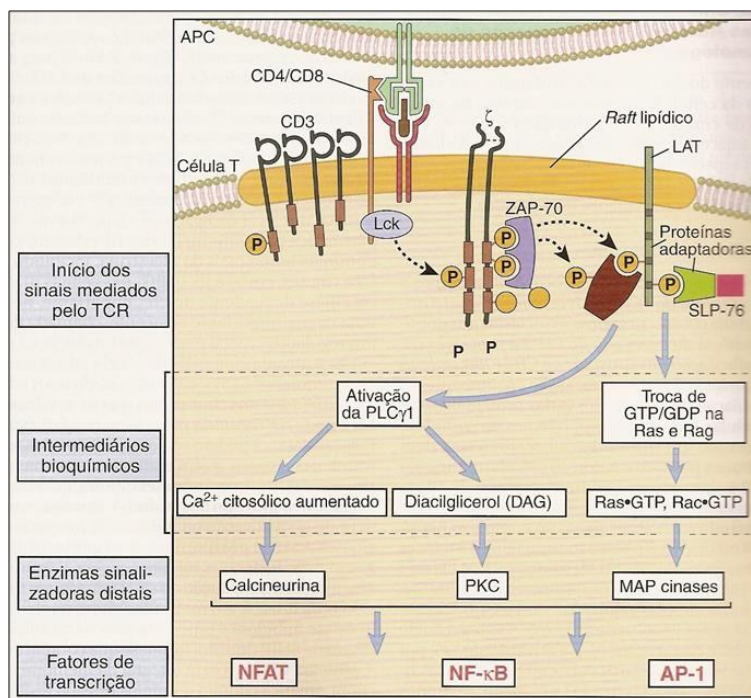
Independentemente do tipo de linfócito T (CD4 ou CD8), após a ligação do TCR com o complexo MHC, quinases ligadas à porção intracelular do complexo CD3 e das moléculas co-estimulatórias são ativadas e acabam levando à ativação destas células (COOMBS et al., 2002). Este evento de sinalização intracelular (Fig. 3) começa com a fosforilação de regiões específicas dos imunoreceptores, ligados à tirosinas (ITAMs), localizados no domínio intracelular de cadeias de CD3 $\zeta$  e por Lck quinase associados aos TCRs. A fosforilação dos ITAMs conduz ao recrutamento e a ativação da quinase ZAP 70, que catalisa a fosforilação de proteínas responsáveis pelo aumento da concentração intracelular de Ca<sup>++</sup> e a ativação de três fatores de transcrição, AP-1, NF-AT e NF- $\kappa$ B, que estão envolvidos na proliferação de células T e na produção de citocinas (IWASHIMA, 2003).

O fator nuclear das células T ativadas (NF-AT) é um fator de transcrição necessário para a expressão dos genes da IL-2, IL-4, TNF, além de outras citocinas (PROKSCH et al., 2005). O NF-AT está presente no citoplasma dos linfócitos T em repouso de forma inativa, pela fosforilação de uma serina. A fosfatase calmodulina-calcineurina-Ca<sup>2+</sup>-dependente desfosforila o NFAT citoplasmático permitindo translocar-se para o núcleo (FIEDLER et al., 2002). Uma vez no núcleo, o NF-AT ativo liga-se às regiões reguladoras dos genes das citocinas IL-2, IL-4 e de outras, geralmente em associação com outros fatores de transcrição, como AP-1 (SHAPIRO; MOLLENAUER; WEISS, 1998).

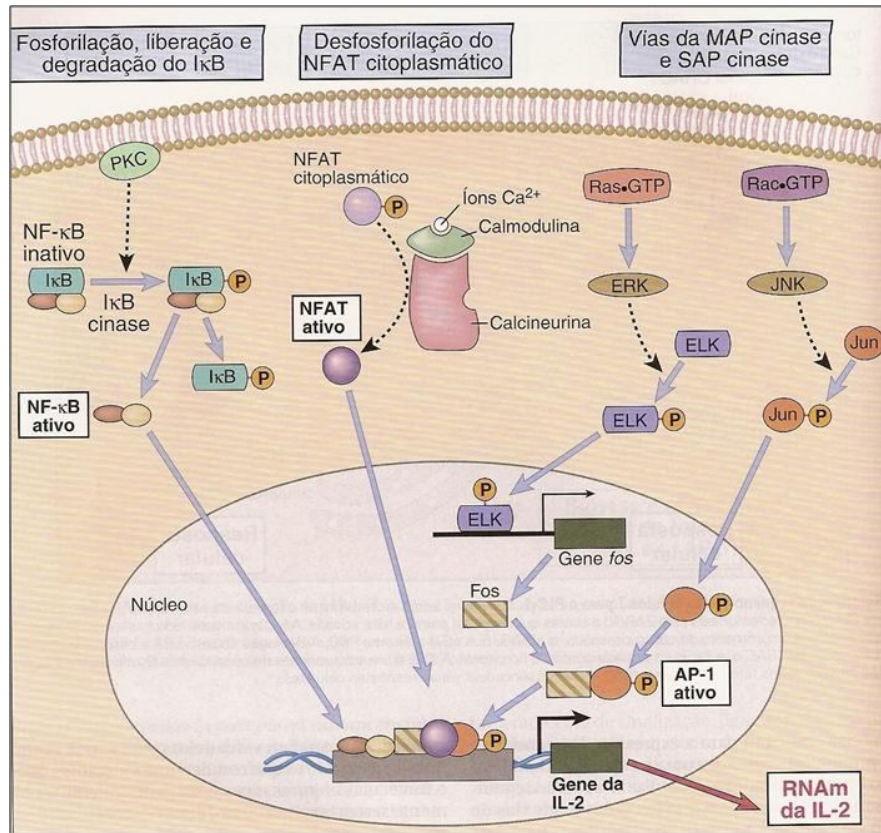
O AP-1 é um dímero formado pelas proteínas Fos e Jun e são importantes para o ciclo de proliferação e apoptose da célula. A transcrição da AP-1 é induzida em resposta a vários estímulos (SHAULIAN; KARIN, 2002). A ZAP-70, que é ativada pelo reconhecimento do

antígeno, fosforila as proteínas adaptadoras associadas à membrana, onde ocorre a conversão da Ras-GDP em Ras-GTP que ativa uma cascata de enzimas, culminando na produção do componente da AP-1. Uma via Rac paralela gera o segundo componente ativo da AP-1 (LEE et al., 2000).

Outro fator, o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), está presente no citoplasma das células T de forma inativada, complexado a outras proteínas chamadas inibidores de  $\kappa$ B (I $\kappa$ Bs). Estes inibidores ligam-se no domínio RHD do NF- $\kappa$ B e impedem a translocação nuclear (MAGNANI et al., 2000). Para a ativação do NF- $\kappa$ B, é necessário a degradação das proteínas I $\kappa$ Bs. Através dos sinais do TCR ocorre a fosforilação da proteína I $\kappa$ B, onde a ubiquitina liga-se e desta forma, sinaliza para a degradação no proteossoma (TRAENCKNER; WILK; BAEUERLE, 1994). O NF- $\kappa$ B livre responde a sinais extracelulares e transloca-se para o núcleo, onde regula a transcrição de genes específicos, incluindo moléculas de adesão, citocinas inflamatórias, quimiocinas, interferons e proteínas do MHC (MAGNANI et al., 2000).



**Figura 3:** Eventos da sinalização intracelular durante a ativação da células T - A ligação do TCR e de co-receptores (CD4/CD8) ao complexo peptídeo-MHC nas células apresentadoras de antígenos (APCs) inicia a fosforilação da cadeia  $\zeta$ , ligação e ativação do ZAP-70, fosforilação das proteínas adaptadoras e ativação de várias enzimas celulares. Estas enzimas ativam fatores de transcrição que estimulam a expressão de vários genes envolvidos nas respostas das células T. Fonte: adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2008).



**Figura 4:** Ativação dos fatores de transcrição nas células T - Várias vias de sinalização convergem nas células T estimuladas por antígenos para gerar fatores de transcrição que estimulam a expressão de vários genes (neste caso, o gene da IL-2). A via  $Ca^{2+}$ -calmodulina ativa NF-AT e as vias Ras e Rac ativam os dois componentes da AP-1. O NF- $\kappa$ B é mostrado como um complexo de duas subunidades (p50 e p65) e PKC é importante na ativação das células T. Esses fatores de transcrição funcionam coordenadamente para regular a expressão do gene. GDP-difosfato de guanossina; GTP-trifosfato de guanossina; PKC-proteína quinase C. Fonte: adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2008).

Com base no tempo de aparecimento após a estimulação, os genes envolvidos com a ativação de linfócitos T podem ser denominados imediatos, precoces ou tardios (Quadro 1).

Deste modo, a ativação das células T inclui os seguintes passos:

- Eventos de transdução de sinais precoces;
- Ativação transcricional de uma variedade de genes;
- Expressão de novas proteínas;
- Indução da atividade mitótica.

**Quadro 1:** Genes representativos expressos por ativação de linfócitos T. Abreviações: GM-CSF: Fator Estimulante de Colônia Granulócitos e Monócitos; HLA: Antígeno Leucocitário Humano; IFN- $\gamma$ : Interferon-  $\gamma$ ; IL; Interleucina; VLA: Ativação Tardia. Fonte: adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2008).

Nome	Categoria Funcional	Tempo de Detecção precoce de mRNA depois da estimulação de Células T	Localização	Aumento depois da ativação
c-fos	Proteína de ligação nuclear	15 min (Imediato)	Núcleo	< 100
c-myc	Oncogene celular	30 min (Imediato)	Núcleo	20
<b>IL-2</b>	<b>Citocina</b>	<b>45 min (Precoce)</b>	<b>Secretado</b>	<b>&gt;1000</b>
IFN- $\gamma$	Citocina	30 min (Precoce)	Secretado	>100
IL-3	Citocina	1-2 horas (Precoce)	Secretado	>100
IL-4	Citocina	<6 horas (Precoce)	Secretado	>100
IL-5	Citocina	<6 horas (Precoce)	Secretado	>100
GM-CSF	Citocina	<20 horas (Precoce)	Secretado	?
HLA-DR	Molécula de MHC classe II	3-5 dias (Tardio)	Membrana plasmática	10
VLA-1	Molécula de adesão	7-14 dias (Tardio)	Membrana plasmática	?

A tradução de mRNA em proteínas é um importante processo regulado pela ativação dos linfócitos. As células T estão normalmente quiescentes, com baixas taxas de RNA, proteína e pouca síntese de DNA. Entretanto, quando elas são ativadas, imediatamente ocorre um aumento da síntese protéica, importante para a proliferação (VARESIO; HOLDEN; TARAMELLI, 1980). A transcrição de genes imediatos são assim denominados, por não requerem a síntese protéica para sua estimulação, enquanto os genes precoces e tardios requerem, logo após a célula em repouso ser estimulada por sinais extracelulares. Estas distinções ocorrem provavelmente devido à resposta dos genes de expressão imediatos serem pré-formados e poderem ser ativados para a síntese de novas proteínas. Os outros fatores de transcrição, por exemplo, responsáveis pela expressão dos genes precoces precisam ser sintetizados. Os genes imediatos e precoces são transcritos previamente à mitose e os genes tardios, depois da proliferação celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

## 2.2. Atividade imunomodulatória de produtos naturais:

Em decorrência da grande diversidade química dos produtos oriundos da biodiversidade, eles constituem uma fonte inesgotável de compostos com atividades biológicas e farmacológicas promissoras, não apenas pelo grande número de espécimes com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos sintetizados (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Uma das estratégias na busca de novos fármacos derivados de produtos naturais é baseada no estudo de extratos de plantas medicinais (VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1991). Estes extratos constituem uma grande fonte de metabólitos primários e secundários, com diferentes ações biológicas e farmacológicas. A título ilustrativo, pode-se citar as atividades antioxidantes e antiviral dos flavonóides (SHAHAT et al., 2002) e de compostos fenólicos (SAVI et al., 2005), antiviral dos alcalóides (MCCORMICK et al., 1996) e taninos (LIU et al., 1999), entre outros. No entanto, a ação de produtos naturais sobre células do sistema imune tem sido pouco estudada. As técnicas mais comumente empregadas para avaliar a modulação de células imunes baseiam-se na detecção da produção de citocinas (DELARCHE; CHOLLET-MARTIN, 1999), que geralmente requerem a obtenção de linfócitos diretamente dos órgãos linfóides de animais ou do sangue periférico de humanos (KUO et al., 2001). No entanto, variações nas fontes de obtenção destas células certamente levam a uma baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos, dificultando análises comparativas (DELARCHE; CHOLLET-MARTIN, 1999).

Compostos imunomoduladores podem aumentar a resposta imune e serem produzidos endogenamente no corpo por células imunes, ou de forma exógena, por bactérias, fungos, algas ou plantas (LEUNG et al., 2006), sendo considerados importantes para o tratamento do câncer e de doenças infecciosas (HARADA et. al., 2002 a, b; 2006). Dentre os compostos imunomodulatórios exógenos conhecidos, os polissacarídeos são os de maior ocorrência na natureza e, entre os principais imunomoduladores derivados de fungos, estão as  $\beta$ -glucanas e as  $\alpha$ -mananas (KIM et al., 2006; LEUNG et al., 2006).

As  $\beta$ -glucanas, os carboidratos e outros componentes das paredes celulares de leveduras, fungos filamentosos e alguns cereais (por exemplo: aveia e cevada) têm sido extensivamente investigados por suas atividades imunomoduladoras. Especialmente, as  $\beta$ -glucanas com diferentes pesos moleculares e estruturas secundárias, isoladas de várias fontes naturais, são reconhecidas por sua capacidade de ativar mecanismos da defesa imune contra infecções parasitárias e microbianas (YUN et al., 2003).

### 2.3. Abordagens para avaliação da atividade imunomodulatória sobre células T:

Os imunomoduladores podem ser importantes na prevenção e tratamento de doenças decorrentes de imunodeficiências (CHIRIGOS, 1992). Os efeitos imunomodulatórios modificam o comportamento biológico, afetando a resposta imunológica de modo positivo (ativação) ou negativo (inibição) do sistema imune.

Muitos fármacos antineoplásicos, por causarem inibição da proliferação celular, são considerados como imunossupressores (TURK, 1979). Outros possuem efeitos estimulatórios, induzindo a produção de citocinas que influenciam a imunidade celular (COEUGNIET; ELEK, 1987).

Alguns produtos naturais vêm sendo estudados para avaliar seus potenciais efeitos imunomodulatórios, tendo em vista suas comprovadas ações anti-inflamatória, antiestresse e antineoplásica, através da modulação das funções imunes (SINGH; ATAL, 1986). Tais estudos podem ser realizados através de técnicas *in vivo* ou *in vitro*.

As técnicas *in vivo* vêm sendo utilizadas há muito tempo. A substância em estudo é administrada no animal, geralmente camundongos, e é feita a análise do comportamento das células do sistema imune. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Konys e colaboradores (1981), que aplicaram ciclofosfamida intraperitonealmente em camundongos e, durante o ciclo de maior eliminação dos linfócitos, administraram uma dose-reforço, por via intravenosa. Após a administração, foi determinado o número de células no baço e linfonodos e o título de anticorpos no soro. Foi observado que a ciclofosfamida induziu a depleção do número de células nos tecidos linfóides e a produção de anticorpos no soro, porém não alterou a cinética da produção de anticorpos no baço e linfonodos.

A avaliação dos efeitos imunomodulatórios *in vitro* era feita através da análise da proliferação ou da inibição celulares (HOUSE; THOMAS; BHARGAVA, 1995) e pela produção de proteínas, tais como as citocinas (GILLIS; WATSON, 1980). No trabalho de Ferrua e colaboradores (1987), por exemplo, foi detectada através de imunoensaio, a presença de interleucina-2 nos sobrenadantes de células Jurkat e de linfócitos periféricos humanos, ativados com concanavalina A, mas somente quando foram ativadas com concentrações superiores a 10µg/ml da mesma.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, estes efeitos passaram a ser avaliados através da expressão de mRNA (WALTERSCHEID; NGHIEM; ULLRICH, 2002), tornando-a uma ferramenta muito útil para se analisar a modulação da resposta imune celular.

Neste estudo, propõe-se a utilização de uma linhagem de linfócitos T humanos (células Jurkat) para padronização da reação de RT-PCR, de forma a possibilitar a detecção da modulação destas células. Este ensaio *in vitro* será utilizado para a triagem de compostos naturais ou sintéticos com potencial capacidade imunomodulatória em células Jurkat.



**OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1. Objetivo Geral:**

Padronizar a técnica de RT-PCR para triagem *in vitro* de substâncias de origem natural ou sintética com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos T.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

3.2.1. Avaliar o efeito citotóxico dos galatos e das amostras de polissacarídeos de *Agaricus blazei* sobre células Jurkat utilizando-se ensaios *in vitro*;

3.2.2. Padronizar a técnica de RT-PCR na detecção da expressão/inibição do mRNA da interleucina-2, para utilização na triagem de compostos naturais ou sintéticos com potencial atividade imunomodulatória;

3.2.3. Avaliar a atividade imunomodulatória dos galato e dos polissacarídeos de *Agaricus blazei* sobre células Jurkat, por meio da técnica de RT-PCR;

3.2.4. Avaliar a atividade imunomodulatória dos galato e dos polissacarídeos de *Agaricus blazei* sobre células Jurkat, através da imunofenotipagem por citometria de fluxo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **4.1. CULTURA CELULAR:**

#### **4.1.1. Linhagem celular:**

A linhagem celular utilizada foi a JURKAT, obtida do banco de células RJBC (Banco de células do Rio de Janeiro), sob o cadastro de número CR063, lote 04/07/06. Ela é derivada do tecido hematopoiético humano, da medula óssea, sendo considerada linfoblasto. São células leucêmicas que produzem interleucina-2 (IL-2), após estimulação com lectinas, tal como a fitohemaglutinina (PHA) e grandes quantidades desta citocina quando utilizados simultaneamente ésteres de forbol e anticorpos monoclonais contra o antígeno CD3, mimetizando o envio de sinais sinérgicos (ABRAHAM; WEISS, 2004).

#### **4.1.2. Cultura celular:**

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Cultilab), suplementado com bicarbonato de sódio (2 g/l - Merck), L-glutamina (0,3 g/l - Sigma), ácido pirúvico (0,11 g/l - Sigma) e HEPES (2,3 g/l - Biosolve).

Ao meio foram adicionados 10% (V/V) de soro fetal bovino (Cultilab) e 0,1% (V/V) de gentamicina (40 mg/ml) (Schering-Plough).

As subculturas foram feitas duas vezes por semana, a partir da homogeneização da suspensão celular e transferência de  $1 \times 10^5$  células/ml para uma nova garrafa de cultura, mantida à temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.2. ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS JURKAT POR CITOMETRIA DE FLUXO:**

A caracterização fenotípica das células Jurkat foi determinada por citometria de fluxo, pelo método de tripla marcação com anticorpos monoclonais (AcMo), diretamente marcados com diferentes fluorocromos e dirigidos contra antígenos de células T, listados no Quadro 2.

**Quadro 2:** Reagentes utilizados na caracterização fenotípica de células Jurkat por citometria de fluxo

<b>Anticorpo Monoclonal</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Fabricante</b>
<b>CD3</b>	UCHT1	PerCP	Beckman Coulter
<b>CD4/CD8/CD3</b>	SK3/SK1/SK7	FITC/PE/PerCP	BD
<b>CD2</b>	S5.2	PE	BD
<b>TdT</b>	HT-6	FITC	DAKO
<b>CD5</b>	L17F12	PE	BD
<b>CD1a</b>	HI149	FITC	Pharmingen
<b>CD7</b>	8H8.1	FITC	BD
<b>TCR<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b>	WT31	FITC	BD
<b>TCR<math>\gamma</math>/<math>\delta</math></b>	11F2	PE	BD

Para a análise imunofenotípica, foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células/ml, centrifugadas por 10 minutos a 260 X g e lavadas uma vez com PBS estéril. Para a marcação na membrana, as células foram incubadas simultaneamente com 10  $\mu$ l de cada AcMo (CD4/CD8/CD3; TdT/CD2/CD3; CD1a/CD5/CD3; CD7/CD5/CD3; TCR $\alpha$  $\beta$ /TCR $\gamma$  $\delta$ /CD3), durante 10 minutos a 20°C, no escuro. As células foram então lavadas com 3000  $\mu$ l de PBS e centrifugadas a 260 X g por 5 min. Em seguida, suspensas em 500  $\mu$ l de PBS para aquisição em citômetro de fluxo. Para a marcação intracitoplasmática da molécula TdT, após as células serem marcadas com os AcMo de membrana (CD2/CD3), as células foram fixadas e permeabilizadas para dar acesso do anticorpo às estruturas intracelulares, de acordo com recomendações do fabricante (Fix e Perm; Caltag GAS001 e GAS002), acrescentados 10  $\mu$ l do AcMo TdT e incubado por 20 minutos a 20°C, no escuro. As células foram lavadas com 3000  $\mu$ l de PBS, centrifugadas a 260 X g por 5 min. e posteriormente, suspensas em 500  $\mu$ l de PBS para aquisição em citômetro de fluxo.

As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), totalizando 30.000 eventos, utilizando-se o programa CellQuest™ (BD), e os dados analisados com o programa FlowJo® versão 8.6.3 (© Tree Star. Inc).

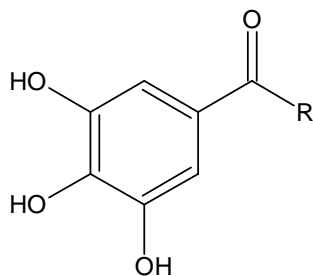
Esta etapa do trabalho foi realizada no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), com a colaboração técnica das estudantes de mestrado em Biotecnologia Silvia Regina Lanza e Renata da Silva; a análise dos resultados foi realizada com o auxílio da Dra. Silvia Ferreira.

### 4.3. COMPOSTOS TESTADOS:

#### 4.3.1. Galatos:

O ácido gálico é um composto fenólico tri-hidroxiado (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico), obtido através da hidrólise ácida ou alcalina de taninos, presentes em várias espécies vegetais. Seus n-alkil ésteres são também conhecidos como galatos (SAVI et al., 2005).

Os galatos, cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 5, foram utilizados para a avaliação da sua citotoxicidade e atividade imunomodulatória.



Radical (R)	Composto
H	Ácido Gálico
CH <sub>3</sub>	Galato de Metila
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Galato de Etila
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Galato de Propila
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Galato de Butila
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	Galato de Pentila
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	Galato de Hexila
C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	Galato de Heptila
C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	Galato de Octila
C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>	Galato de Nonila
C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	Galato de Decila
C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	Galato de Undecila
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	Galato de Dodecila
C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	Galato de Tetradecila
C <sub>18</sub> H <sub>33</sub>	Galato de Octadecila

**Figura 5:** Estrutura dos galatos testados neste trabalho

As amostras foram gentilmente cedidas pelo doutorando Paulo César Leal, que as sintetizou (SAVI et al., 2005), orientado pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes (QMC/CFM/UFSC).

#### 4.3.2. Polissacarídeos de *Agaricus blazei* Murrill:

*Agaricus blazei* é um cogumelo comestível, conhecido comercialmente no Brasil como cogumelo-do-sol, e no Japão como *himematsutake*. É uma espécie nativa no sudeste do Brasil, sendo amplamente utilizado como alimento (LAKHANPAL; RANA, 2005).

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um grupo considerável e importante da biosfera, tais como a celulose e o amido das plantas, o glicogênio dos animais e as glucanas dos fungos. Esses polímeros são constituídos de unidades monossacarídeas, unidas por ligações glicosídicas, diferindo entre si na unidade e no grau de ramificação destas, no tipo de ligações que as unem e no comprimento de suas cadeias, apresentando diferentes composições e funções (DA SILVA et. al. 2006).

Neste trabalho será utilizada a denominação *Agaricus blazei* por ser mais frequentemente utilizada em artigos científicos e por ter sido a espécie da primeira identificação.

As amostras testadas neste estudo (Quadro 3), foram gentilmente cedidas pela doutoranda Carla Máisa Camelini, responsável pela sua extração, purificação e caracterização, sob a orientação da Prof. Dra. Margarida Matos Mendonça (Laboratório de Bioprocessos/ MIP/ CCB/UFSC).

**Quadro 3:** Amostras de polissacarídeos de *Agaricus blazei* testados neste trabalho.

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

#### 4.4. ENSAIO COLORIMÉTRICO:

##### 4.4.1. Avaliação da ativação celular *in vitro* através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT):

A avaliação da ativação celular foi realizada através do ensaio do MTT, proposto por Mosmann (1983) e modificado por Van de Loosdrecht et al. (1991) e Khajuria et al. (2007), com algumas alterações descritas a seguir.

Primeiramente, as células T foram incubadas em diferentes densidades celulares, sem estímulo celular, para estabelecer a densidade celular adequada a ser utilizada nos ensaios posteriores. Foram testadas as densidades de  $1 \times 10^6$  a  $9,76 \times 10^2$  células/cavidade, realizando-se diluições na razão 1:2.

Posteriormente, foram testadas diferentes concentrações da fitohemaglutinina (PHA) (Sigma), com o objetivo de se estabelecer a melhor concentração deste mitógeno a ser utilizada como controle positivo de estimulação celular. As concentrações da PHA avaliadas foram de 20 a 0,156  $\mu\text{g/ml}$ , diluídas na razão 1:2, e distribuídas em placas de 96 cavidades (100  $\mu\text{l}$ /cavidade). Em seguida, foram adicionadas as células.

Em todas as análises, exceto quando especificado, as placas com as células foram mantidas a  $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$  por 72 horas. Após este período, as células foram homogeneizadas e foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  da solução de MTT/cavidade (Sigma), a 5 mg/ml em meio RPMI 1640. As placas foram mantidas por mais 4 horas, nas mesmas condições. Em seguida, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 400 X g, e os sobrenadantes foram retirados por inversão das placas com secagem do excesso em papel toalha. Para a solubilização dos cristais de formazana, 100  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfóxido (DMSO - Merck) foram adicionados a cada cavidade. As placas foram agitadas levemente, à temperatura ambiente, por 5 minutos, para que toda a formazana fosse solubilizada e, em seguida, foram lidas em espectrofotômetro a 540nm (Bio-Tek, El<sub>x</sub> 800).

Em todos os ensaios foram realizados controles celulares (100  $\mu\text{l}$  meio RPMI 1640/cavidade e 100 $\mu\text{l}$  de suspensão celular) e branco (100  $\mu\text{l}$  de DMSO/cavidade).

Os valores de absorbância, medidos para cada concentração das amostras, foram transformados em porcentagens de viabilidade celular (X%), em relação aos controles



celulares, através da seguinte fórmula, que considera a média dos controles como 100 % de viabilidade:

$$X\% = \frac{\text{D.O. Controle Celular}}{\text{D.O. Amostra Teste}} \times 100$$

Onde D.O. = densidade óptica

Em seguida, os percentuais calculados, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico de concentrações *versus* porcentagens de viabilidade.

#### **4.4.2. Determinação da citotoxicidade de fármacos imunossupressores, através do ensaio do MTT:**

Como controle positivo da inibição, foram testados três conhecidos fármacos imunossupressores: Ciclosporina A (CsA - Sigma), Dexametasona (DEX - EMS) e Cortisona (COR - EMS). Estes compostos foram inicialmente distribuídos em placas de 96 cavidades (100µl/cavidade, 250 a 0,12 µg/ml – diluição 1:2). Após, foram adicionados 100 µl da suspensão celular (5x10<sup>4</sup> células/cavidade). Além dos controles celulares e do branco, já citados anteriormente, foi também realizado outro controle com DMSO (100 µl DMSO 2% e 100µl de suspensão celular), já que os fármacos testados foram dissolvidos neste solvente e nesta concentração.

Os valores de absorbância das amostras, foram transformados em porcentagens de viabilidade celular (X%), em relação aos controles celulares, como demonstrado no item 4.4.1. Os percentuais calculados, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico de concentrações *versus* porcentagens de viabilidade

#### **4.4.3. Determinação da citotoxicidade dos galatos, através dos ensaio do MTT e do Vermelho Neutro:**

Para o ensaio do MTT, os galatos foram diluídos, a partir de 250 até 0,0032 µM (razão 1:5) e distribuídos em placas de 96 cavidades (100 µl/ cavidade). Foram, então, adicionadas 5x10<sup>4</sup> células/cavidade/100 µl. Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.4.1.

Para o ensaio do Vermelho Neutro, a preparação das placas foi realizada nas mesmas condições descritas para o ensaio do MTT. Após o tempo de incubação de 72h, cada cavidade foi homogeneizada e, em seguida, adicionados 50 µl da solução de Vermelho Neutro/cavidade (Sigma), a 50 µg/ml em meio RPMI 1640. As placas foram mantidas por mais 3 horas, nas mesmas condições. Após este período, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 400 X g, e os sobrenadantes foram retirados da mesma forma.

As células foram lavadas com PBS a 37°C para remover o excesso de corante. As placas foram mantidas sob agitação por 5 minutos e, posteriormente, centrifugadas por 5 minutos a 400 X g, e os sobrenadantes retirados por inversão das placas. Foram adicionados 100 µl de solução descorante/cavidade para fixação das células e remoção do Vermelho Neutro captado pelos lisossomos/endossomos. A solução descorante foi preparada com 50% etanol, 49% água destilada e 1% ácido acético glacial. As placas foram agitadas levemente, à temperatura ambiente, por 5 minutos e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm.

Nos dois ensaios (MTT e Vermelho Neutro), através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de  $CC_{50}$ , ou seja, a concentração da amostra que provocou citotoxicidade para 50% das células. Os valores de  $CC_{50}$  calculados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.4.4. Determinação da citotoxicidade das amostras dos polissacarídeos de *Agaricus blazei*, através do ensaio de MTT:**

As amostras foram diluídas, a partir de 2.000 até 0,0256 µg (razão 1:5) e distribuídas em placas de 96 cavidades (100 µl/cavidade). Foram, então, acrescentadas  $5 \times 10^4$  células/cavidade/100 µl. Na sequência, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.4.1.

Os valores de  $CC_{50}$  foram calculados através da análise de regressão, sendo estes representados pela média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

## **4.5. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR:**

### **4.5.1. Extração e isolamento do RNA total:**

Os reagentes e amostras utilizados foram mantidos permanentemente no gelo e manipulados durante todo o processo com luvas, a fim de evitar ação das RNAses. Além disso, os materiais utilizados na reação eram novos, previamente tratados com água DEPC (dietilpicrocarbonato) 0,1%, autoclavados e o procedimento realizado em ambiente adequado, previamente limpo com álcool 70% e separado fisicamente dos locais onde se procede as reações posteriores a transcrição reversa e amplificação via PCR.

Para as extrações de RNA total de linfócitos T foram seguidas as instruções do fabricante, sendo adicionadas de 2 a 5 x 10<sup>6</sup> células em tubo de reação contendo 1 ml do reagente Trizol® (Invitrogen) para dissociação dos complexos núcleo-protéico.

As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e foram adicionados 200 µl de clorofórmio (Merck) (para separação das fases orgânica e aquosa) para cada 1 ml de Trizol® utilizado.

As amostras foram agitadas lentamente por 15 segundos e incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente. Depois de centrifugadas as amostras, a 15000 X g por 15 minutos (4°C), a fase aquosa (camada superior, menos colorida) foi transferida para um tubo estéril. A esta fase, onde se encontra o RNA total, foram adicionados 500 µl de isopropanol (Merck), para precipitação do RNA. Seguiu-se nova incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 15000 X g por 10 minutos (4°C) e o sobrenadante descartado. O sedimento formado foi lavado duas vezes com 1 ml de etanol (Merck) 75% (diluído em água DEPC 0,1% autoclavada).

As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 6000 X g por 5 minutos (4°C). Após seco o sedimento, em estufa 37°C, o RNA obtido foi eluído em 50 µl água livre de RNase e armazenado a -80°C.

Para quantificar o RNA total obtido após o processo de extração, as amostras foram analisadas por espectrofotometria, Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) através da leitura simultânea da densidade ótica (D.O.) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, observando-se a razão entre eles.

#### 4.5.2. Tratamento do RNA com DNase:

O tratamento foi realizado para eliminação do DNA de amostras de RNA para experimentos de RT-PCR.

Após a extração do RNA, 1 µg de cada amostra foi tratada com água DEPC 0,1% autoclavada na quantidade suficiente para 10 µl, 1 µl de tampão 10X de reação DNase I (Invitrogen) e 1 U/µl de DNase I (Invitrogen). Em seguida, a amostra foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente.

Para inativar a ação da enzima DNase I, foi adicionado 1 µl de EDTA 25mM (Invitrogen) e a reação foi aquecida por 10 minutos a temperatura de 65°C.

#### 4.5.3. Sequências dos pares de iniciadores específicos utilizados:

Os iniciadores específicos para IL-2 e β-actina (PALUDAN et al., 2001; ELLIOTT et al., 2004) foram analisados no *GenBank* e construídos pela Invitrogen, de acordo com as sequências apresentadas no Quadro 4.

**Quadro 4:** Sequências dos iniciadores específicos utilizados nas reações de RT-PCR

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Amplificação do segmento
IL-2	Sense	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT	457 pb
	Anti-sense	GTTAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC	
β-actina	Sense	CCAACCGTGAAAAGATGACC	616 pb
	Anti-sense	GCAGTAATCTCCTTCTGCATCC	

#### 4.5.4. Detecção da expressão da IL-2, através da reação de RT-PCR:

Para a realização da transcrição reversa foram testados três iniciadores na construção do cDNA: Iniciadores específico anti-sense IL-2 (Invitrogen), randômico (Invitrogen) e Oligo dT (Invitrogen).

A sequência do iniciador IL-2, apresentado no Quadro 4, possui 25 pb e se liga especificamente ao RNA, construindo um cDNA característico da IL-2. Já o iniciador randômico, é uma sequência de 6 oligodeoxiribonucleotídeos, que se ligam aleatoriamente nos três RNAs existentes, mensageiro, transportador e ribossômico, enquanto que, o iniciador

Oligo dT possui uma repetição de 12-18 bases de timina (T), que se liga à região de seqüência repetida da base nitrogenada Adenina (A), existente em toda molécula de RNA mensageiro.

A reação de transcrição reversa foi realizada em três etapas: (1) em microtubo estéril, foram acrescentados 2 pmoles de iniciador específico IL-2, 250 ng de iniciador randômico ou 500 µg/ml de Oligo dT, 500 ηg/µl de RNA total extraído, 10mM de deoxinucleotídeos trifosfatados, dATP, dTTP, dCTP, dGTP em quantidades equimolares (0,50mM cada) (Invitrogen) e água livre de RNases para um volume final de 12 µl. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas por 5 segundos a 10000 X g à temperatura ambiente. Foram então, submetidas a um ciclo de 65°C por 5 minutos em um termociclador *Master Cycler Gradient* (Eppendorf, Hamburg).

Após essa etapa, na qual o iniciador se ligou à região alvo do RNA, foram adicionados à solução, o tampão de reação da enzima (Invitrogen), concentrado 5X, 0,1M de ditionitretol (DTT) (Invitrogen) e 40U/µl de RNase OUT (Invitrogen) que auxilia na manutenção da integridade do RNA, inibindo a ação de ribonucleases. Na seqüência, esta solução foi homogeneizada, centrifugada por 5 segundos à 10000 X g e em seguida incubada à 37°C por 2 minutos.

Posteriormente, foram acrescentadas 200 U da enzima transcriptase reversa M-MLV RT (*Moloney murine leukemia virus*) (Invitrogen), a mistura foi homogeneizada, centrifugada por 5 segundos a 10000 X g. Quando foi utilizado o iniciador randômico, incubou-se por 10 minutos à 25°C e em seguida, os três tubos foram submetidos a um ciclo de 50 minutos a 37° C e posteriormente 15 minutos a 70° C. Ao final da reação, o DNA complementar (cDNA) foi armazenado à -20° C, compondo um banco de cDNA para posterior utilização nas reações de PCR.

#### **4.5.5. Amplificação do segmento gênico do marcador de ativação via RT-PCR:**

Na padronização da metodologia de RT-PCR para detecção da expressão do marcador de ativação celular (IL-2), inicialmente a reação foi realizada com 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) acrescentado ao tampão da enzima *Taq* DNA Polimerase 10X (200 mM Tris HCl, 500 mM KCl e pH 8,4) (Invitrogen) com 10 pmoles/µl de cada iniciador específico, 2 mM da mistura com os deoxinucleotídeos trifosfatados (0,50 mM de cada dNTP) (Invitrogen), 1 U/µl da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 µl de cDNA e água ultrapurificada estéril tratada com DEPC 0,1% para completar o volume final de reação de 10

$\mu$ l. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados por 5 segundos a 10000 X g e submetidos aos seguintes ciclos de temperatura: 1 ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C (IL-2) por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com um passo de extensão à 72°C por 5 minutos.

Em todas as análises foram preparados controles positivos e negativos. Como controle positivo interno das reações de RT-PCR, foi realizada a amplificação gênica do gene constitutivamente expresso da  $\beta$ -actina, a fim de testar a integridade das amostras de RNA e o sucesso da reação de transcrição reversa. O procedimento realizado para a amplificação do iniciador  $\beta$ -actina foi o mesmo utilizado para a IL-2, exceto que a temperatura de anelamento foi de 60°C. O controle negativo foi feito sem a adição do cDNA.

#### 4.5.6. Seleção do tampão de reação para a reação de RT-PCR:

Para definir o tampão com condições ideais de Cloreto de Magnésio ( $MgCl_2$ ), Cloreto de Potássio (KCl) e também o melhor pH, foram utilizados 12 diferentes tampões, cujas formulações estão expostas no Quadro 5, em reações de RT-PCR de cada marcador, conforme descritas anteriormente (BORDIGNON, 2005).

**Quadro 5:** Formulação e pH dos 12 tampões (10X) utilizados na otimização da reação de RT-PCR.

TAMPÃO 10 X	Tris-HCl pH 8,3	Tris-HCl pH 8,8	Tris-HCl pH 9,2	$MgCl_2$	KCl
1	100 mM	-	-	15 mM	250 mM
2	100 mM	-	-	15 mM	750 mM
3	100 mM	-	-	35 mM	250 mM
4	100 mM	-	-	35 mM	750 mM
5	-	100 mM	-	35 mM	250 mM
6	-	100 mM	-	15 mM	750 mM
7	-	100 mM	-	15 mM	250 mM
8	-	100 mM	-	35 mM	750 mM
9	-	-	100 mM	15 mM	250 mM
10	-	-	100 mM	15 mM	750 mM
11	-	-	100 mM	35 mM	250 mM
12	-	-	100 mM	35 mM	750 mM

Procedeu-se a análise dos 12 tampões da seguinte forma: foi distribuído 1  $\mu$ l de cada tampão em 12 microtubos estéreis, devidamente identificados e foram adicionados 2 mM de

dNTP Mix, 10 pmoles/ $\mu$ l de cada iniciador específico, 1 U/ $\mu$ l de *Taq* DNA polimerase, 1  $\mu$ l de cDNA e água utrapurificada estéril tratada com DEPC 0,1% para o volume final de 10  $\mu$ l.

Os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados por 5 segundos e em seguida, foram submetidos aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C (IL-2) por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com um passo de extensão à 72°C por 5 minutos no termociclador.

A mesma metodologia foi realizada para o iniciador  $\beta$ -actina.

#### **4.5.7. Determinação da temperatura ideal de ligação do iniciador IL-2 à fita molde:**

Para determinar a temperatura ideal de ligação do iniciador à reação, foi programado no termociclador um gradiente de diferentes temperaturas dos ciclos de ligação do iniciador (BORDIGNON, 2005). As temperaturas testadas no gradiente foram: 46, 48, 50, 52 e 54 (°C).

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.5.6, utilizando-se o tampão 10, descrito no Quadro 5.

#### **4.5.8. Protocolo de amplificação para o marcador da expressão da IL-2:**

O protocolo descrito a seguir foi utilizado em todas as demais etapas deste estudo, tanto para verificar a estimulação das células Jurkat com a PHA, a inibição celular com imunossupressor como também para testar a atividade imuno-modulatória dos compostos de galato e  $\beta$ -glucanas.

A RT-PCR foi realizada utilizando-se 1  $\mu$ l de cDNA total das amostras ou controles, 2mM de deoxinucleotídeos trifosfatados, 1 $\mu$ l de tampão contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 750mM de KCl com pH 9,2, 10 pmoles de cada iniciador, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase e água DEPC 0,1% autoclavada para completar o volume final de 10 $\mu$ l. As amostras foram homogeneizadas e em seguida, centrifugadas por 5 segundos a 10000 X g.

Em seguida, as amostras foram submetidas à seguinte programação de temperaturas: 1 ciclo inicial de desnaturação à 94°C por 4 minutos, 35 ciclos à 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com um passo à 72°C por 5 minutos e resfriamento posterior das amostras à 15°C.

#### **4.5.9. Visualização dos produtos de RT-PCR:**

Os produtos amplificados das reações de RT-PCR foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose (GE Healthcare) 1% (p/v) preparados em tampão Tris-Borato EDTA 1 X (TBE, Tris-HCl 0,09M, ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). Os géis foram corados com brometo de etídio (50µg/ml) (Invitrogen), e em seguida visualizados sob luz ultravioleta em transluminador e fotografados para documentação, seguindo as instruções descritas por Sambrook e Russel (2001).

Para cada amostra foi utilizada uma alíquota de 4 µl, misturadas a 4 µl de tampão de aplicação 2 X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 25%, ficol 15% e glicerina 30% p/v em água ultrapurificada) e aplicadas no gel, sendo submetidas à eletroforese com voltagem inicial de 80 V por 30 minutos e 100 V por aproximadamente 45 minutos em tampão de corrida TBE.

Em cada gel, para cada conjunto de amostras, foram aplicados conjuntamente 7 µl do marcador de baixo peso molecular p Blue Script (LMW – 50µg de DNA pUC, 128 µl de tampão 10 X da enzima HaeIII, 10-20 unidades da enzima HaeIII e água ultrapura em quantidade suficiente para 1280 µl), sendo o resultado fotodocumentado através de câmera fotográfica digital (KODAK) utilizando o programa UVP Life Science Software, versão 4.0.

#### **4.5.10. Confirmação da identidade dos produtos de RT-PCR por sequenciamento do cDNA:**

Para confirmar a identidade dos produtos de RT-PCR obtidos, a amostra teve seu produto amplificado nas condições pré-estabelecidas e após purificação para eliminar o excesso de nucleotídeos e iniciadores não incorporados, o produto de RT-PCR de IL-2 foi utilizado na reação de sequenciamento com o Kit DYEnamic® ET Dye Terminator (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante, sendo a leitura das bases realizada no equipamento MegaBace 1000® DNA Analysis System (GE Healthcare).

A reação de sequenciamento foi realizada na presença de 5 pmol do iniciador IL-2 sense ou IL-2 anti-sense e 1-3 µl do produto purificado, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos com desnaturação de 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 54°C por 20 segundos e extensão a 60°C por 90 segundos.



Os produtos desta reação foram precipitados com isopropanol 70% e, sequencialmente eletroinjetados a 2KV por 100 segundos e eletroeluídos por 140 minutos a 9KV.

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com a doutoranda Patricia Hermes Stoco, sob a orientação do Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard, no Laboratório de Protozoologia – MIP – CCB - UFSC.

#### **4.5.11. Determinação do tempo de estimulação das células Jurkat com PHA:**

Para determinar o melhor tempo de estimulação celular,  $2 \times 10^6$  células em 10ml de meio RPMI 1640 (10% SFB e 0,1% de gentamicina) foram estimuladas durante 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas com  $5 \mu\text{g/ml}$  de PHA. Em todas as reações foram feitos controles celulares, sem a adição de PHA. As células foram incubadas em placas de 6 cavidades em estufa  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ .

Após cada período de incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 260 X g e lavadas uma vez com PBS estéril. O precipitado celular foi suspenso em 1 ml de TRIZOL em tubo de 1,5 ml livre de RNase e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior extração de RNA.

#### **4.5.12. Determinação da sensibilidade da reação de RT-PCR para a detecção da atividade imunoestimulatória da PHA em células Jurkat:**

Para avaliar os limites de sensibilidade da estimulação celular, utilizou-se a diluição seriada, na razão 1:2, com a concentração inicial de PHA de  $10 \mu\text{g/ml}$  a  $0,02 \mu\text{g/ml}$  e incubadas por 24 horas.

#### **4.5.13. Seleção do fármaco imunossupressor para controle positivo da inibição celular:**

Para determinação da capacidade supressora da Ciclosporina A (CsA), Dexametasona (Dex) e Cortisona (Cor), concentrações não citotóxicas destes três fármacos ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), foram adicionadas à  $2 \times 10^6$  células/10 ml em placas de 6 cavidades, que foram mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Paralelamente foram feitos controles celulares, sem a adição de imunossupressores.

Após este período, as células de cada cavidade foram coletadas em tubo estéril de 15 ml, centrifugadas a 260 X g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células lavadas com PBS estéril previamente aquecido à 37 °C e novamente centrifugadas. As células foram então transferidas para outra placa de 6 e, a cada triplicata, foram adicionadas diferentes concentrações de PHA (1 µg/ml, 0,5 µg/ml e 0,25 µg/ml), seguindo-se nova incubação por mais 3 horas. Foram feitos controles de ativação celular, com as respectivas concentrações de PHA.

#### **4.6. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS GALATOS E DAS AMOSTRAS DOS POLISSACARÍDEOS NAS CÉLULAS JURKAT, ATRAVÉS DE RT-PCR:**

##### **4.6.1. Avaliação da potencial atividade estimulatória dos galatos e das amostras dos polissacarídeos:**

Para a avaliação do potencial de ativação de células Jurkat com os galatos e os polissacarídeos, foram incubadas  $2 \times 10^5$  células/ml durante 24h, em placa de 6 cavidades em estufa 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com concentrações não citotóxicas dos galatos (2 µM) e dos polissacarídeos (10µg). Paralelamente, foram feitos controles celulares sem adição dos compostos e um controle de estimulação (1 µg/ml de PHA).

Após o período de incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 260 X g e lavadas uma vez com PBS estéril. O precipitado celular foi suspenso em 1 ml de TRIZOL em tubo de 1,5 ml livre de RNase e armazenado a -80°C para posterior extração de RNA.

Os galatos que não apresentaram nenhuma atividade estimulatória sobre as células Jurkat nestes ensaios, foram então testados com 48 e 72 horas de incubação, nas mesmas condições e concentrações descritas acima.

##### **4.6.2. Avaliação da potencial atividade imunossupressora dos galatos:**

Os compostos que não mostraram nenhuma atividade estimulatória sobre as células Jurkat, mesmo após 72 horas de incubação, foram testados para a avaliação do potencial de inibição sobre estas células. A concentração utilizada foi de 2 µM e as placas incubadas por

24 horas. Paralelamente foram feitos controles celulares sem a adição dos galatos e controle positivo de inibição celular (CsA 1 µg/ml por 24 horas e posteriormente, PHA por 3 horas).

Após este período, cada amostra foi coletada em tubo estéril de 15 ml e centrifugadas a 260 X g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células lavadas com PBS estéril previamente aquecido à 37 °C e o tubo novamente centrifugado para obter o concentrado celular. Este precipitado, foi colocado em outra placa estéril de 6 cavidades contendo 10 ml de meio RPMI 1640, com 10% de SFB e 0,1 % de gentamicina. Em cada composto testado, foram adicionados 0,5 µg/ml de PHA e incubadas por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Foi feito controle de ativação celular, com 0,5 µg/ml PHA e incubadas por 3 horas.

#### **4.7. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS GALATOS E POLISSACARÍDEOS NAS CÉLULAS JURKAT, ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO:**

A fim de determinar qual o melhor marcador celular para avaliar a potencial atividade de estimulação das células Jurkat, através da técnica de citometria de fluxo,  $2 \times 10^5$  células/ml foram incubadas em placas de 6 cavidades, 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, com 1 µg/ml de PHA/24 horas ou 1 µg/ml de CsA/24 horas, posteriormente estimuladas com 0,5 µg/ml de PHA/3 horas. Após os períodos de incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 260 X g e lavadas uma vez com PBS estéril. As células estimuladas, inibidas e sem estímulo, foram contadas e  $1 \times 10^6$  células marcadas com 10 µl de cada anticorpo monoclonal listados no Quadro 6, durante 10 minutos à 20°C.

**Quadro 6:** Reagentes utilizados na avaliação da potencial atividade de estimulação de células Jurkat por citometria de fluxo

<b>Anticorpo Monoclonal</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Tipo Celular</b>
<b>CD3</b>	UCHT1	PerCP	Beckman Coulter	Timócitos, Células T
<b>CD2</b>	S5.2	PE	BD	Timócitos, Células T
<b>CD7</b>	8H8.1	FITC	BD	Timócitos, Células T
<b>CD11a</b>	G-25.2	FITC	BD	Linfócitos, granulócitos, macrófagos
<b>DR2</b>	L243	PerCP	BD	Elemento MHC II
<b>CD25</b>	ACT-1	PE	Dako	Cadeia $\alpha$ IL-2R
<b>CD38</b>	AT1315	FITC	Dako	Células T e B precoces, células T ativadas
<b>CD45RA</b>	ALB11	FITC	Beckman Coulter	Linfócitos naive
<b>CD45RO</b>	UCHL-1	PE	BD	Linfócitos ativados ou efetores

As células foram então lavadas com 500  $\mu$ l de PBS, centrifugadas a 260 X g por 5 min a 4°C e em seguida, suspensas em 3000  $\mu$ l de PBS para aquisição em citômetro de fluxo. As amostras, foram submetidas a análise por citometria de fluxo (FACSCalibur - Becton Dickinson), totalizando 30.000 eventos utilizando-se o programa CellQuest™, e os dados analisados com o programa FlowJo® versão 8.6.3 (© Tree Star. Inc).

Para a avaliação do potencial de ativação dos compostos testados, foram incubadas  $2 \times 10^5$  células/ml com os galatos (2  $\mu$ M) e as amostras de polissacarídeos (10 $\mu$ g), durante 24h em placas de 6 cavidades em estufa 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 260 X g e lavadas uma vez com PBS estéril. As células foram contadas em câmara de Neubauer e colocadas na quantidade de  $10^6$  células por cavidade em placa de 96 poços com fundo em U. Em seguida foram marcadas simultaneamente com 10  $\mu$ l do anticorpo anti-CD3 (Clone UCHT1) conjugado com PerCP (Beckman Coulter) e 10  $\mu$ l do anticorpo anti-CD25 (Clone ACT-1) conjugado com PE (Dako Cytomation), durante 20 minutos a 4°C. As células foram então lavadas com 200  $\mu$ l de PBS, centrifugadas a 260 X g por 5 min a 4°C. Em seguida, as células foram suspensas em 500  $\mu$ l de PBS para aquisição em citômetro de fluxo. Paralelamente foram feitos 3 controles: células não estimuladas, células estimuladas com PHA (1 $\mu$ g/ml) e células inibidas com CsA (1 $\mu$ g/ml) por 24 horas e estimuladas em seguida com PHA (0,5 $\mu$ g/ml) por 3 horas.

As amostras, foram submetidas a análise por citometria de fluxo (FACSCalibur - Becton Dickinson), totalizando 100.000 eventos utilizando-se o programa CellQuest™, e os

dados analisados com o programa FlowJo<sup>®</sup> versão 8.6.3 (© Tree Star. Inc). O resultado foi expresso como a frequência de linfócitos T CD25 positivos em relação ao número total de linfócitos T CD3, subtraindo-se as frequências encontradas no controle não marcado. A análise foi feita através um *gate* da população CD25 positiva. A estratégia dos *gates* foi feita de modo a não incluir células auto-fluorescentes observadas na análise.

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas – MIP – UFSC, com a colaboração técnica da mestranda em Biotecnologia Silvia Regina Lanza, sob a supervisão do Professor Dr. André Báfica.

#### **4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

Na avaliação da estimulação celular e da citotoxicidade, os ensaios foram realizados com três repetições em placas diferentes e em dias diferentes, o que caracteriza a triplicata.

Realizou-se uma análise de regressão linear para calcular os valores das concentrações citotóxicas que diminuem em 50% a viabilidade das células (CC<sub>50</sub>), quando comparadas com os controles celulares, a partir de curvas de concentração *versus* porcentagem de viabilidade celular.

As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas a partir das densidades ópticas obtidas nos ensaios do MTT e do Vermelho Neutro, em relação aos controles celulares.

Com os resultados obtidos na padronização do ensaio colorimétrico do MTT foram realizadas análises estatísticas de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni (GraphPad InStat<sup>®</sup>).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 5.1. Avaliação imunofenotípica das células Jurkat, através da citometria de fluxo:

Para caracterizar o estágio de maturação das células Jurkat, são identificadas moléculas que estão presentes na membrana celular, no citoplasma e no núcleo dessas células. Essas moléculas são glicoproteínas localizadas na superfície celular, que podem se ligar a outras moléculas sinalizadoras (Quadro 7) (GASPARONI et al., 2000). Através da combinação desses marcadores de superfície (anticorpo monoclonal - AcMo), foi possível determinar a linhagem e o grau de maturidade das células Jurkat.

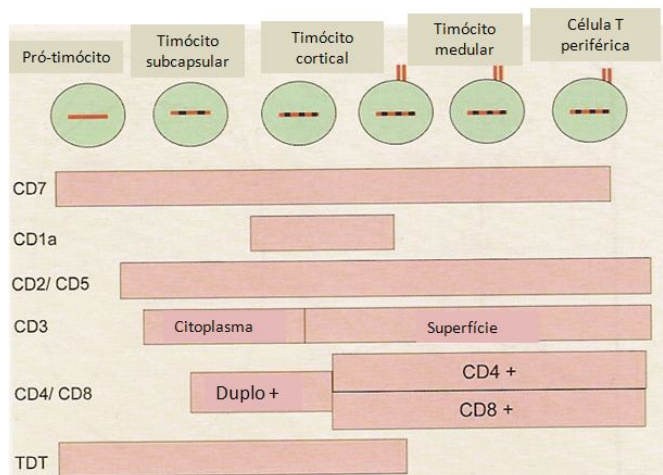
**Quadro 7:** Marcadores celulares utilizados para caracterização das células Jurkat, através de citometria de fluxo. Fonte: JANEWAY et al. (2007).

Marcador celular	Tipo celular
CD3	Células T, timócitos
CD4	Subgrupo de timócitos, células T (T <sub>H</sub> 1 e T <sub>H</sub> 2)
CD8	Subgrupo de timócitos, células T citotóxicas
CD2	Células T, timócitos
TdT	Transferase deoxinucleotidil terminal (insere N-nucleotídeos nas junções das cadeias pesadas de imunoglobulina)
CD5	Timócitos, células T, subgrupo de células B
CD1a	Timócitos corticais, células de Langerhans, células dendríticas, células B
CD7	Células hematopoiéticas pluripotenciais, timócitos, células T
TCR $\alpha/\beta$	Duas cadeias do receptor de células T $\alpha:\beta$
TCR $\gamma/\delta$	Duas cadeias do receptor de células T $\gamma:\delta$

Os resultados da análise imunofenotípica evidenciaram que as células Jurkat podem ser consideradas timócitos subcapsulares imaturos, como mostrado na Figura 6. O fenótipo de células T imaturas é caracterizado pela expressão de TdT, CD1a, CD3, CD5 e CD7 e são inicialmente duplo-negativos para CD4 e CD8 (JAFFE et al., 2008). O CD3 é expresso primeiro no citoplasma, antes de completar o rearranjo gênico do receptor de células T e exportar para a membrana celular (JAFFE et al., 2008).

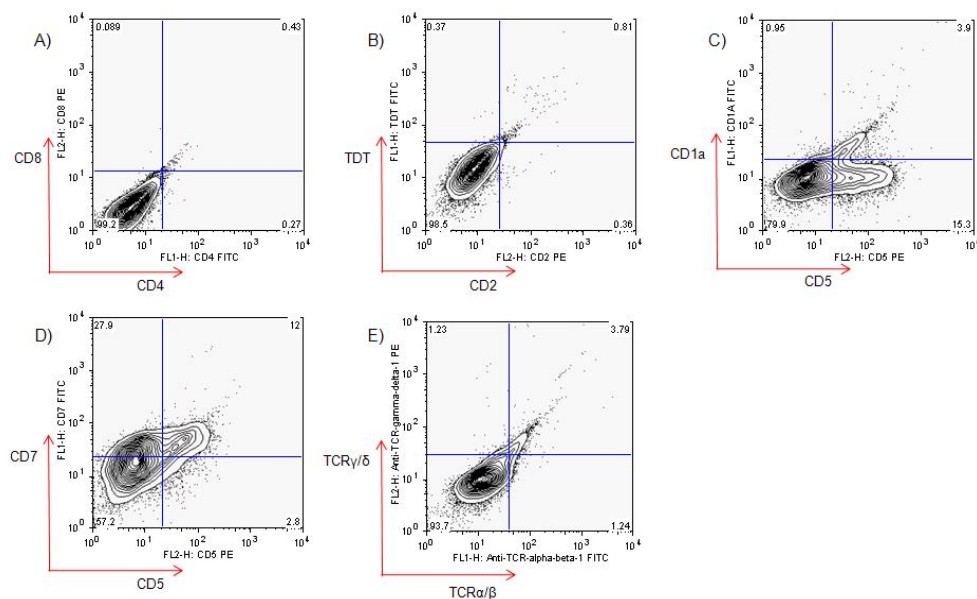
Embora a frequência de CD3 na superfície celular tenha sido positiva para toda a população de células e negativa para CD2 e TdT, essa caracterização foi confirmada pela presença de CD5 e CD7 e ausência dos marcadores CD4, CD8, CD1a, TCR $\alpha/\beta$  e TCR $\gamma/\delta$  (Figura 7).

Na população celular utilizada neste estudo, porém, foram encontradas duas populações de células CD3 positivas: uma marcada fracamente (34%) e outra fortemente (66%) (dados não mostrados).



**Figura 6:** Diagrama esquemático da maturação das células T ilustrando as mudanças da expressão antigênica. Fonte: JEFFE et. al. (2008).

Nas análises das amostras marcadas com CD1a/CD5/CD3 e TCR $\alpha/\beta$ /TCR $\gamma/\delta$ /CD3 houve presença de autofluorescência (3,9% e 3,79%, respectivamente), devido à ocorrência de determinados constituintes celulares com essas características, como pode ser observado na Figura 7 C e E.



**Figura 7:** Análise fenotípica de células Jurkat por citometria de fluxo. Células sem estimulação marcadas com os anticorpos monoclonais para caracterização.



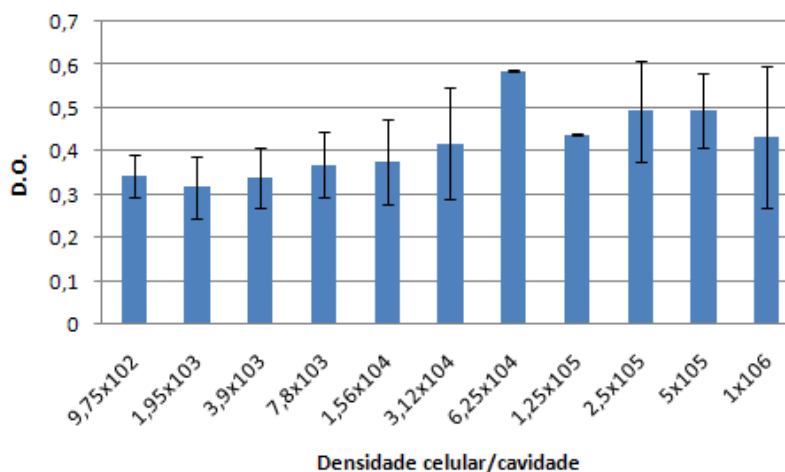
## **5.2. Padronização do ensaio colorimétrico do MTT para avaliação das atividades estimulatória da fitohemaglutinina (PHA) e inibitória de fármacos imunossupressores:**

Para avaliar a citotoxicidade de uma amostra qualquer, são necessários ensaios que avaliem os danos celulares. A integridade da membrana celular é um dos parâmetros utilizados para a citotoxicidade, sendo que diferentes metodologias descrevem como fazer esta avaliação (EISENBRAND et al., 2002). Há também experimentos que avaliam a atividade metabólica das células, como por exemplo, os que utilizam o sal de tetrazólio - MTT (MOSMANN, 1983) ou a capacidade das células viáveis de incorporarem um corante vital, tal como o Vermelho Neutro (BORENFREUND; PUERNER, 1985).

O ensaio de proliferação e viabilidade celular através do sal de tetrazólio MTT [3-(4,5 dimetiazol-2il) 2,5 difenil brometo de tetrazólio], é determinado pela redução do MTT, composto hidrossolúvel, de cor amarela, em cristais insolúveis de formazana com coloração azul-púrpura pelas desidrogenases mitocondriais (AMARAL et al., 2009). O princípio do método foi descrito por Black e Speer (1953) e, em 1983, Mosmann propôs o ensaio do MTT para avaliar o crescimento (proliferação) e sobrevivência (citotoxicidade) celulares. Este ensaio colorimétrico mede a quantidade produzida de formazana através de espectrofotometria e é sensível e quantitativo, uma vez que quanto maior o valor lido de absorbância (D.O.), maior a quantidade de células viáveis (ABE; MATSUKI, 2000; KIM et al., 2007).

Neste estudo, o primeiro parâmetro do ensaio de MTT testado foi a densidade celular, tendo sido testadas as densidades de  $1 \times 10^6$  até  $9,75 \times 10^2$  células/100  $\mu$ l, num período de 72 horas.

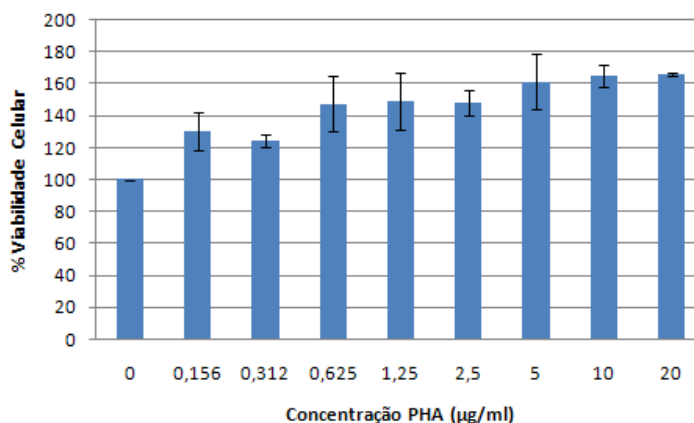
Embora os resultados das diferentes concentrações de células não tenham apresentado diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), entre as diferentes concentrações testadas, pode-se observar na Figura 8 que há uma tendência de maior D.O. na densidade de  $6,25 \times 10^4$  células/100  $\mu$ l. Assim, para fins de facilitação dos cálculos, estabeleceu-se que  $5 \times 10^4$  células/100  $\mu$ l, seriam utilizadas nos experimentos subsequentes. Esta densidade celular também foi utilizada por Pandey (2005) na avaliação das propriedades imunomoduladoras de flavonóides.



**Figura 8:** Representação gráfica dos valores de densidade óptica (D.O.) obtidos no ensaio do MTT, com diferentes densidades de células Jurkat/100 µl. As colunas expressam a média de três experimentos independentes e as barras, o desvio padrão. Não houve diferenças significativas entre as diferentes densidades celulares ( $p>0,05$ ) (Análises estatísticas de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni).

A seguir, para se determinar a melhor concentração do mitógeno PHA, utilizado como controle positivo de estimulação das células Jurkat, foram testadas oito concentrações (20 até 0,156 µg/ml), com diluições seriadas na razão 1:2, também com tempo de incubação de 72 horas.

Como pode ser observado na Figura 9, não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de PHA testadas ( $p>0,05$ ), embora todas tenham sido estatisticamente diferentes do controle. Desta forma, foi escolhida a concentração de 5 µg/ml para os ensaios subsequentes de estimulação. Esta concentração já foi também utilizada por outros autores (KURO et al., 2000; PANDEY et al., 2005; SASAGAWA et al., 2006; LEE et al., 2007; BRANCO et al., 2008; GOTO et al., 2008).



**Figura 9:** Representação gráfica dos valores percentuais de proliferação de células Jurkat, induzida com diferentes concentrações de PHA no ensaio do MTT, em relação aos controles celulares sem estimulação. As colunas representam a média de três experimentos independentes e as barras, os desvios padrões. Não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações de PHA testadas ( $p > 0,05$ ) (Análises estatísticas de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni).

O passo seguinte foi estabelecer as concentrações ideais dos fármacos imunossupressores, para posterior utilização como controle positivo de inibição. Para tal, foram utilizadas doze concentrações dos fármacos: ciclosporina A (CsA), dexametasona (DEX) e cortisona (COR), de 250 até 0,12 µg/ml, diluídas em razão 1:2. Os valores das  $CC_{50}$  são: CsA  $150,91 \pm 0,007$  µg/ml, DEX  $907,46 \pm 317,04$  µg/ml e COR  $325,35 \pm 40,87$  µg/ml, e o controle com DMSO (100 µl DMSO 2% e 100 µl de suspensão celular) não apresentou citotoxicidade (dados não mostrados). Estes valores de  $CC_{50}$  foram obtidos através da plotagem de curvas concentração-resposta, por regressão linear.

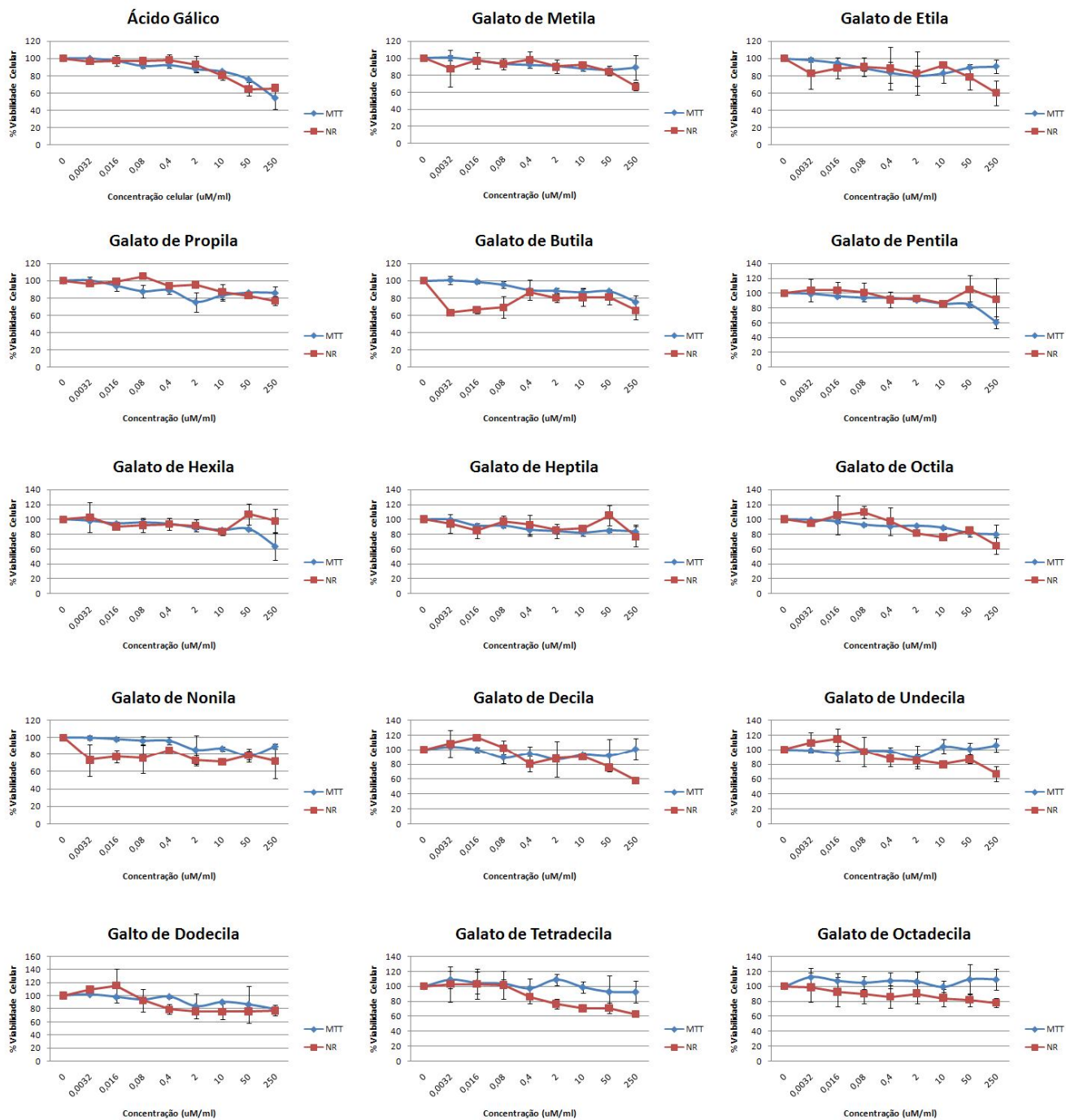
Os valores de  $CC_{50}$  para os diferentes fármacos foram superiores às concentrações relatadas na literatura, que são 0,1-1 µg/ml de CsA (MAGES et al., 1998; MINGUILLON et al., 2005; LEE et al., 2007) e 4 µg/ml de DEX (STRAUSS; OSEN; DEBATIN, 2002). Durante os ensaios, morfologia e a proliferação celulares foram monitoradas microscopicamente, e observou-se que os valores de  $CC_{50}$  determinados pelo ensaio do MTT não tinham correlação com a análise visual, pois visualmente as células pareciam estar mortas (dados não mostrados), o que poderia explicar os valores discrepantes encontrados. É importante ressaltar que algumas substâncias podem afetar seletivamente as enzimas responsáveis pela redução do MTT, resultando em uma superestimativa da citotoxicidade (SMEE et al., 2002). Além disso, a redução do MTT não pode ser exclusivamente às desidrogenases mitocondriais, mas também à outras enzimas celulares (LIU et al., 1997) e qualquer outro fator que possa interferir com o mecanismo de redução, produzindo resultados não confiáveis, como acontece, por exemplo, na doença de Alzheimer, onde a proteína  $\beta$ -

amilóide inibe a redução celular do MTT (LIU; SCHUBERT, 1997; ABE; SAITO, 1998; RONICKE et al., 2008).

Dada a grande discrepância entre os valores de  $CC_{50}$  obtidos neste estudo e as concentrações usualmente utilizadas pelos pesquisadores e apresentadas em outros artigos (MAGES et al., 1998; SORIMACHI et al., 2001; MINGUILLON et al., 2005; LEE et al., 2007), decidiu-se pela utilização de 1 ug/ml de CsA, concentração esta que foi utilizada em todos os ensaios subseqüentes, como padrão de supressão das células Jurkat, a qual se mostrou capaz de inibir a expressão do gene da IL-2, como será mostrado no item 5.9.

### **5.3. Avaliação da citotoxicidade dos galatos através dos ensaios do MTT e do Vermelho Neutro:**

Dado que os valores de  $CC_{50}$  dos fármacos imunossupressores definidos pelo ensaio do MTT foram conflitantes com os resultados da análise visual, conforme destacado no item anterior, e, além disso, não foram encontrados dados na literatura sobre a citotoxicidade destes compostos sobre as células Jurkat resolveu-se, neste trabalho, avaliar a citotoxicidade dos galatos através de um teste colorimétrico adicional, o do Vermelho Neutro. Após a incubação de 24 horas das células Jurkat com diferentes concentrações dos galatos, foi também realizada uma análise visual em microcópico invertido, antes da adição dos reagentes colorimétricos, para verificar a morfologia e quantidade das células em comparação com os controles. Também com estes compostos, os resultados obtidos, através dos ensaios do MTT e do Vermelho Neutro (Figura 10), não corresponderam aos resultados da análise microscópica (dados não mostrados).



**Figura 10:** Representação gráfica dos valores percentuais de viabilidade de células Jurkat tratadas com os galatos obtidos através dos ensaios colorimétricos do MTT e do Vermelho Neutro. As linhas expressam a média de três experimentos independentes e as barras, os desvios padrões.

O ensaio de citotoxicidade de captação do corante Vermelho Neutro (cloridrato de 3-amino-m-dimetilamino-2-metilphenazina), é baseado no protocolo inicial descrito por Borenfreund e Puerner (1985) e tem sido utilizado para identificação de células viáveis em culturas (DERENZIS; SCHECHTMAN, 1973). Este ensaio quantifica o número de células viáveis após a exposição a compostos tóxicos, e baseia-se na captação e acúmulo do corante Vermelho Neutro nos lisossomos (BORENFREUND; PUERNER, 1985; DUBROVSKY et al., 2006; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Este corante penetra pela membrana das células viáveis por difusão passiva e se concentra nos lisossomos, onde se liga aos grupos fosfatos da matriz lisossomal (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Sua internalização é devido ao baixo pH dos lisossomos e o acúmulo pode ser visualizado por microscópio óptico (MARTINEZ-GOMEZ et al., 2008). O corante é, então, extraído das células, com etanol acidificado e através da solubilização deste corante, que foi previamente absorvido, é feita a leitura por espectrofotometria. Consequentemente, a quantidade de corante retido é proporcional ao número de células viáveis (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

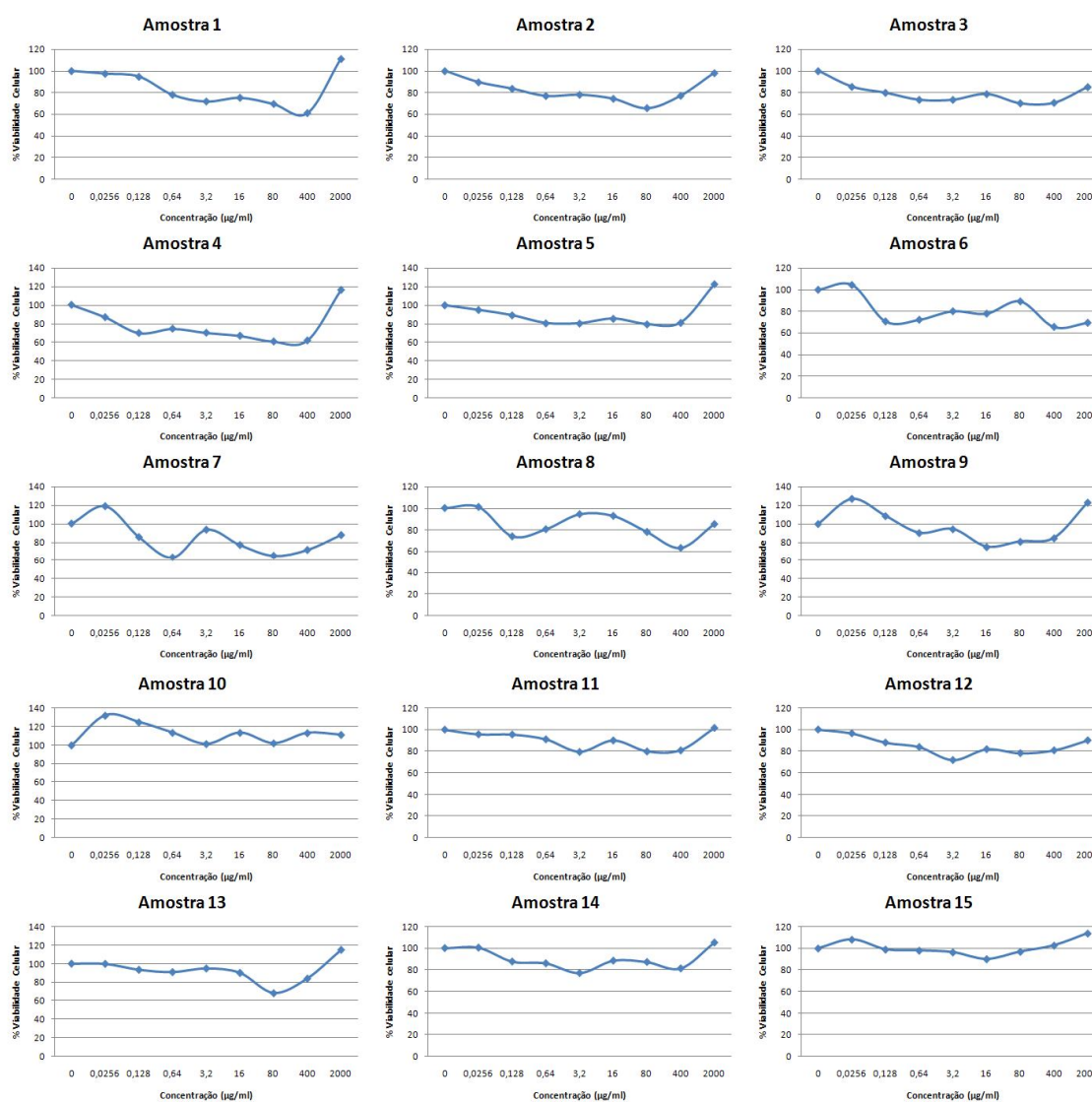
Adicionalmente, a captação do Vermelho Neutro pelas células viáveis pode ser modificado por alterações na superfície das células ou nas membranas lisossomais, sendo assim possível distinguir entre células viáveis, mortas ou danificadas em função da capacidade do lisossomo de captar o corante (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Comparando-se os dois ensaios (Figura 10), foi verificado que houve correlação entre os valores de  $CC_{50}$  obtidos, exceto para os galatos de butila e nonila, que nas menores concentrações (0,08 até 0,0032  $\mu\text{M}$ ) apresentaram valores diferentes de viabilidade celular, sendo 100% para o MTT e 60 e 80 % para o Vermelho Neutro, respectivamente. Já os galatos de tetradecila e octadecila não apresentaram similaridades para as concentrações maiores (2 a 250  $\mu\text{M}$ ), sendo 100% para o MTT e 70 e 80 % para o Vermelho Neutro, respectivamente.

Assim, como pode ser verificado na Figura 10, na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , todos os compostos apresentaram pouca citotoxicidade (valores maiores que 80%). Por isso, nas análises subsequentes da atividade imunomodulatória destes compostos sobre as células Jurkat, foi utilizada a concentração de 2  $\mu\text{M}$  para todos eles.

#### 5.4. Avaliação da citotoxicidade das amostras dos polissacarídeos de *Agaricus blazei*, através do ensaio do MTT:

Dados encontrados na literatura sobre os polissacarídeos de *Agaricus blazei* mostraram ser pouco citotóxicos para os macrófagos (HEMING et al., 2001; SHU; WEN; LIN, 2003) e como pode ser observado na Figura 11, na concentração de 10  $\mu$ M, todos os polissacarídeos apresentaram pouca citotoxicidade (valores maiores que 60%). Por isso, nas análises subsequentes da atividade imunomodulatória destes polissacarídeos sobre as células Jurkat, foi utilizada a concentração de 10  $\mu$ M para todas estas substâncias.



**Figura 11:** Representação gráfica dos valores percentuais de viabilidade de células Jurkat tratadas com os polissacarídeos de *Agaricus blazei*, obtidos através do ensaio colorimétrico do MTT. Os valores foram obtidos de um único experimento.

### 5.5. Padronização da RT-PCR:

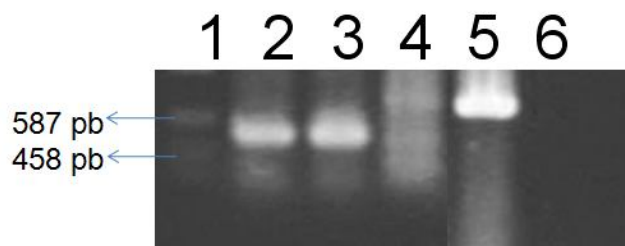
Após padronização dos parâmetros apresentados nos itens anteriores, deu-se início a padronização das diferentes etapas da RT-PCR. Esta técnica permite a detecção do mRNA da citocina mesmo em um número limitado de células, sendo provavelmente uma das maiores vantagens da técnica, embora seja difícil quantificar com precisão o montante dessas transcrições (STORDEUR et al., 2002).

Células Jurkat, na concentração de  $2 \times 10^6$ , foram incubadas durante 24h, com as seguintes concentrações dos imunomoduladores padrões: PHA (5ug/ml); CsA, DEX e COR (1ug/ml).

A extração do RNA foi realizada com o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo-se as especificações do fabricante. Esta metodologia foi escolhida por ser rápida e prática, levando em torno de 1 hora para a obtenção da amostra.

Nos primeiros ensaios realizados, no entanto, o controle celular sem nenhuma estimulação mostrou-se positivos para IL-2 (dados não mostrados). Uma das hipóteses para explicar este fato seria a presença de DNA contaminante, e a fim de garantir uma maior pureza das amostras, todos os experimentos seguintes foram realizados com a presença de DNase .

Para a construção do cDNA, foram testados iniciadores específicos (Quadro 4), randômicos e Oligo dT. Como somente os iniciadores randômicos e Oligo dT apresentaram resultados reproduzíveis na construção do cDNA (Figura 12), e com a vantagem do iniciador Oligo dT ser específico para RNAm, este foi utilizado em todos os ensaios subsequentes.



**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 com diferentes iniciadores para a construção do cDNA. Linha 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 = iniciador randômica, 3 = Oligo dT, 4 = iniciador específico, 5 = Controle positivo ( $\beta$ -actina) e 6 = controle negativo (sem adição de cDNA).

Para a padronização da metodologia de amplificação da expressão do marcador de ativação celular, a reação de RT-PCR foi realizada inicialmente conforme descrito no item 4.5.4, com a utilização do tampão da enzima *Taq* DNA Polimerase 10X (Invitrogen).



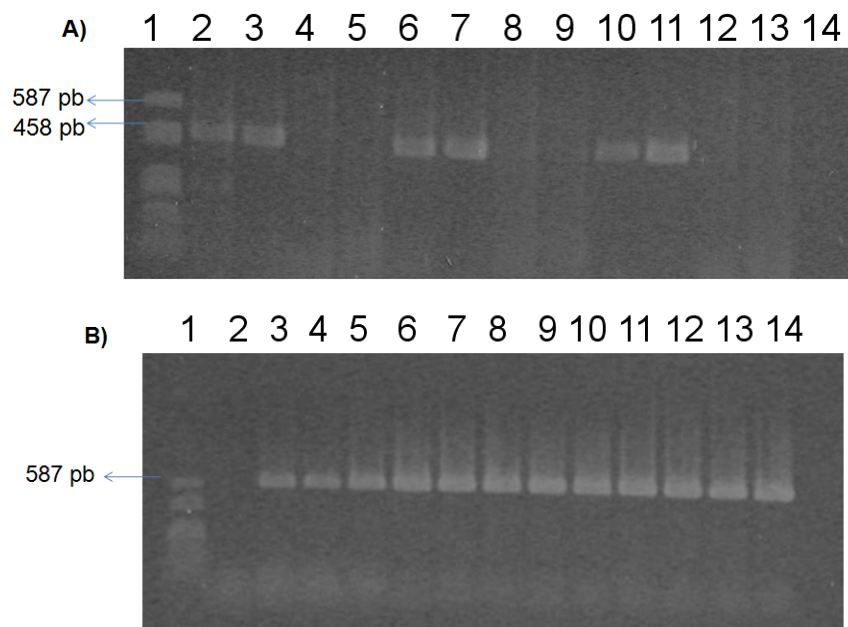
Como não houve a formação da banda correspondente a IL-2 (dados não mostrados), possivelmente pelas concentrações utilizadas de Tris, HCl e KCl presentes no tampão da *Taq*, pela concentração do  $MgCl_2$  ou, até mesmo, pela temperatura do anelamento do iniciador, foram testados outros tampões e diferentes temperaturas de anelamento.

### 5.5.1. Seleção do tampão para a reação de RT-PCR:

A fim de se obter uma condição capaz de produzir um perfil com bandas intensas e reprodutíveis, foram testados 12 tampões (Quadro 5) com concentrações diferentes de  $MgCl_2$  e KCl em soluções com pH variando de 8,3 a 9,2.

De acordo com a intensidade e tamanho dos produtos obtidos, o tampão 10 foi selecionado por apresentar um melhor resultado (Figura 13 A). As concentrações deste tampão são 10 mM de Tris-HCl, 1,5 mM de  $MgCl_2$  e 75 mM de KCl, pH 9,2. Ocorreu também a amplificação em outros tampões com concentrações de reagentes e pH bastante variados, os quais poderiam ter sido igualmente empregados, por exemplo, os tampões 1, 2, 5, 6 e 9.

Em todos os ensaios foi utilizado como controle positivo a  $\beta$ -actina, a fim de testar a integridade do cDNA (Figura 13 B).

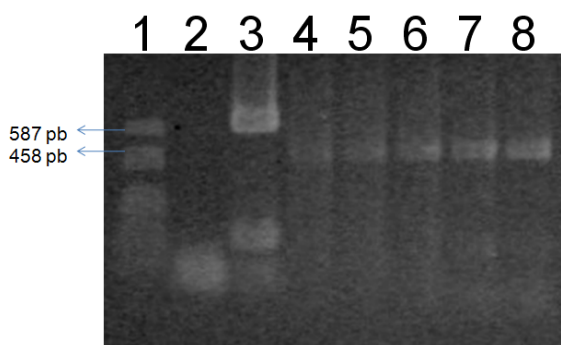


**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 (A) e  $\beta$ -actina (B) em diferentes tampões testados. Linha 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 a 13 = amplificação com os tampões 1 a 12, respectivamente, 14 = controle negativo (sem adição de cDNA).

### 5.5.2. Determinação da temperatura ideal de ligação dos iniciadores à fita molde:

A otimização das condições de amplificação compreendeu, também, a otimização da temperatura de anelamento. Para isso foi programado no termociclador um gradiente de temperatura, conforme descrito por Bordignon et al. (2005), com variações de 46°C a 54°C. Nesta faixa, foram testadas cinco temperaturas diferentes. O esquema de temperatura para a reação de amplificação foi o seguinte: 94°C por 4 minutos para a desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, gradiente de 46 a 54°C na etapa de anelamento por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão por 5 minutos a 72°C.

Conforme pode ser observado na Figura 14, a melhor temperatura de anelamento, e que foi escolhida para realização dos demais testes, foi de 54°C.



**Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio evidenciando os produtos de amplificação do marcador IL-2 em diferentes temperaturas de anelamento. Linha 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 = controle negativo (sem adição de cDNA), 3 = controle positivo ( $\beta$ -actina 60°C), 4 = 46°C, 5 = 48°C, 6 = 50°C, 7 = 52°C e 8 = 54°C.

Desta forma, foi estabelecido o seguinte protocolo de amplificação: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C na etapa de anelamento do iniciador por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão por 5 minutos a 72°C.

### 5.6. Confirmação da identidade dos produtos de RT-PCR de IL-2 por sequenciamento de cDNA:

As seqüências obtidas foram, primeiramente, submetidas a uma avaliação de qualidade pelo programa Phred ( $Phred \geq 20$ ) e agrupadas pelo programa Phrap, ambos do pacote

Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998). A sequência resultante foi confrontada com sequências depositadas em diversos bancos de dados públicos utilizando diferentes algoritmos da rotina BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Na busca por similaridade, identificou-se tanto por blastn (busca em bancos de nucleotídeos), quanto por blastx (busca em bancos de proteínas e nucleotídeos) 100% de similaridade com a porção referente aos nucleotídeos 295 a 752 (Figura 15), que é a sequência presente no GenBank (NM\_000586).

```

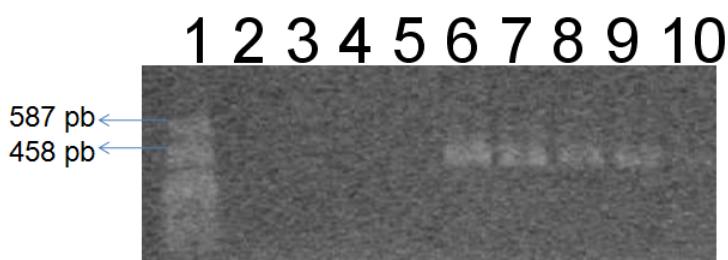
ATGTACAGGATGCATCCTCTCTTGCATTGCATCTAGTCTTGCATTTGTCACAAACAGTGCACCTACTT
CAGTTCATC AAGAAATC ATGCATC ATCTGGGCTTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGATGG
ATTTATATATTCATGATCCCAATCTCACAGGATGCTACATTTTATGTTTTCATGCCCAAGAAGGCC
ATGCATCTGAATCTTCTGCTCTAGAGAGAACTCAATCTCTGGAGGAGTGCATATTTAGCTC
AATCAAAATTTTCACTTAAATCCAGGGATTAATTCATCATTTCAAGTATATGTTCTGGATCAAA
GGATCTGAATCAATCTCTGCTGATGATGACAGCAATCTTGTAGATTTCTGAACAGA
TGGATTAACCTTTGTCATAGCTCTCTCAATCTGCT

```

**Figura 15:** Sequência amplificada do produto de RT-PCR da IL-2, demonstrando em vermelho, nas extremidades, a localização dos iniciadores.

### 5.7. Determinação do tempo de estimulação das células Jurkat com PHA:

Conforme pode ser observado na Figura 16, quando as células Jurkat foram incubadas com 5 µg/ml de PHA (concentração obtida através do ensaio do MTT), verificou-se o aparecimento das bandas correspondentes à IL-2, já a partir de 3 horas, permanecendo até 24 horas.



**Figura 16:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 em diferentes tempos de incubação. Linha 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 = controle negativo (sem adição de cDNA), 3 = controle celular (sem adição de PHA) tempo de 0

horas, 4 = 30 minutos de incubação 5 = 1 hora, 6 = 3 horas, 7 = 6 horas, 8 = 12 horas, 9 = 24 horas e 10 = controle celular tempo de 24 horas.

A PHA é uma lectina encontrada em plantas, principalmente nos feijões. A maior concentração desta proteína é encontrada na espécie *Phaseolus vulgaris*. Ela se liga aos carboidratos presentes na membrana celular, com considerável especificidade, induzindo a mitose celular (HAMELRYCK et al., 1996; LIOI et al., 2007).

Funcionalmente, a PHA possui a propriedade de induzir contactos mais estreitos entre membranas celulares adjacentes, ligando-se às glicanas da superfície das células (BARDOCZ et al., 1995). É uma lectina glico-específica N-acetilgalatosamina/galatose, com uma ampla variedade de atividades biológicas, incluindo mediação de reconhecimento celular, aglutinação e mitose de células (GUPTA et al., 2007). Nos linfócitos T, a estimulação com a PHA faz com que estas células produzam IL-2, uma citocina caracterizada por sua capacidade de manter a multiplicação *in vitro* de células T ativadas (PAWELEC et al., 1982).

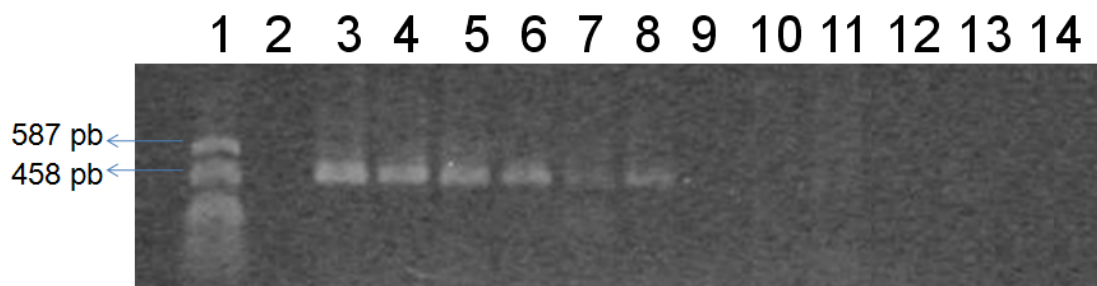
Como a PHA tem potente atividade mitogênica sobre linfócitos T, muito provavelmente superior à qualquer um dos galatos e das amostras de polissacarídeos que seriam testados, para se verificar a capacidade de estimulação destes compostos, foi estabelecido um período maior de incubação (24h) com as células Jurkat. Assim, nos ensaios subsequentes, os controles de estimulação com PHA e os testes com os galatos foram obtidos após 24 horas de incubação.

#### **5.8. Determinação da sensibilidade do RT-PCR para detecção da atividade estimulatória da PHA em células Jurkat:**

Para avaliar os limites de sensibilidade de detecção da estimulação celular com PHA, foram utilizadas as concentrações entre 10 até 0,02 µg/ml, por 24 horas.

A presença do estímulo celular para o marcador IL-2 pode ser verificada até a concentração de 0,32 µg/ml de PHA, conforme observado na Figura 17.

Para evitar eventuais variações entre os testes, já que as bandas apareceram mais fracamente nas duas últimas diluições (0,63 e 0,32 µg/ml), a concentração escolhida de PHA como controle de estimulação foi de 1µg/ml.



**Figura 17:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 em diferentes concentrações de incubação. Linha 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 = controle negativo (sem adição de cDNA), 3 = 10 µg/ml de PHA, 4 = 5 µg/ml de PHA, 5 = 2,5 µg/ml de PHA, 6 = 1,25 µg/ml de PHA, 7 = 0,63 µg/ml de PHA, 8 = 0,32 µg/ml de PHA, 9 = 0,16 µg/ml de PHA, 10 = 0,08 µg/ml de PHA, 11 = 0,04 µg/ml de PHA, 12 = 0,02 µg/ml de PHA, 13 = controle celular (sem adição de PHA) tempo de 0 horas e 14 = controle celular tempo de 24 horas.

### 5.9. Seleção do imunossupressor para controle de inibição celular:

Imunossupressores são fármacos que deprimem a resposta imunológica, sendo geralmente utilizados em casos de transplante (RABINOVICH; GABRILOVICH; SOTOMAYOR, 2007). Neste trabalho foram testados três fármacos: Ciclosporina A, Dexametasona e Cortisona.

A ciclosporina A (CsA) é um imunossupressor, originalmente isolado do fungo *Hypocladium inflatum* e, desde a sua descoberta no início dos anos 70, vindo sendo amplamente utilizado para o tratamento de transplantes e doenças autoimunes, pois possui ação específica inibitória dos linfócitos T (SHEVACH, 1985; SIGAL; DUMONT, 1992; FAULDS; GOA; BENFIELD, 1993; MAGES et al., 1998; MATSUDA; KOYASU, 2000).

A CsA possui alta afinidade pela proteína citosólica ciclofilina A e este complexo binário inibe a atividade da calcineurina, que em circunstâncias normais, é responsável pela ativação das proteínas NFAT (fator nuclear de ativação das células T). Estas proteínas desempenham um papel central na transcrição de genes de células T ativadas, incluindo genes de citocinas, tais como IL-2, IL-4 e CD 40 ligante. Sendo assim, a CsA inibe essa translocação nuclear das NFAT, resultando na supressão de células T efectoras (MATSUDA; KOYASU, 2000).

Apesar de ser altamente eficaz para evitar a rejeição de órgãos transplantados, a utilização da CsA como imunossupressor é limitada por seus efeitos colaterais graves,

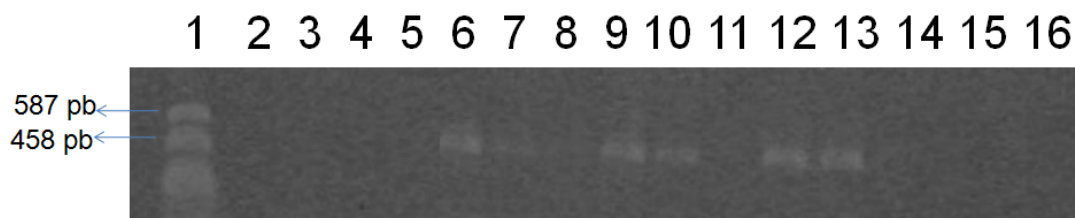
incluindo nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade e hipertensão (MATSUDA; KOYASU, 2000; MINGUILLON et al., 2005).

Os glicocorticóides inibem a proliferação de células T e a produção da IL-2, por interferir na ligação do fator nuclear da proteína de ativação AP-1, que é o promotor da transcrição do gene da IL-2 além de inibir a ação da calcineurina (BRAUN et al., 1997; RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

A cortisona (Cor) é um fármaco sintético, elaborado a partir do hormônio glicocorticóide liberado pela córtex adrenal, o cortisol (PLECHNER, 2004). Ela exerce efeitos imunossupressores, anti-inflamatórios e na regulação da proliferação celular (BEATO, 1989; ASHWELL; LU; VACCHIO, 2000). A cortisona foi administrada, pela primeira vez em 1948, em uma paciente que sofria de artrite reumatóide (AR) e, posteriormente, o tratamento foi rapidamente adotado, não somente para paciente com AR, mas também para outras doenças reumáticas, como lúpus eritematoso sistêmico (LUNDBERG et al., 2004).

A dexametasona (Dex) é um análogo sintético dos glicocorticóides, que inibe efetivamente a resposta imune e inflamatória (BAUS et al., 1996).

Para verificar a ocorrência do efeito inibidor da CsA, Dex e Cor, sobre a ação ativadora da PHA, as células foram incubadas por 24 horas com cada imunossupressor (1µg/ml) e, posteriormente, foram estimuladas por 3 horas, correspondente ao período mínimo necessário para o aparecimento da banda específica na reação de RT-PCR, com diferentes concentrações de PHA (1, 0,5 e 0,25 µg/ml). Nestas condições, a CsA foi o único fármaco que conseguiu inibir totalmente a ação estimulatória da PHA, nas três condições testadas, e também capaz de impedir a expressão da IL-2, conforme pode ser observado na Figura 18. Após este período de inibição celular, a concentração mínima de estimulação foi de 0,5 µg/ml. Assim, nos demais experimentos realizados para detecção de possíveis efeitos supressores dos galatos sobre as células Jurkat, estas foram incubadas com os compostos nas concentrações previamente estabelecidas, pelo tempo de 24 horas e, a seguir, as células foram expostas a 0,5 µg/ml de PHA, durante mais 3 horas. Os controles de inibição foram sempre realizados através da incubação das células Jurkat com 1µg/ml de CsA, durante 24h, seguido de incubação com PHA, nas mesmas condições descritas acima.



**Figura 18:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio, demonstrando o teste de inibição celular pela CsA, Dex e Cor. Canaleta 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 = controle negativo (sem adição de cDNA), 3 = 1 µg/ml de CsA/24h e 1 µg/ml de PHA/3h, 4 = 1 µg/ml de CsA/24h e 0,5 µg/ml de PHA/3h, 5 = 1 µg/ml de CsA/24h e 0,25 µg/ml de PHA/3h, 6 = 1 µg/ml de DEX/24h e 1 µg/ml de PHA/3h, 7 = 1 µg/ml de DEX/24h e 0,5 µg/ml de PHA/3h, 8 = 1 µg/ml de DEX/24h e 0,25 µg/ml de PHA/3h, 9 = 1 µg/ml de COR/24h e 1 µg/ml de PHA/3h, 10 = 1 µg/ml de COR/24h e 0,5 µg/ml de PHA/3h, 11 = 1 µg/ml de COR/24h e 0,25 µg/ml de PHA/3h, 12 = controle celular de 1 µg/ml de PHA/3h, 13 = controle celular 0,5 µg/ml de PHA/3h, 14 = controle celular 0,25 µg/ml de PHA/3h, 15 = controle celular (sem adição de PHA) tempo 0h e 16 = controle celular (sem adição de PHA) tempo de 24h.

### 5.10. Avaliação da potencial atividade imunoestimulatória dos galatos:

O ácido gálico é um composto fenólico tri-hidroxilado (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) obtido através da hidrólise de taninos. Seus n-alquil ésteres, também conhecidos como galatos, principalmente os galatos de propila, octila e dodecila, são utilizados como antioxidantes em alimentos, evitando desta forma, alterações de sabor e valor nutritivo causados pela oxidação de gorduras insaturadas (GUNCKEL et al., 1998; KUBO et al., 2000; LECLERCQ; ARCELLA; TURRINI, 2000; KUBO et al., 2002a). Também são utilizados como antioxidantes pelas indústrias farmacêutica e cosmética, melhorando a estabilidade dos produtos (GUNCKEL et al., 1998).

Essa ação antioxidante ocorre pela prevenção da formação de ânion superóxido e de ácido úrico, através da inibição da enzima xantina oxidase, além da alteração da atividade da mieloperoxidase e sequestro do ácido hipocloroso (KUBO et al., 2002a; ROSSO et al., 2006). O galato de octila inibe a atividade da lipoxigenase (HA; NIHEI; KUBO, 2004).

Além da atividade antioxidante, pode-se citar outras atividades biológicas/farmacológicas já descritas para estes compostos. Os resultados obtidos variam imensamente entre si, no entanto, é inquestionável o fato de que o tamanho da cadeia alquílica interfere nas atividades biológicas, porém não existe um padrão para tal, sendo necessária a avaliação de cada caso. Dentre as atividades relatadas estão: influência sobre a enzima esqualeno epoxidase, que está relacionada com a biossíntese do colesterol (ABE; SEKI; NOGUCHI, 2000); atividades anti-inflamatória (MURASE et al., 1999), relaxante vascular

(PAULINO et al., 1999) e neuroprotetora (BASTIANETTO et al., 2006). Entretanto, a maioria dos trabalhos realizados com galatos está relacionada com seus efeitos antineoplásicos e anti-infecciosos.

Na pesquisa do câncer, Feng e colaboradores (2003) relataram que os galatos possuem atividade antimutagênica e de inibição de CYP1A, uma enzima do metabolismo de xenobióticos da família do citocromo P450, enquanto que outros pesquisadores demonstraram citotoxicidade e indução de apoptose em células tumorais, modulação da glicoproteína P, envolvida no mecanismo de extrusão de quimioterápicos, e supressão do gene do vírus tumoral mamário de camundongos (BAER-DUBOWSKA; GNOJKOWSKI; FENRYCH, 1997; SAEKI et al., 2000; GNOJKOWSKI; KRAJKA-KUZNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2001; FIUZA et al., 2004; KITAGAWA et al., 2005; VELURI et al., 2006; FREY et al., 2007).

Como efeitos adversos dos galatos de propila e octila, foram relatadas sensibilização e dermatite de contato alérgica, em muitos pacientes (BOJS; NICKLASSON; SVENSSON, 1987; GARCIA-MELGARES et al., 2007; PEREZ et al., 2008), sendo que a citotoxicidade do ácido gálico é devido à presença das três hidroxilas adjacentes (FREY et al., 2007).

Os galatos também apresentam atividade sobre agentes infecciosos, tendo sido demonstradas ações antibacteriana (BOYD; BEVERIDGE, 1981; KUBO; FUJITA; NIHEI, 2002; KUBO et al., 2003; KUBO et al., 2004; STAPLETON et al., 2004; KREANDER; VUORELA; TAMMELA, 2005; SHIBATA et al., 2005), antifúngica (KUBO; XIAO; FUJITA, 2001; FUJITA; KUBO, 2002; KUBO et al., 2002b; HSU; CHANG; CHANG, 2007), antiviral (KANE et al., 1988; AHN et al., 2002; SAVI et al., 2005; UOZAKI et al., 2007; KRATZ et al., 2008a; KRATZ et al., 2008b) e tripanocida (ALBINO, 2005), podendo inibir a cadeia respiratória do parasita *Trypanosoma cruzi* (LETELIER et al., 1990).

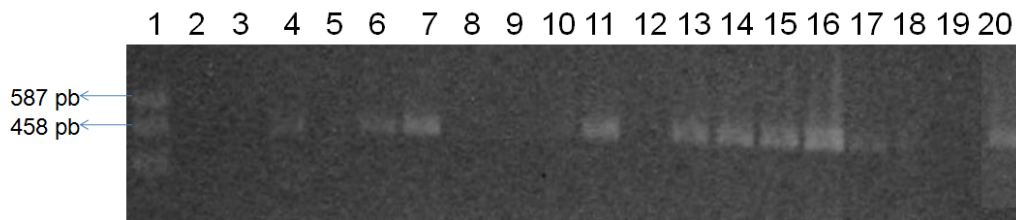
Para avaliação do potencial de ativação dos galatos, células Jurkat foram incubadas com 2  $\mu$ M de cada composto, por 24 horas. Conforme pode ser observado (Figura 19 A), dos 15 compostos testados, houve detecção expressiva do mRNA da IL-2, quando as células foram estimuladas com os galatos de propila, butila, octila, decila, undecila, dodecila e tetradecila, sendo estes resultados interpretados como potencial efeito ativador sobre essas células.

Os compostos com pouca ou nenhuma atividade (conforme a intensidade das bandas) foram também testados durante 48 (dados não mostrados) e 72 horas. Nestas condições, somente o galato de nonila mostrou atividade de estimulação celular após o período de 72 horas (Figura 19B). Este resultado confirmou que as bandas de pouca intensidade que



apareciam com 24h, não eram decorrentes de pouco tempo de estimulação e sim inespecíficas, exceto para o galato de nonila.

A)



B)



**Figura 19:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 estimulado com 2  $\mu$ M dos compostos de galatos por 24 (A) e 72 (B) horas.

A) Linha 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 = controle negativo (sem adição de cDNA), 3 = Ácido Gálico, 4 = Galato de Metila, 5 = Galato de Etila, 6 = Galato de Propila, 7 = Galato de Butila, 8 = Galato de Pentila, 9 = Galato de Hexila, 10 = Galato de Heptila, 11 = Galato de Octila, 12 = Galato de Nonila, 13 = Galato de Decila, 14 = Galato de Undecila, 15 = Galato de Dodecila, 16 = Galato de Tetradecila, 17 = Galato de Octadecila, 18 = Controle Celular (sem adição de PHA) tempo de 0 horas, 19 = Controle Celular tempo de 24 horas e 20 = Controle Positivo 1  $\mu$ g/ml de PHA.

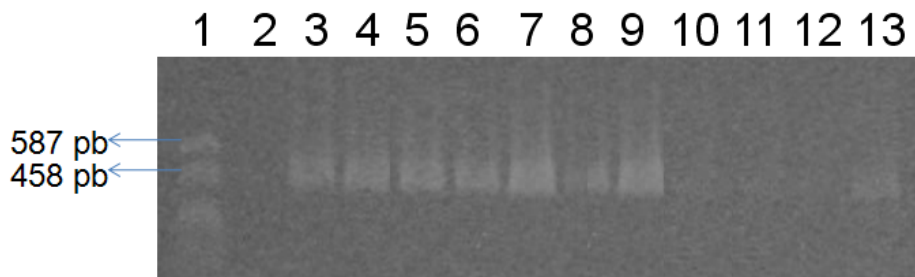
B) Linha 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 = controle negativo (sem adição de cDNA), 3 = Ácido Gálico, 4 = Galato de Metila, 5 = Galato de Etila, 6 = Galato de Pentila, 7 = Galato de Hexila, 8 = Galato de Heptila, 9 = Galato de Nonila, 10 = Galato de Octadecila, 11 = Controle Celular (sem adição de PHA) tempo de 0 horas, 12 = Controle Celular tempo de 72 horas e 13 = Controle Positivo 1  $\mu$ g/ml de PHA.

### 5. 11. Avaliação da potencial atividade imunossupressora dos galatos:

Os compostos que não mostraram atividade imunoestimulatória sobre as células Jurkat, foram testados para avaliar seu potencial de inibição sobre estas células, nas condições pré-estabelecidas, descritas no item 4.5.2. A concentração utilizada foi de 2  $\mu$ M por 24 horas.

As células Jurkat incubadas com o ácido gálico e os galatos de metila, etila, pentila, hexila, heptila e octadecila não mostraram atividade inibitória, pois apresentam o marcador IL-2, após as células serem estimuladas com PHA (Figura 20).

A ausência da expressão do mRNA da IL-2, após incubação com estes galatos, poderia ser interpretada como um possível efeito inibitório sobre linfócitos T. Como também pode ser observado na Figura 19 (linha 10), somente a CsA demonstrou tal atividade.



**Figura 20:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 com 2  $\mu$ M dos galatos por 24 horas. Linha 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 = controle negativo (sem adição de cDNA), 3 = Ácido Gálico, 4 = Galato de Metila, 5 = Galato de Etila, 6 = Galato de Pentila, 7 = Galato de Hexila, 8 = Galato de Heptila, 9 = Galato de Octadecila, 10 = Controle positivo da inibição (1  $\mu$ g/ml de CsA), 11 = Controle Celular (sem adição de PHA) tempo de 0 horas, 12 = Controle Celular tempo de 24 horas e 13 = Controle Positivo Estimulação (0,5  $\mu$ g/ml de PHA).

### 5.12. Avaliação da potencial atividade imunoestimulatória das amostras dos polissacarídeos de *Agaricus blazei*:

Os cogumelos medicinais têm suscitado grande interesse pelo seu valor nutricional e suas propriedades farmacológicas. Com fins medicinais, eles têm sido consumidos com objetivo de prevenir câncer e doenças cardíacas, melhorar a circulação sanguínea e reduzir o colesterol (WASSER; WEIS, 1999). Além disso, esses cogumelos são usados para combater o estresse físico e emocional, para estimular a imunidade, melhorar a qualidade de vida de diabéticos, e para combater doenças como osteoporose, úlcera gástrica e hepatite crônica (DIAS; ABE; SCHWAN, 2004; FIRENZUOLI; GORI; LOMBARDO, 2007).

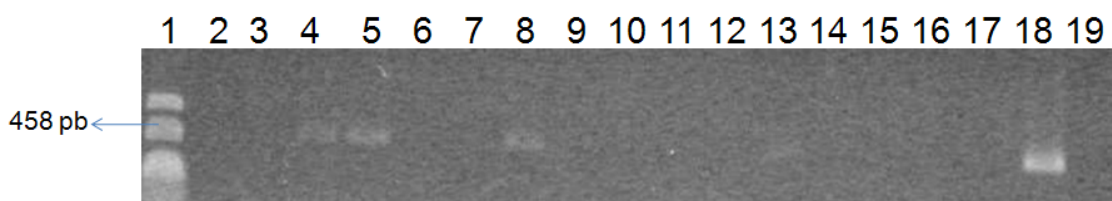
Metabólitos bioativos podem ser isolados dos corpos de frutificação, cultura pura de micélios e cultura filtrada. Muitas substâncias com atividade imunomoduladora e antitumoral foram isoladas de cogumelos, incluindo principalmente os polissacarídeos ( $\beta$ -D-glucanas), tendo como efeito imunomodulador a ativação de células do sistema imune (linfócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas), resultando na produção de citocinas (LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005).

O basidiomiceto *Agaricus blazei* é um cogumelo comestível nativo do sudeste do Brasil, popularmente conhecido como “cogumelo do sol”, que vem sendo produzido e consumido como alimento e como remédio (LAKHANPAL; RANA, 2005). Foi descoberto

no Brasil em 1960, pelo produtor e pesquisador japonês, Takatoshi Furumoto. No Japão, é popularmente conhecido como *himematsutake* (FIRENZUOLI; GORI; LOMBARDO, 2007).

Mizuno et al. (1998) observaram aumento nas subpopulações de células T, após a administração oral, em camundongos, de  $\alpha$ -1,6-glucana e  $\alpha$ -1,4-glucana, polissacarídeos isolados de *Agaricus blazei*. Componentes das duas frações de *A. blazei*, obtidas por extrações com diferentes concentrações de etanol, ativaram macrófagos *in vitro* e aumentar a expressão do mRNA da IL-8 e do TNF- $\alpha$ . Estas observações levaram os autores a concluir que a recuperação de certos pacientes com câncer, após a ingestão de extratos de *Agaricus*, poderia ser devido à ativação do sistema imune, ao invés do efeito direto destes nas células neoplásicas (MIZUNO et al., 1998; SORIMACHI et al., 2001).

Para avaliação do potencial de ativação, células Jurkat foram incubadas com 10  $\mu$ g de cada amostra, por 24 horas. Conforme pode ser observado na Figura 21, houve detecção expressiva do mRNA da IL-2, quando as células foram estimuladas com os: polissacarídeos extraídos da frutificação (produtos separados por membrana de ultrafiltração 1 e 2 – linhas 4 e 5) e polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de microfiltração – linha 8), sendo estes resultados interpretados como potencial efeito ativador sobre essas células.



**Figura 21:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação do marcador IL-2 estimulado com 10  $\mu$ g das amostras de polissacarídeos de *Agaricus blazei* por 24 horas. Linha 1 = padrão de tamanho molecular (pUC), 2 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto bruto), 3 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto separado por membrana de microfiltração), 4 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto separado por membrana de ultrafiltração 1), 5 = amostra de polissacarídeo extraídos da frutificação (produto separação por membrana de ultrafiltração 2), 6 = amostra de polissacarídeo extraído da frutificação (produto separado por membrana de nanofiltração), 7 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto bruto), 8 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de microfiltração), 9 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de ultrafiltração 1), 10 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de ultrafiltração 2), 11 = amostra de polissacarídeo extraído do micélio em grãos de trigo (produto separado por membrana de nanofiltração), 12 = amostra de polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto bruto), 13 = polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de microfiltração), 14 = polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de ultrafiltração 1), 15 = polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de ultrafiltração 2), 16 = polissacarídeos do micélio em meio líquido (produto separado por membrana de nanofiltração), 17 = Controle Celular tempo de 24 horas, 18 = Controle Positivo 1  $\mu$ g/ml de PHA e 19 = Controle negativo (sem adição de cDNA).

### 5.13. Avaliação da potencial atividade imunoestimulatória dos galatos e dos polissacarídeos de *Agaricus blazei*, através de citometria de fluxo:

Para avaliar qual o melhor marcador celular para avaliar a potencial atividade de estimulação das células Jurkat, através da técnica de citometria de fluxo, três controles celulares ( $10^6$  células/ml) foram marcados com os anticorpos monoclonais anti CD3, CD2, CD7, CD11a, DR2 CD25, CD38, CD45RA e CD45RO: células não estimuladas, células estimuladas com PHA ( $1\mu\text{g/ml}$ ) e células inibidas com CsA ( $1\mu\text{g/ml}$ ) por 24 horas e estimuladas em seguida com PHA ( $0,5\mu\text{g/ml}$ ) por 3 horas.

Os resultados apresentados no Quadro 8 mostram que somente os AcMo DR2 e CD25 tiveram a frequência aumentada quando estimulados com PHA e sem alteração quando em repouso ou inibidas com CsA. O marcador celular escolhido para verificar a estimulação das células frente aos compostos testados foi o AcMo CD25, uma vez que este, está de relacionado com a IL-2.

A molécula CD25 é uma das três subunidades do receptor de IL-2 (IL-2R), composto também por IL-2R $\beta$  (CD122) e cadeia gama ou  $\gamma\text{c}$  (CD132) (MALEK, 2008). O CD25 não é expresso em células em repouso, mas é fortemente induzido após a ativação da célula T (HEMAR et al., 1995).

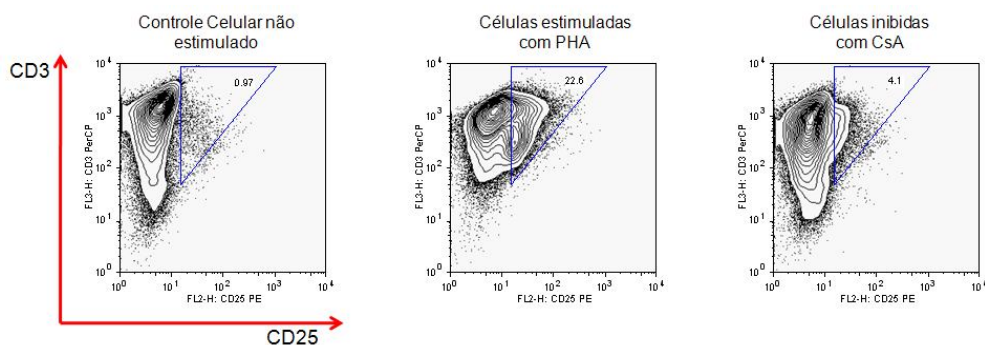
**Quadro 8:** Comparação dos marcadores celulares para a avaliação da potencial atividade de estimulação de células Jurkat por citometria de fluxo

Anticorpo Monoclonal	Células não estimuladas	Células estimuladas com PHA	Células inibidas com CsA
CD3	+	+	+
CD2	-	-	-
CD7	+	+	+
CD11a	-	-	-
DR2	-	+	-
CD25	-	+	-
CD38	+	+	+
CD45RA	+	+	+
CD45RO	+	+	+

A fim de avaliar a ação imunomoduladora dos galatos ( $2\mu\text{M}$ ) e dos polissacarídeos ( $10\mu\text{g}$ ) de *Agaricus blazei* sobre as células Jurkat, por um período de 24 horas,  $10^6$  células/ml

foram marcadas com os anticorpos anti-CD25-PE e anti-CD3-PerCP e analisadas por citometria de fluxo. Paralelamente, foram feitos três controles celulares: sem estimulação, estimulação com PHA (1 µg/ml) e inibição com CsA (1 µg/ml).

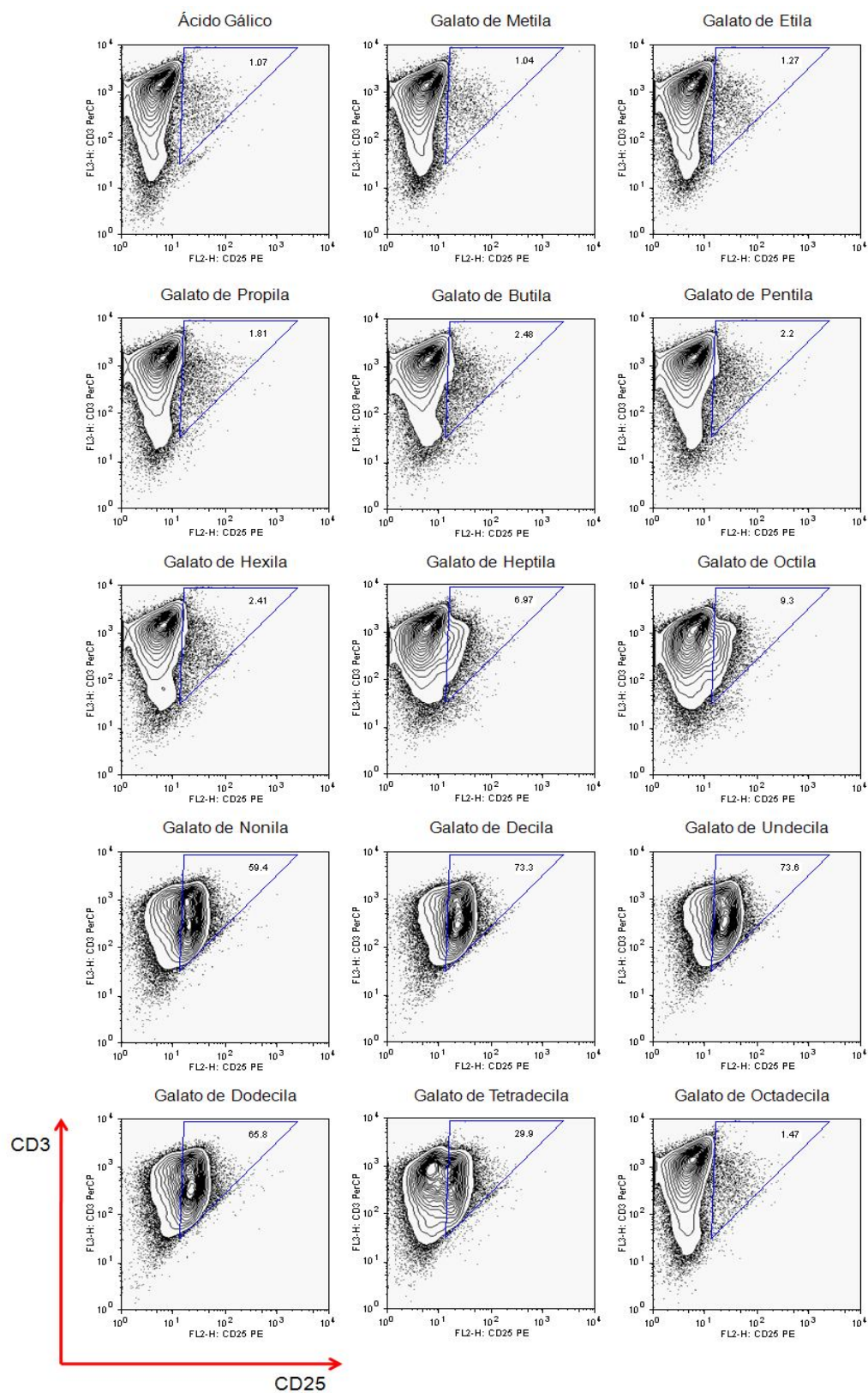
Como demonstrado na Figura 22, detectou-se estimulação de 21,63% nas células que foram incubadas com PHA em relação ao controle celular não estimulado. A frequência das células estimuladas, após inibição com CsA, foi de apenas 3,13%.



**Figura 22:** Avaliação da ativação de células Jurkat por citometria de fluxo. As células foram incubadas com PHA e CsA por 24 horas, paralelamente foi feito um controle celular sem estimulação. Após este período as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD25-PE e anticorpo anti-CD3-PerCP.

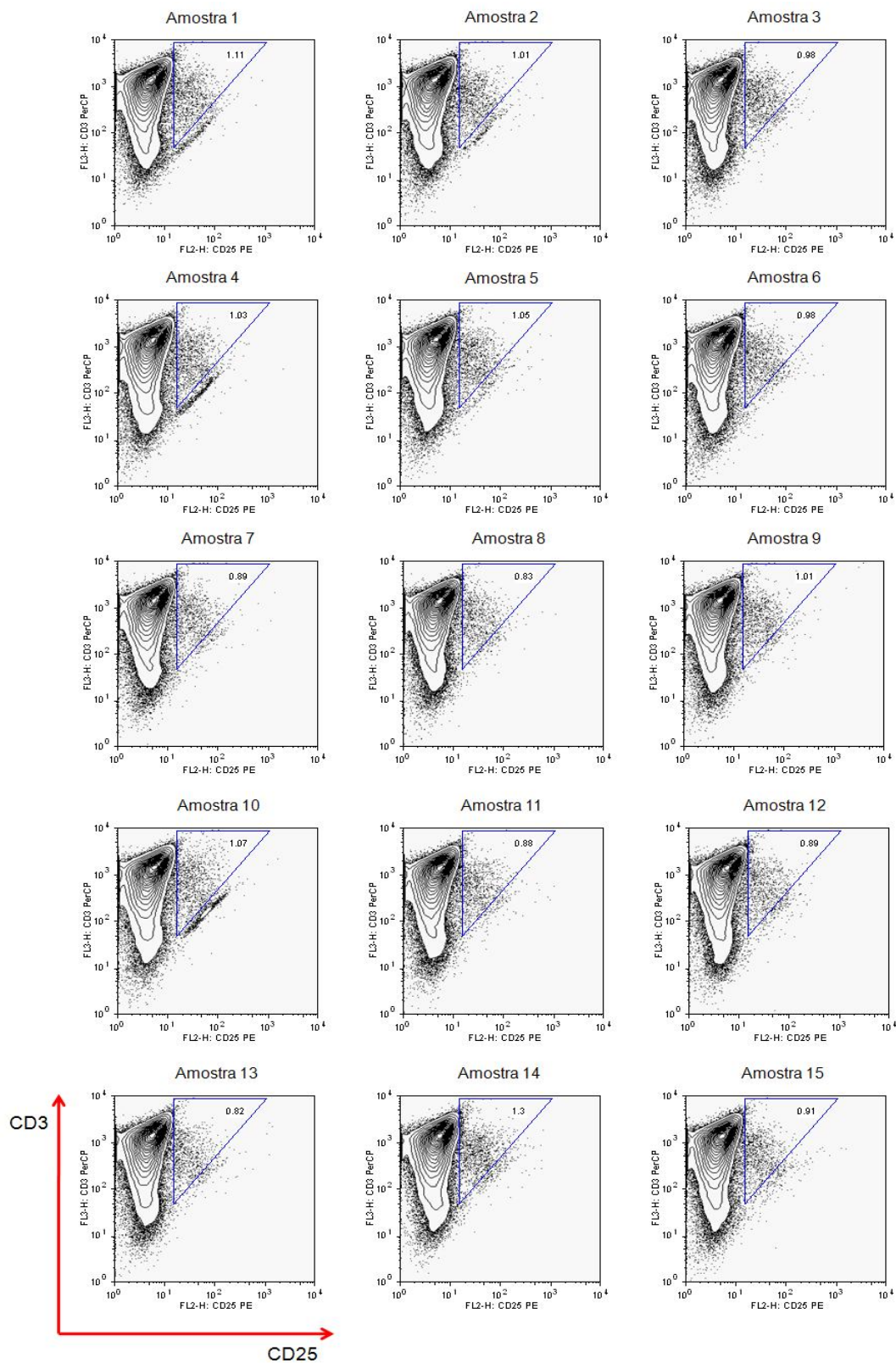
Os galatos de nonila, decila, undecila, dodecila e tetradecila foram capazes de induzir aumento na frequência de células CD25 positivas em 58,43%, 72,33%, 72,63%, 64,83% e 28,93%, respectivamente, quando comparadas com o controle celular sem estimulação, e também aumento em relação às células estimuladas com PHA. Entretanto, a estimulação com os demais galatos não mostraram alteração alguma na expressão desse marcador, como demonstrado na Figura 23.

As células Jurkat incubadas com polissacarídeos de *Agaricus blazei* não demonstraram aumento de células CD25 positivas, quando comparadas com o controle celular estimulado com PHA, como pode ser observado na Figura 24.



**Figura 23:** Avaliação da potencial atividade imunestimulatória dos galatos nas células Jurkat, por citometria de fluxo. Células foram incubadas com os galatos por 24 horas e após este período, marcadas com os anticorpos anti-CD25-PE e anti-CD3-PerCP.





**Figura 24:** Avaliação da potencial atividade imunoestimulatória dos polissacarídeos nas células Jurkat, por citometria de fluxo. Células foram incubadas com polissacarídeos de *Agaricus blazei* por 24 horas e após este período, marcadas com os anticorpos anti-CD25-PE e anti-CD3-PerCP.

Comparando-se as técnicas de RT-PCR e citometria de fluxo para a avaliação da atividade imunomodulatória dos galatos (Quadro 9) e dos polissacarídeos de *Agaricus blazei* (Quadro 10), pôde-se verificar que houve concordância de resultados em 80%. A reação de RT-PCR, porém, mostrou-se mais sensível na detecção da ativação das células Jurkat, já que a atividade imunoestimulatória de três galatos (galato de propila, butila e octila) e três polissacarídeos (polissacarídeos 3, 4 e 7) só foram detectados por esta técnica.

**Quadro 9:** Comparação das técnicas de RT-PCR e de citometria de fluxo (CD25) para a avaliação da atividade imunomodulatória dos galatos.

Galatos	RT-PCR	CD25
Ácido Gálico	-	-
Galato de Metila	-	-
Galato de Etila	-	-
Galato de Propila	+	-
Galato de Butila	+	-
Galato de Pentila	-	-
Galato de Hexila	-	-
Galato de Heptila	-	-
Galato de Octila	+	-
Galato de Nonila	+(72h)	+
Galato de Decila	+	+
Galato de Undecila	+	+
Galato de Dodecila	+	+
Galato de Tetradecila	+	+
Galato de Octadecila	-	-

**Quadro 10:** Comparação das técnicas de RT-PCR e de citometria de fluxo (CD25) para a avaliação da atividade imunomodulatória dos polissacarídeos de *Agaricus blazei*.

Polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i>	RT-PCR	CD25
Polissacarídeo 1	-	-
Polissacarídeo 2	-	-
Polissacarídeo 3	+	-
Polissacarídeo 4	+	-
Polissacarídeo 5	-	-
Polissacarídeo 6	-	-
Polissacarídeo 7	+	-
Polissacarídeo 8	-	-
Polissacarídeo 9	-	-
Polissacarídeo 10	-	-
Polissacarídeo 11	-	-
Polissacarídeo 12	-	-
Polissacarídeo 13	-	-
Polissacarídeo 14	-	-
Polissacarídeo 15	-	-



**CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES:

6.1. O ensaio colorimétrico de MTT mostrou-se inadequado para a avaliação da citotoxicidade dos compostos utilizados neste trabalho, uma vez que os valores de  $CC_{50}$  não tinham correlação com a análise visual;

6.2. Padronizou-se a técnica de RT-PCR para IL-2, utilizando-se o iniciador Oligo dT para a construção do cDNA, tendo sido otimizada as condições de temperatura de anelamento e composição do tampão de reação;

6.3. Os galatos de propila, butila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila e tetradecila apresentaram atividade imunoestimulatória *in vitro*;

6.4. Nenhum galato apresentou atividade imunossupressora sobre as células Jurkat;

6.5. As amostras 3, 4 e 7 de polissacarídeos de *Agaricus blazei* demonstraram efeito imunoestimulatório *in vitro*;

6.6. A imunofenotipagem das células Jurkat, realizada através de citometria de fluxo, demonstrou que estas células apresentavam os seguintes marcadores: CD3, CD5 e CD7 e ausência dos marcadores CD4, CD8, CD1a, TCR $\alpha/\beta$  e TCR $\gamma/\delta$ , o que corresponde ao fenótipo de tímócitos subcapsulares imaturos;

6.7. A reação de RT-PCR mostrou-se mais sensível na detecção de estimulação de células Jurkat *in vitro* do que a caracterização fenotípica pela citometria de fluxo;

6.8. A reação de RT-PCR padronizada poderá servir para triagem *in vitro* de compostos de origem natural ou sintética, a partir da detecção da expressão do mRNA da IL-2.

**PERSPECTIVAS**

## **7. PERSPECTIVAS:**

7.1. Implementar ensaios mais fidedignos para determinação de  $CC_{50}$ ;

7.2. Estudar o mecanismo de ação dos galatos e dos polissacarídeos que demonstraram atividade estimulatória;

7.3. Refinar os estudos com citometria de fluxo;

7.4. Continuar a prospecção de produtos de origem natural ou sintética.

**REFERÊNCIAS**

**REFERÊNCIAS:**

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.189-214.

ALBINO, D.B.L. **Avaliação da atividade tripanocida de compostos fenólicos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ABE, I.; SEKI, T.; NOGUCHI, H. Potent and selective inhibition of squalene epoxidase by synthetic galloyl esters. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 270, n. 1, p. 137-40, 2000.

ABE, K.; MATSUKI, N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. **Neurosci Res**, v. 38, n. 4, p. 325-9, 2000.

ABE, K.; SAITO, H. Amyloid beta protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes. **Neurosci Res**, v. 31, n. 4, p. 295-305, 1998.

ABRAHAM, R. T.; WEISS, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 4, p. 301-8, 2004.

ACUTO, O.; CANTRELL, D. T cell activation and the cytoskeleton. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 165-84, 2000.

ACUTO, O.; MICHEL, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 12, p. 939-51, 2003.

AHN, M. J.; KIM, C. Y.; LEE, J. S.; KIM, T. G.; KIM, S. H.; LEE, C. K.; LEE, B. B.; SHIN, C. G.; HUH, H.; KIM, J. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*. **Planta Med**, v. 68, n. 5, p. 457-9, 2002.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

AMARAL, M.; GOMES, P. S.; LOPES, M. A.; SANTOS, J. D.; SILVA, R. F.; FERNANDES, M. H. Cytotoxicity evaluation of nanocrystalline diamond coatings by fibroblast cell cultures. **Acta Biomater**, v. 5, n. 2, p. 755-63, 2009.

ANDERSEN, M. H.; SCHRAMA, D.; THOR STRATEN, P.; BECKER, J. C. Cytotoxic T cells. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 1, p. 32-41, 2006.

ASHWELL, J. D.; LU, F. W.; VACCHIO, M. S. Glucocorticoids in T cell development and function. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 309-45, 2000.

BAER-DUBOWSKA, W.; GNOJKOWSKI, J.; FENRYCH, W. Effect of tannic acid on benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in mouse epidermis: comparison with synthetic gallic acid esters. **Nutr Cancer**, v. 29, n. 1, p. 42-7, 1997.

BARDOCZ, S.; GRANT, G.; EWEN, S. W.; DUGUID, T. J.; BROWN, D. S.; ENGLYST, K.; PUSZTAI, A. Reversible effect of phytohaemagglutinin on the growth and metabolism of rat gastrointestinal tract. **Gut**, v. 37, n. 3, p. 353-60, 1995.

BASTIANETTO, S.; YAO, Z. X.; PAPADOPOULOS, V.; QUIRION, R. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity. **Eur J Neurosci**, v. 23, n. 1, p. 55-64, 2006.

BAUS, E.; ANDRIS, F.; DUBOIS, P. M.; URBAIN, J.; LEO, O. Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes. **J Immunol**, v. 156, n. 12, p. 4555-61, 1996.

BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell**, v. 56, n. 3, p. 335-44, 1989.

BLACK, M. M.; SPEER, F. D. Effects of cancer chemotherapeutic agents on dehydrogenase activity of human cancer tissue in vitro. **Am J Clin Pathol**, v. 23, n. 3, p. 218-27, 1953.

BLOTT, E. J.; GRIFFITHS, G. M. Secretory lysosomes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 2, p. 122-31, 2002.

BOJS, G.; NICKLASSON, B.; SVENSSON, A. Allergic contact dermatitis to propyl gallate. **Contact Dermatitis**, v. 17, n. 5, p. 294-8, 1987.

BORDIGNON, J.; BRASIL-DOS-ANJOS, G.; BUENO, C. R.; SALVATIERA-OPORTO, J.; DAVILA, A. M.; GRISARD, E. C.; ZANETTI, C. R. Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. **Arch Virol**, v. 150, n. 4, p. 695-708, 2005.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett**, v. 24, n. 2-3, p. 119-24, 1985.

BOYD, L.; BEVERIDGE, E. G. Antimicrobial activity of some alkyl esters of gallic acid (3,4,5,-trihydroxybenzoic acid) against *Escherichia coli* NCTC 5933 with particular reference to n-propyl gallate. **Microbios**, v. 30, n. 120, p. 73-85, 1981.

BOYMAN, O.; PURTON, J. F.; SURH, C. D.; SPRENT, J. Cytokines and T-cell homeostasis. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 3, p. 320-6, 2007.

BRANCO, M. R.; BRANCO, T.; RAMIREZ, F.; POMBO, A. Changes in chromosome organization during PHA-activation of resting human lymphocytes measured by cryo-FISH. **Chromosome Res**, v. 16, n. 3, p. 413-26, 2008.

BRAUN, C. M.; HUANG, S. K.; BASHIAN, G. G.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L. M.; ESSAYAN, D. M. Corticosteroid modulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses. **J Allergy Clin Immunol**, v. 100, n. 3, p. 400-7, 1997.

CANTRELL, D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. **Annu Rev Immunol**, v. 14, p. 259-74, 1996.

CASTELLI, C.; RIVOLTINI, L.; ANDREOLA, G.; CARRABBA, M.; RENKVIST, N.; PARMIANI, G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. **J Cell Physiol**, v. 182, n. 3, p. 323-31, 2000.

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

CHO, J. H.; BOYMAN, O.; KIM, H. O.; HAHM, B.; RUBINSTEIN, M. P.; RAMSEY, C.; KIM, D. M.; SURH, C. D.; SPRENT, J. An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1787-801, 2007.

COEUGNIET, E. G.; ELEK, E. Immunomodulation with *Viscum album* and *Echinacea purpurea* extracts. **Onkologie**, v. 10, n. 3 Suppl, p. 27-33, 1987.

COOMBS, D.; KALERGIS, A. M.; NATHENSON, S. G.; WOFESY, C.; GOLDSTEIN, B. Activated TCRs remain marked for internalization after dissociation from pMHC. **Nat Immunol**, v. 3, n. 10, p. 926-31, 2002.



DA SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

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

DERENZIS, F. A.; SCHECHTMAN, A. Staining by neutral red and trypan blue in sequence for assaying vital and nonvital cultured cells. **Stain Technol**, v. 48, n. 3, p. 135-6, 1973.

DIAS, E. S.; ABE, C.; SCHAWN, R. F. Truth and myths about mushroom *Agaricus blazei*. **Scientia Agricola**, v. 61, p. 545-549, 2004.

DUBROVSKY, J. G.; GUTTENBERGER, M.; SARALEGUI, A.; NAPSUCIALY-MENDIVIL, S.; VOIGT, B.; BALUSKA, F.; MENZEL, D. Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots. **Ann Bot (Lond)**, v. 97, n. 6, p. 1127-38, 2006.

DUTTON, R. W.; BRADLEY, L. M.; SWAIN, S. L. T cell memory. **Annu Rev Immunol**, v. 16, P. 201-23, 1998.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against Salmonella. **Microbes Infect**, v. 3, n. 14-15, p. 1191-200, 2001.

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

ELLIOTT, M. R.; SHANKS, R. A.; KHAN, I. U.; BROOKS, J. W.; BURKETT, P. J.; NELSON, B. J.; KYTTARIS, V.; JUANG, Y. T.; TSOKOS, G. C.; KAMMER, G. M. Down-regulation of IL-2 production in T lymphocytes by phosphorylated protein kinase A-RIIbeta. **J Immunol**, v. 172, n. 12, p. 7804-12, 2004.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v. 8, n. 3, p. 186-94, 1998.

FAULDS, D.; GOA, K. L.; BENFIELD, P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. **Drugs**, v. 45, n. 6, p. 953-1040, 1993.

FENG, Q.; KUMAGAI, T.; NAKAMURA, Y.; UCHIDA, K.; OSAWA, T. Correlation of antimutagenic activity and suppression of CYP1A with the lipophilicity of alkyl gallates and other phenolic compounds. **Mutat Res**, v. 537, n. 1, p. 101-8, 2003.

FERRUA, B.; AUSSEL, C.; FEHLMANN, M. Human interleukin 2. Detection at the picomolar level by sandwich enzyme immunoassay. **J Immunol Methods**, v. 97, n. 2, p. 215-20, 1987.

FIEDLER, B.; LOHMANN, S. M.; SMOLENSKI, A.; LINNEMULLER, S.; PIESKE, B.; SCHRODER, F.; MOKKENTIN, J. D.; DREXLER, H.; WOLLERT, K. C. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 17, p. 11363-8, 2002.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **eCAM**, p.1-13, 2007.

FIUZA, S. M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L. J.; GIRAO DA CRUZ, M. T.; CORDEIRO, M. N.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M. P. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorg Med Chem**, v. 12, n. 13, p. 3581-9, 2004.

FREY, C.; PAVANI, M.; CORDANO, G.; MUNOZ, S.; RIVERA, E.; MEDINA, J.; MORELLO, A.; DIEGO MAYA, J.; FERREIRA, J. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 146, n. 4, p. 520-7, 2007.

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

GARCIA-MELGARES, M. L.; DE LA CUADRA, J.; MARTIN, B.; LAGUNA, C.; MARTINEZ, L.; ALEGRE, V. [Sensitization to gallates: review of 46 cases]. **Actas Dermosifiliogr**, v. 98, n. 10, p. 688-93, 2007.

GASPARONI, A.; CIARDELLI, L.; AVANZINI, M. A.; BONFICHI, M.; DI MARIO, M.; PIAZZI, G.; MARTINOTTI, L.; VANELLI, L.; RONDINI, G.; CHIRICO, G. Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation. **Pediatr Res**, v. 47, n. 6, p. 825-9, 2000.

GILLIS, S.; WATSON, J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. **J Exp Med**, v. 152, n. 6, p. 1709-19, 1980.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386-401, 2001.

GNOJKOWSKI, J.; KRAJKA-KUZNIAK, V.; BAER-DUBOWSKA, W. Monoclonal antibody-directed analysis of benzo[a]pyrene metabolism in rat liver and extrahepatic tissues: effect of propyl and octyl gallate. **Nutr Cancer**, v. 39, n. 1, p. 117-25, 2001.

GOTO, S.; OKADA, N.; KANEKO, A.; ISEMURA, M. Different effects of all-trans-retinoic acid on phorbol ester-stimulated and phytohemagglutinin-stimulated interleukin-2 expression in human T-cell lymphoma HUT-78 cells. **Cell Struct Funct**, v. 33, n. 1, p. 13-9, 2008.

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

GUPTA, M. K.; UHM, S. J.; HAN, D. W.; LEE, H. T. Embryo quality and production efficiency of porcine parthenotes is improved by phytohemagglutinin. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n. 4, p. 435-44, 2007.

HA, T. J.; NIHEI, K.; KUBO, I. Lipoxygenase inhibitory activity of octyl gallate. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 10, p. 3177-81, 2004.

HAMELRYCK, T. W.; DAO-THI, M. H.; POORTMANS, F.; CHRISPPEELS, M. J.; WYNS, L.; LORIS, R. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. **J Biol Chem**, v. 271, n. 34, p. 20479-85, 1996.

HARADA, T.; KAWAMINAMI, H.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; NAKAJIMA, M.; YADOMAE, T.; OHNO, N. Mechanism of enhanced hematopoietic response by soluble beta-glucan SCG in cyclophosphamide-treated mice. **Microbiol Immunol**, v. 50, n. 9, p. 687-700, 2006.

HARADA, T.; MIURA, N.; ADACHI, Y.; NAKAJIMA, M.; YADOMAE, T.; OHN, N. Effect of SCG, 1,3-beta-D-glucan from *Sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 7, p. 931-9, 2002a.

HARADA, T.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; NAKAJIMA, M.; YADOMAE, T.; OHNO, N. IFN-gamma induction by SCG, 1,3-beta-D-glucan from *Sparassis crispa*, in DBA/2 mice in vitro. **J Interferon Cytokine Res**, v. 22, n. 12, p. 1227-39, 2002b.

HEMAR, A.; SUBTIL, A.; LIEB, M.; MORELON, E.; HELLIO, R.; DAUTRY-VARSAT, A. Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains. **J Cell Biol**, v. 129, n. 1, p. 55-64, 1995.

HEMING, T. A.; TUAZON, D. M.; DAVE, S. K.; CHOPRA, A. K.; PETERSON, J. W.; BIDANI, A. Post-transcriptional effects of extracellular pH on tumour necrosis factor-alpha production in RAW 246.7 and J774 A.1 cells. **Clin Sci (Lond)**, v. 100, n. 3, p. 259-66, 2001.

HOUSE, R. V.; THOMAS, P. T.; BHARGAVA, H. N. In vitro evaluation of fentanyl and meperidine for immunomodulatory activity. **Immunol Lett**, v. 46, n. 1-2, p. 117-24, 1995.

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

HUNT, D. F.; HENDERSON, R. A.; SHABANOWITZ, J.; SAKAGUCHI, K.; MICHEL, H.; SEVILIR, N.; COX, A. L.; APPELLA, E.; ENGELHARD, V. H. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. **Science**, v. 255, n. 5049, p. 1261-3, 1992.

ISAKOV, N.; ALTMAN, A. Protein kinase C(theta) in T cell activation. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 761-94, 2002.

IWASHIMA, M. Kinetic perspectives of T cell antigen receptor signaling. A two-tier model for T cell full activation. **Immunol Rev**, v. 19, p. 1196-210, 2003.

JANEWAY Jr., C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 848.

JAFFE, E.S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; CAMPO, E.; PILERI, S.A.; SWERDLOW, S. H. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. *In*: SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. (Eds.) **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon: IARC, 2008. p. 158-166.

KALERGIS, A. M. Modulation of T cell immunity by TCR/pMHC dwell time and activating/inhibitory receptor pairs on the antigen-presenting cell. **Curr Pharm Des**, v. 9, n. 3, p. 233-44, 2003.

KAMIMURA, D.; BEVAN, M. J. Naive CD8<sup>+</sup> T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo. **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1803-12, 2007.

KANDULA, S.; ABRAHAM, C. LFA-1 on CD4<sup>+</sup> T cells is required for optimal antigen-dependent activation in vivo. **J Immunol**, v. 173, n. 7, p. 4443-51, 2004.

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

KEENAN, C.; LONG, A.; KELLEHER, D. Protein kinase C and T cell function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1358, n. 2, p. 113-26, 1997.

KHAJURIA, A.; GUPTA, A.; MALIK, F.; SINGH, S.; SINGH, J.; GUPTA, B. D.; SURI, K. A.; SUDEN, P.; SRINIVAS, V. K.; ELLA, K.; QAZI, G. N. A new vaccine adjuvant (BOS 2000) a potent enhancer mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with HBsAg. **Vaccine**, v. 25, n. 23, p. 4586-94, 2007.

KIM, G. Y.; LEE, J. Y.; LEE, J. O.; RYU, C. H.; CHOI, B. T.; JEONG, Y. K.; LEE, K. W.; JEONG, S. C.; CHOI, Y. H. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 70, n. 5, p. 1218-26, 2006.

KIM, H. B.; LEE, H. S.; KIM, S. J.; YOO, H. J.; HWANG, J. S.; CHEN, G.; YOUN, H. J. Ethanol extract of fermented soybean, Chungkookjang, inhibits the apoptosis of mouse spleen, and thymus cells. **J Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 256-61, 2007.

KITAGAWA, S.; NABEKURA, T.; KAMIYAMA, S.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, Y.; KASHIWADA, Y.; IKESHIRO, Y. Effects of alkyl gallates on P-glycoprotein function. **Biochem Pharmacol**, v. 70, n. 8, p. 1262-6, 2005.

KONYS, J.; MACKIEWICZ, U.; DRYGAS, J. Effect of cyclophosphamide-induced elimination of lymphocytes from the spleen and lymph node on immune response in mice. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 29, n. 6, p. 783-8, 1981.

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

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

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

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

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K.; MASUOKA, N. Non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate. **Bioorg Med Chem**, v. 11, n. 4, p. 573-80, 2003.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K.; NIHEI, A. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 5, p. 1072-6, 2004.

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

KUBO, I.; MASUOKA, N.; XIAO, P.; HARAGUCHI, H. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 12, p. 3533-9, 2002a.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 11, n. 3, p. 347-50, 2001.

KUBO, I.; XIAO, P.; NIHEI, K.; FUJITA, K.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T. Molecular design of antifungal agents. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 14, p. 3992-8, 2002b.

KUO, Y. C.; YANG, N. S.; CHOU, C. J.; LIN, L. C.; TSAI, W. J. Regulation of cell proliferation, gene expression, production of cytokines, and cell cycle progression in primary

human T lymphocytes by piperlactam S isolated from *Piper kadsura*. **Mol Pharmacol**, v. 58, n. 5, p. 1057-66, 2000.

KUO, Y. H.; LI, S. Y.; HUANG, R. L.; WU, M. D.; HUANG, H. C.; LEE, K. H. Schizanrins [corrected] B, C, D, and E, four new lignans from *Kadsura matsudai* and their antihepatitis activities. **J Nat Prod**, v. 64, n. 4, p. 487-90, 2001.

LAKHANPAL, T. N.; RANA, M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. **Plant Genetic Resources**, v. 3, p. 288-303, 2005.

LECLERCQ, C.; ARCELLA, D.; TURRINI, A. Estimates of the theoretical maximum daily intake of erythorbic acid, gallates, butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in Italy: a stepwise approach. **Food Chem Toxicol**, v. 38, n. 12, p. 1075-84, 2000.

LEE, C. L.; JIANG, P. P.; SIT, W. H.; WAN, J. M. Proteome of human T lymphocytes with treatment of cyclosporine and polysaccharopeptide: analysis of significant proteins that manipulate T cells proliferation and immunosuppression. **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 10, p. 1311-24, 2007.

LEE, Z. H.; KWACK, K.; KIM, K. K.; LEE, S. H.; KIM, H. H. Activation of c-Jun N-terminal kinase and activator protein 1 by receptor activator of nuclear factor kappaB. **Mol Pharmacol**, v. 58, n. 6, p. 1536-45, 2000.

LETELIER, M. E.; RODRIGUEZ, E.; WALLACE, A.; LORCA, M.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; ALDUNATE, J. Trypanosoma cruzi: a possible control of transfusion-induced Chagas' disease by phenolic antioxidants. **Exp Parasitol**, v. 71, n. 4, p. 357-63, 1990.

LEUNG, M. Y.; LIU, C.; KOON, J. C.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunol Lett**, v. 105, n. 2, p. 101-14, 2006.

LEWIS, G. M.; CACCESE, R. G.; HEASLIP, R. J.; BANSBACH, C. C. Effects of rolipram and CI-930 on IL-2 mRNA transcription in human Jurkat cells. **Agents Actions**, v. 39 Spec NoC89-92, 1993.

LIOI, L.; GALASSO, I.; LANAVE, C.; DAMINATI, M. G.; BOLLINI, R.; SPARVOLI, F. Evolutionary analysis of the APA genes in the *Phaseolus* genus: wild and cultivated bean species as sources of lectin-related resistance factors? **Theor Appl Genet**, v. 115, n. 7, p. 959-70, 2007.

LIU, K. C.; LIN, M. T.; LEE, S. S.; CHIOU, J. F.; REN, S.; LIEN, E. J. Antiviral tannins from two *Phyllanthus* species. **Planta Med**, v. 65, n. 1, p. 43-6, 1999.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J Neurochem**, v. 69, n. 2, p. 581-93, 1997.

LIU, Y.; SCHUBERT, D. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. **J Neurochem**, v. 69, n. 6, p. 2285-93, 1997.

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

LUNDBERG, I. E.; GRUNDTMAN, C.; LARSSON, E.; KLARESKOG, L. Corticosteroids--from an idea to clinical use. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 18, n. 1, p. 7-19, 2004.

MAGES, H. W.; BAAG, R.; STEINER, B.; KROCZEK, R. A. Utilization of an NF-ATp binding promoter element for EGR3 expression in T cells but not fibroblasts provides a molecular model for the lymphoid cell-specific effect of cyclosporin A. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 12, p. 7157-65, 1998.

MAGNANI, M.; CRINELLI, R.; BIANCHI, M.; ANTONELLI, A. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB). **Curr Drug Targets**, v. 1, n. 4, p. 387-99, 2000.

MALEK, T. R. The biology of interleukin-2. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 453-79, 2008.

MARTINEZ-GOMEZ, C.; BENEDICTO, J.; CAMPILLO, J. A.; MOORE, M. Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. **J Environ Monit**, v. 10, n. 4, p. 490-9, 2008.

MATSUDA, S.; KOYASU, S. Mechanisms of action of cyclosporine. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 2-3, p. 119-25, 2000.

MATSUDA, S.; MORIGUCHI, T.; KOYASU, S.; NISHIDA, E. T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. **J Biol Chem**, v. 273, n. 20, p. 12378-82, 1998.



MCCORMICK, J. L.; MCKEE, T. C.; CARDELLINA, J. H., 2ND; BOYD, M. R. HIV inhibitory natural products. 26. Quinoline alkaloids from *Euodia roxburghiana*. **J Nat Prod**, v. 59, n. 5, p. 469-71, 1996.

MINGUILLON, J.; MORANCHO, B.; KIM, S. J.; LOPEZ-BOTET, M.; ARAMBURU, J. Concentrations of cyclosporin A and FK506 that inhibit IL-2 induction in human T cells do not affect TGF-beta1 biosynthesis, whereas higher doses of cyclosporin A trigger apoptosis and release of preformed TGF-beta1. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 5, p. 748-58, 2005.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 62, n. 3, p. 434-7, 1998.

MORGAN, D. A.; RUSCETTI, F. W.; GALLO, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**, v. 193, n. 4257, p. 1007-8, 1976.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSS, P. A.; ROSENBERG, W. M.; BELL, J. I. The human T cell receptor in health and disease. **Annu Rev Immunol**, v. 10, p. 71-96, 1992.

MURASE, T.; KUME, N.; HASE, T.; SHIBUYA, Y.; NISHIZAWA, Y.; TOKIMITSU, I.; KITA, T. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 6, p. 1412-20, 1999.

NAGATA, S. Fas-mediated apoptosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 40, p. 6119-24, 1996.

NEEFJES, J. J.; SCHUMACHER, T. N.; PLOEGH, H. L. Assembly and intracellular transport of major histocompatibility complex molecules. **Curr Opin Cell Biol**, v. 3, n. 4, p. 601-9, 1991.

NETEA, M. G.; VAN DER MEER, J. W.; SUTMULLER, R. P.; ADEMA, G. J.; KULLBERG, B. J. From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 10, p. 3991-6, 2005.

OHTSUKA, T.; KAZIRO, Y.; SATOH, T. Analysis of the T-cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinases, protein kinase C, and Ras protein, which is modulated by intracellular cyclic AMP. **Biochim Biophys Acta**, v. 1310, n. 2, p. 223-32, 1996.

OKUMA, Y.; NOMURA, Y. Roles of muscarinic acetylcholine receptors in interleukin-2 synthesis in lymphocytes. **Jpn J Pharmacol**, v. 85, n. 1, p. 16-9, 2001.

OPPENHEIM, J. J. Cytokines: past, present, and future. **Int J Hematol**, v. 74, n. 1, p. 3-8, 2001.

PALMER, E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 5, p. 383-91, 2003.

PALUDAN, S. R.; ELLERMANN-ERIKSEN, S.; KRUYIS, V.; MOGENSEN, S. C. Expression of TNF-alpha by herpes simplex virus-infected macrophages is regulated by a dual mechanism: transcriptional regulation by NF-kappa B and activating transcription factor 2/Jun and translational regulation through the AU-rich region of the 3' untranslated region. **J Immunol**, v. 167, n. 4, p. 2202-8, 2001.

PANDEY, R.; MAURYA, R.; SINGH, G.; SATHIAMOORTHY, B.; NAIK, S. Immunosuppressive properties of flavonoids isolated from *Boerhaavia diffusa* Linn. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 3, p. 541-53, 2005.

PAULINO, N.; PIZOLLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CALIXTO, J. B. The mechanisms underlying the relaxant effect of methyl and ethyl gallates in the guinea pig trachea in vitro: contribution of potassium channels. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 360, n. 3, p. 331-6, 1999.

PAWELEC, G.; BOROWITZ, A.; KRAMMER, P. H.; WERNET, P. Constitutive interleukin 2 production by the JURKAT human leukemic T cell line. **Eur J Immunol**, v. 12, n. 5, p. 387-92, 1982.

PEREZ, A.; BASKETTER, D. A.; WHITE, I. R.; MCFADDEN, J. Positive rates to propyl gallate on patch testing: a change in trend. **Contact Dermatitis**, v. 58, n. 1, p. 47-8, 2008.

PLECHNER, A. J. Cortisol abnormality as a cause of elevated estrogen and immune destabilization: insights for human medicine from a veterinary perspective. **Med Hypotheses**, v. 62, n. 4, p. 575-81, 2004.

PROKSCH, P.; GIAISI, M.; TREIBER, M. K.; PALFI, K.; MERLING, A.; SPRING, H.; KRAMMER, P. H.; LI-WEBER, M. Rocaglamide derivatives are immunosuppressive

phytochemicals that target NF-AT activity in T cells. **J Immunol**, v. 174, n. 11, p. 7075-84, 2005.

RABINOVICH, G. A.; GABRILOVICH, D.; SOTOMAYOR, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 267-96, 2007.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nat Protoc**, v. 3, n. 7, p. 1125-31, 2008.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **N Engl J Med**, v. 353, n. 16, p. 1711-23, 2005.

RONICKE, R.; KLEMM, A.; MEINHARDT, J.; SCHRODER, U. H.; FANDRICH, M.; REYMANN, K. G. Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture? **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, p. e3236, 2008.

ROSSO, R.; VIEIRA, T. O.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 18, p. 6409-13, 2006.

SAEKI, K.; YUO, A.; ISEMURA, M.; ABE, I.; SEKI, T.; NOGUCHI, H. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 23, n. 11, p. 1391-4, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, V. 3, 2001.

SASAGAWA, M.; CECH, N. B.; GRAY, D. E.; ELMER, G. W.; WENNER, C. A. Echinacea alkylamides inhibit interleukin-2 production by Jurkat T cells. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 7, p. 1214-21, 2006.

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

SCHLUNS, K. S.; LEFRANCOIS, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 269-79, 2003.

SCHWARTZ, R. H. T cell anergy. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 305-34, 2003.

SEBZDA, E.; MARIATHASAN, S.; OHTEKI, T.; JONES, R.; BACHMANN, M. F.; OHASHI, P. S. Selection of the T cell repertoire. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 829-74, 1999.

SERFLING, E.; BERBERICH-SIEBELT, F.; CHUVPILO, S.; JANKEVICS, E.; KLEIN-HESSLING, S.; TWARDZIK, T.; AVOTS, A. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1498, n. 1, p. 1-18, 2000.

SHAHAT, A. A.; COS, P.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HAMMOUDA, F. M.; ISMAIL, S. I.; AZZAM, S.; CLAEYS, M.; GOOVAERTS, E.; PIETERS, L.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. J. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. **Planta Med**, v. 68, n. 6, p. 539-41, 2002.

SHAPIRO, V. S.; MOLLENAUER, M. N.; WEISS, A. Nuclear factor of activated T cells and AP-1 are insufficient for IL-2 promoter activation: requirement for CD28 up-regulation of RE/AP. **J Immunol**, v. 161, n. 12, p. 6455-8, 1998.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 5, p. E131-6, 2002.

SHEVACH, E. M. The effects of cyclosporin A on the immune system. **Annu Rev Immunol**, v. 3, p. 3397-423, 1985.

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

SHU, C. H.; WEN, B. J.; LIN, K. J. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF-alpha release capability of macrophage cell line RAW 264.7. **Biotechnol Lett**, v. 25, n. 24, p. 2061-4, 2003.

SIGAL, N. H.; DUMONT, F. J. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. **Annu Rev Immunol**, v. 10, p. 10519-60, 1992.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p. 35-40, 2002.

SINGH, G. B.; ATAL, C. K. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. **Agents Actions**, v. 18, n. 3-4, p. 407-12, 1986.

SMEE, D. F.; MORRISON, A. C.; BARNARD, D. L.; SIDWELL, R. W. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **J Virol Methods**, v. 106, n. 1, p. 71-9, 2002.

SMITH, K. A. The quantal theory of how the immune system discriminates between "self and non-self". **Med Immunol**, v. 3, n. 1, p. 3, 2004.

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

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

STARR, T. K.; JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A. Positive and negative selection of T cells. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 1139-76, 2003.

STOCKWIN, L. H.; MCGONAGLE, D.; MARTIN, I. G.; BLAIR, G. E. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. **Immunol Cell Biol**, v. 78, n. 2, p. 91-102, 2000.

STORDEUR, P.; POULIN, L. F.; CRACIUN, L.; ZHOU, L.; SCHANDENE, L.; DE LAVAREILLE, A.; GORIELY, S.; GOLDMAN, M. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **J Immunol Methods**, v. 259, n. 1-2, p. 55-64, 2002.

STRAUSS, G.; OSEN, W.; DEBATIN, K. M. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. **Clin Exp Immunol**, v. 128, n. 2, p. 255-66, 2002.

SURH, C. D.; BOYMAN, O.; PURTON, J. F.; SPRENT, J. Homeostasis of memory T cells. **Immunol Rev**, v. 21, p. 1154-63, 2006.

TANIGUCHI, T.; MATSUI, H.; FUJITA, T.; TAKAOKA, C.; KASHIMA, N.; YOSHIMOTO, R.; HAMURO, J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. **Nature**, v. 302, n. 5906, p. 305-10, 1983.

TANIGUCHI, T.; MINAMI, Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. **Cell**, v. 73, n. 1, p. 5-8, 1993.

TRAENCKNER, E. B.; WILK, S.; BAEUERLE, P. A. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. **Embo J**, v. 13, n. 22, p. 5433-41, 1994.

TURK, J. L. Relation between delayed hypersensitivity and cell-mediated immunity. **J R Soc Med**, v. 72, n. 4, p. 243-5, 1979.

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

VAN ROON, J. A.; BIJLSMA, J. W.; LAFEBER, F. P. Diversity of regulatory T cells to control arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 20, n. 5, p. 897-913, 2006.

VARESIO, L.; HOLDEN, H. T.; TARAMELLI, D. Mechanism of lymphocyte activation. II. Requirements for macromolecular synthesis in the production of lymphokines. **J Immunol**, v. 125, n. 6, p. 2810-7, 1980.

VELURI, R.; SINGH, R. P.; LIU, Z.; THOMPSON, J. A.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1445-53, 2006.

VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGHE, D. A. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? **J Ethnopharmacol**, v. 32, n. 1-3, p. 141-53, 1991.

WALTERSCHEID, J. P.; NGHIEM, D. X.; ULLRICH, S. E. Determining the role of cytokines in UV-induced immunomodulation. **Methods**, v. 28, n. 1, p. 71-8, 2002.

WANG, P. H.; HSU, C. I.; TANG, S. C.; HUANG, Y. L.; LIN, J. Y.; KO, J. L. Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon-gamma production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 9, p. 2721-5, 2004.

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

YAZDANBAKHSI, M.; RODRIGUES, L. C. Allergy and the hygiene hypothesis: the Th1/Th2 counterregulation can not provide an explanation. **Wien Klin Wochenschr**, v. 113, n. 23-24, p. 899-902, 2001.

YUN, C. H.; ESTRADA, A.; VAN KESSEL, A.; PARK, B. C.; LAARVELD, B. Beta-glucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 35, n. 1, p. 67-75, 2003.