

**IRMA XIMENA BARBOSA SANCHEZ**

**ESTUDO “in vitro” DA APOPTOSE INDUZIDA EM LINFÓCITOS DE  
CAMUNDONGOS (BALB/c) IMUNIZADOS COM O PEPTÍDEO SINTÉTICO  
SBm7462**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B238e  
2004

Barbosa Sanchez, Irma Ximena, 1974-

Estudo “in vitro” da apoptose induzida em linfócitos de camundongos (BALB/c) imunizados com o peptídeo sintético SBm7462 / Irma Ximena Barbosa Sanchez. – Viçosa : UFV, 2004.

xvii, 79f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 69-79.

labo-

1. Imunologia veterinária. 2. Linfócitos - Apoptose. 3. Peptídeos sintéticos. 4. Camundongo como animal de

ratório. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 636.0896079

**IRMA XIMENA BARBOSA SANCHEZ**

**ESTUDO “ in vitro” DA APOPTOSE INDUZIDA EM LINFÓCITOS DE  
CAMUNDONGOS (BALB/c) IMUNIZADOS COM O PEPTÍDEO SINTÉTICO  
SBm7462**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**APROVADA:** 05 de maio de 2004

---

Prof. Joaquín Hernán Patarroyo S.  
(Conselheiro)

---

Prof. Olindo Assis Martins Filho

---

Prof. José Mário Silveira Mezêncio

---

Prof. Luis Carlos Crocco Afonso

---

Prof<sup>a</sup> Marlene I. Vargas Vilória  
(Orientadora)

*A Dios,  
A mi familia,  
Mi Madre: Beatriz.  
Mis Hermanos: Beatriz, Tatiana, Luis Alberto.  
Mi sobrina: Tatiana Alejandra  
Mi soporte,  
Y quienes siempre creyeron en mí.  
Dedico este trabajo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por iluminar meu caminho em todo momento.

A minha mãe Beatriz, pelo grande carinho, amor, pela compreensão, orientação e apoio que sempre me dá para fazer meus sonhos realidade.

Aos meus irmãos Beatriz Eugenia, Tatiana e Luis Alberto pelo amor e o imenso apoio e incentivo.

A Minha orientadora professora Marlene Isabel Vargas Vitoria, pela oportunidade, orientação, pelos ensinamentos e pelo grande carinho.

Ao professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, pela valiosa co-orientação, pela participação intensa na minha formação acadêmica, pelo carinho e amizade em todo este tempo.

Ao professor Luis Carlos Crocco Afonso do Departamento de imunoparasitologia da UFOP pelas sugestões e disponibilidade de seu laboratório colaborando no desenvolvimento do presente trabalho.

Ao professor Olindo Assis Martins Filho, pesquisador do Centro de pesquisas René Rachou, pela valiosa orientação e colaboração ao disponibilizar o uso de seu laboratório.

Ao PRODETAB (Projeto de Apoio ao Desenvolvimento de Tecnologia Agropecuária para o Brasil), e à Universidade Federal de Viçosa pelo suporte financeiro e estrutural indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Universidad del Tolima na Colômbia pela formação dada e a oportunidade cedida para a realização deste curso.

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa e ao Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) por contribuírem na formação científica.

As minhas grandes amigas colombianas Claudia e Gloria Patrícia, pela paciência, amizade e apoio desinteressado em todo momento.

As minhas queridas amigas da Colômbia Pilar Ximena e Mayra Xiomara, pela colaboração e amizade .

Ao Ferdinan pelo carinho, pela compreensão e amizade.

Ao Policarpo pela amizade desinteressada e a grande ajuda durante todo o decorrer do experimento.

A Priscilla por todo o carinho, ajuda e amizade que me brindou.

Ao Luciano e Everaldo pela grande ajuda no desenvolvimento da parte estatística deste trabalho.

Aos meus amigos da Colômbia Alba, Carmen, Catalina, Dina, Dorita, Everaldo, Fabio, Juan José, Luis Ernesto, Liliana, Mônica, Omar, Omar Leonardo, Ramón, Rida, Rodrigo pelo companheirismo e a amizade.

Aos meus colegas de mestrado Raul, Policarpo, Priscilla, Larissa, Michelle, Fabiana, Giselle, pela amizade e ajuda em todo momento.

Ao Marcinho pela assessória técnica, nos momentos de dificuldade.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Paula P., Ana Paula A., Carla, Carolina, Carlos, Ferdinan, Larissa, Liza e Sidimar pela ajuda e a convivência agradável.

A Carolina e Carla pelo auxílio imprescindível na realização das culturas celulares e pela amizade.

A Rose pela valiosa ajuda e disposição em todo momento.

Aos funcionários do Biotério do Centro de Ciências Biológicas/UFV pela valiosa colaboração.

Ao pessoal do isolamento: José Carlos, Cauzinho, pela ajuda.

A Cláudio e Adão pela ajuda oportuna durante o mestrado.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho, muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

IRMA XIMENA BARBOSA SANCHEZ, filha de Luis Alberto Barbosa Leguizamo e Beatriz Sanchez de Barbosa, nascida em 14 de maio de 1974, na cidade de Ibagué-Tolima-Colômbia.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidad del Tolima. Colômbia, em agosto de 1992, concluindo sua graduação em fevereiro no ano 1999.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa em abril de 2002.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
4.1. Antígeno SBm7462 .....	26
4.2. Animais .....	26
4.3. Imunização e sacrifício dos animais .....	27
4.4. Isolamento de esplenócitos .....	27
4.5. Separação de linfócitos T e B .....	28
4.6. Obtenção de células apresentadoras de antígeno do baço .....	29
4.7. Obtenção da linhagem de linfócitos T SBm7462 reativos.....	29
4.8. Obtenção de macrófagos peritoneais .....	30
4.9. Avaliação de AICD .....	31
4.10. Preparações em citocentrífuga.....	32
4.11. Hibridização <i>in situ</i> para detecção de apoptose pela técnica de TUNEL .....	33
4.12. Coloração com laranja de acridina.....	34
4.13. Análise estatística .....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Estabelecimento da linhagem de linfócitos T SBm7462 reativos .....	35
5.2. Comprovação da natureza específica dos linfócitos T para o peptídeo SBm7462 .....	35
5.3. Efeito de drogas indutoras e inibidoras de AICD.....	36
5.3.1. Efeito de drogas indutoras de AICD.....	40
5.3.1.1. Mitramicina.....	40
5.3.1.2. Cicloheximida.....	46

5.3.2. Efeito de drogas inibitorias de AICD .....	53
5.3.2.1. Benzamida ribósido.....	53
5.3.2.2.Ciclosporina A.....	59
5.4. Considerações Finais.....	65
6. CONCLUSÕES.....	67
6.1. Perspectivas Futuras.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AICD – morte celular induzida por ativação  
APC-célula apresentadora de antígeno  
Bax –Bcl-2 associado à proteína X  
BD-benzamida ribósido  
CD4+ – linfócito T CD4  
CD8+ – linfócito T CD8  
CHX – cicloheximida  
CsA – ciclosporina A  
DAG – diacilglicerol  
DED – domínio efetor de morte  
DISC – complexo de sinalização induzindo morte  
DMEM– Dulbecco Modified Eagle’s Medium  
DVT- Departamento de Veterinaria  
ERKs – quinases ativadas por sinais extracelulares  
FADD – domínio de morte associado a Fas  
IAPs – proteínas inibitórias de apoptose  
IL-2 – interleucina dois  
IL-4 – interleucina quatro  
IL-15- interleucina quinze  
ITAMs – motivos de ativação baseados em imunoreceptores de tirosina  
IP3 – fosfatidilinositol trifosfato  
JNK/AP-1 N-terminal c-jun kinase Ativador proteína 1  
Kpb –quilo- pares de bases  
LBCH/ BIOAGRO-UFV – Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários / Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária – Universidade Federal de Viçosa  
mL- mililitros  
mM- milimolar  
MHC–complexo maior de histocompatibilidade  
MAPK–proteína cinase ativada por mitógeno  
mRNA-ácido ribonucleico mensageiro  
nM- nanomolar  
µm- micromolar  
NF-κβ – fator nuclear κβ  
NFAT–fator nuclear de células T

θ peritoneais- Macrófagos peritoneais  
OPD- Ortofenildiamine  
PBS- tampão fosfato salino  
PLCγ – fosfolipase C  
PTK – proteína tirosina quinase  
RIP– receptor interagindo proteína  
SFB – soro fetal bovino  
SH2/SH3-Homologia Src domínio tipo 2 ou 3  
SMAC-cluster supramolecular de ativação  
TCR – Receptor de células T  
Th2- resposta imune tipo Th2  
TNF – fator de necrose Tumoral  
TRADD – domínio de morte proteína adaptadora  
UFOP- Universidade Federal de Ouro preto  
UFV- Universidade Federal de Viçosa  
vFLICE – Proteínas inibitorias virais FLICE  
vFLIPs – proteínas inibitórias virais  
ZAP-70-cadeia ζ associado a proteína cinase de 70 Kda

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Número de Linfócitos T SBm7462-reativos mantidos durante 10 dias em cultura. Coleta aos 9 dias após a primeira imunização.	36
<b>Figura 2:</b> Linfócitos T SBm7462-reativos após estímulo com o peptídeo sintético na presença de mitramicina. Células TUNEL+ (setas). <b>A)</b> 9 dias após a primeira imunização. <b>B)</b> 30 dias após a primeira imunização. <b>C)</b> 45 dias após a primeira imunização. Técnica de TUNEL, 1000X.	38
<b>Figura 3:</b> Linfócitos T SBm7462-reativos após estímulo com o peptídeo sintético na presença de ciclosporina A apresentando morfologia típica de apoptose (setas). <b>A)</b> 9 dias após a primeira imunização. <b>B)</b> 30 dias após a primeira imunização. <b>C)</b> 45 dias após a primeira imunização. Técnica de acridina laranja, 400X.	39
<b>Figura 4:</b> Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 72 horas de estímulo com o peptídeo sintético.	41
<b>Figura 5:</b> Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 72 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de mitramicina.	42
<b>Figura 6:</b> Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 72 horas na presença de mitramicina.	43
<b>Figura 7:</b> Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 72 horas de estímulo com o peptídeo sintético.	44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 8:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 72 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de mitramicina. 45
- Figura 9:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 72 horas na presença de mitramicina. 45
- Figura 10:** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 10 horas de estímulo com o peptídeo sintético. 47
- Figura 11:** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 10 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de cicloheximida. 47
- Figura 12:** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 10 horas na presença de cicloheximida. 48
- Figura 13:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 10 horas de estímulo com o peptídeo sintético. 49
- Figura 14:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 10 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de cicloheximida. 50
- Figura 15:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 10 horas na presença de cicloheximida. 51
- Figura 16:** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 15 horas de estímulo com o peptídeo sintético. 55
- Figura 17:** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 15 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de benzamida ribósido. 56
- Figura 18:** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 15 horas na presença de benzamida ribósido. 56

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 19:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 15 horas de estímulo com o peptídeo sintético. 57
- Figura 20:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 15 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de benzamida ribósido. 58
- Figura 21:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 15 horas na presença de benzamida ribósido. 59
- Figura 22:** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação celular dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 24 horas de estímulo com o peptídeo sintético. 61
- Figura 23:** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 24 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de ciclosporina A. 62
- Figura 24:** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no taratamento III, após 24 horas na presença de ciclosporina A. 62
- Figura 25:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 24 horas de estímulo com o peptídeo sintético. 63
- Figura 26:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 24 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de ciclosporina A. 64
- Figura 27:** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 24 horas na presença de ciclosporina A. 65

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1:</b> Drogas usadas para inibir ou induzir apoptose de acordo com a dose e o tipo celular.	19
<b>Tabela 2:</b> Médias das porcentagens de viabilidade e médias das porcentagens de células apoptóticas em linfócitos T SBm7462-reativos das diferentes coletas e tratamentos após 72 horas de estímulo.	40
<b>Tabela 3:</b> Médias das porcentagens de viabilidade e médias das porcentagens de células apoptóticas em linfócitos T SBm7462-reativos das diferentes coletas e tratamentos após 10 horas de estímulo.	46
<b>Tabela 4:</b> Médias das porcentagens de viabilidade e médias das porcentagens de células apoptóticas em linfócitos T SBm7462-reativos das diferentes coletas e tratamentos após 15 horas de estímulo.	53
<b>Tabela 5:</b> Médias das porcentagens de viabilidade e médias das porcentagens de células apoptóticas em linfócitos T SBm7462-reativos das diferentes coletas e tratamentos após 24 horas de estímulo.	60

## RESUMO

BARBOSA SANCHEZ, Irma Ximena M.S., Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2004. **Estudo “in vitro” da apoptose induzida em linfócitos de camundongos (BALB/c) imunizados com o peptídeo sintético SBm7462.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilória. Conselheiros: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e João Carlos Pereira da Silva.

Linfócitos T SBm7462-reativos provenientes de camundongos BALB/c de 12 semanas de idade, que receberam por via subcutânea, duas imunizações alternadas a cada 21 dias, com peptídeo sintético SBm7462, foram avaliados quanto ao desenvolvimento da morte celular induzida por ativação (AICD) após apresentação e reconhecimento do peptídeo. Para isto foram realizadas culturas de linfócitos do baço, coletados 9 e 15 dias após a primeira e segunda imunização, e re-estimulados com o peptídeo na presença de quatro drogas diferentes: cicloheximida, benzamida ribósido, ciclosporina A e mitramicina. A identificação de células apoptóticas se realizou através do método de coloração com laranja de acridina e o método imunohistoquímico de TUNEL. A natureza específica dos linfócitos T foi confirmada pela contagem após re-estimulação “in vitro” com o peptídeo sintético, a cada 48 horas durante dez dias de cultura. Diferenças foram observadas ao se comparar os valores de viabilidade obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan com aqueles que foram constatados com os métodos de detecção da fragmentação do DNA, técnica de TUNEL e laranja de acridina. Embora a técnica de TUNEL seja um método imunohistoquímico, se deve considerar que a sua especificidade é maior quando ainda não ocorreu a completa degradação do DNA. Resultados

encontrados demonstraram que os linfócitos T SBm7462-reativos utilizados expressam constitutivamente a maquinaria necessária para indução de apoptose após ativação com o peptídeo sintético. Todos os achados sugerem que o processo de síntese *de novo* de proteínas não está envolvido na apoptose após sinalização do TCR, e que a apoptose foi mediada por uma via independente da calcineurina.

## ABSTRACT

BARBOSA SANCHEZ, Irma Ximena M.S., Universidade Federal de Viçosa, May, 2004. **Study “in vitro” of apoptosis induced in lymphocytes of mice (BALB/c) immunized with synthetic peptide SBm7462.** Advisor: Marlene Isabel Vargas Vilória. Committee members: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo and João Carlos Pereira da Silva.

Lymphocytes T SBm7462-specific coming of mice BALB/c of 12 weeks of age, that received subcutaneously, two alternate immunizations every 21 days, with synthetic peptide SBm7462, were assessed with relationship to the development of the cellular death induced by activation (AICD) after presentation and recognition of the peptide. For this, cultures of lymphocytes of the spleen were accomplished, and lymphocytes were collected 9 and 15 days after the first and second immunization, and re stimulated with the peptide in the presence of four different drugs: cycloheximide, benzamide riboside, cyclosporin A and mithramycin. The identification apoptotic cells was conducted by staining with acridina orange and labeling by TUNEL staining. The specific nature of the lymphocytes T was confirmed by the cell counting every 48 hours for ten days of culture after re-stimulation " in vitro " with the synthetic peptide. Differences were observed when comparing the viability values obtained by the trypan blue exclusion assay, in the treatments with the four compared drugs, with those that were verified with the methods of detection of the fragmentation of DNA, TUNEL staining and Acridine Orange. Although the TUNEL staining is a immunochemistry technique, it should consider that your specificity is larger when it didn't still happen the complete degradation of DNA. Results found showed that the lymphocytes T SBm7462-specific express constitutely the

necessary machinery for apoptosis induction after activation with the synthetic peptide. All the discoveries suggest that the *de novo* protein synthesis is not involved in the apoptosis after signaling of TCR, and that the apoptosis was mediated by an independent via of the calcineurina.

## 1. INTRODUÇÃO

A indução de uma resposta imune é um fenômeno complexo e multifatorial, sendo iniciada quando um imunógeno é inoculado em um animal e em seguida fagocitado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), as quais o processam e o apresentam como fragmentos de peptídeos que serão apresentados aos linfócitos de forma independente ou ligados ao MHC-II presente na sua membrana. Isto significa que o mecanismo de reconhecimento de estruturas imunogênicas não se dá através da forma nativa do imunógeno, mas somente após sofrer processamento enzimático pelas APCs.

O desenvolvimento e homeostasia do sistema imune requerem um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Esta última sendo conhecida como morte celular programada ou apoptose, a qual pode ser induzida por uma variedade de condições dependendo, principalmente, do estado de diferenciação da célula e/ou da natureza do sinal de ativação. Por exemplo, linfócitos imaturos sofrem mais apoptose do que proliferação após ativação,

constituindo assim as bases da teoria de seleção clonal. A seleção clonal é baseada na idéia de que o reconhecimento do antígeno ou peptídeos antigênicos apresentados às células imunocompetentes, induziria à proliferação daquelas células que teriam receptores para esse antígeno. Como conseqüência disso, os linfócitos sofreriam ativação em resposta ao estímulo e entrariam no ciclo celular. Entretanto, outra possível conseqüência desta ativação é a morte celular induzida por ativação (AICD), o que significa que o mesmo sinal que induz proliferação de linfócitos e outras funções do sistema imune, também provocaria a eliminação de clones autoreativos, permitindo assim a manutenção da discriminação "self-non self". Além disso, outra possível função da AICD seria o restabelecimento do número de células imunocompetentes após uma resposta imune muito intensa.

Nos últimos anos, no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários (LBCH)/BIOAGRO/DVT/UFV vem sendo desenvolvidas pesquisas sobre a vacina anticarrapato *Boophilus microplus*. Utilizando o hospedeiro natural e camundongos BALB/c como modelo experimental verificou-se *in vivo* a cinética da resposta imune em órgãos linfóides periféricos (linfonodos e baço). Resultados obtidos por SALES (2003) mostraram que em estes camundongos se apresenta uma hiperplasia folicular, com formação de centros germinais, hiperplasia de cordões de Billrhot de forma intensa três dias após a segunda e dois dias após a terceira imunização e que esta cinética de resposta concorda com os achados sorológicos das imunoglobulinas nestes animais, concluindo que o peptídeo sintético estimula respostas de tipo celular e humoral.

Estudos realizados com bovinos por LOMBANA (2003) mostraram que a resposta imune induzida pelo peptídeo é do tipo Th2 envolvendo células T CD4+, caracterizando-se pela produção de imunoglobulinas do tipo IgG1. Além disto verificou-se a memória imunológica *ex vivo* através do perfil de citocinas produzidas após reestímulo, confirmando-se o tipo de resposta imune mencionada, os níveis de IgG1 aumentaram significativamente desde

a segunda imunização, sendo mais elevado após a terceira imunização. Os resultados histológicos também mostraram que a partir do dia quinze após a primeira imunização se apresentaram hiperplasia de cordões medulares e aparecimento de células com características de linfócitos maduros e em maior número cinco dias após a segunda e terceira imunização.

Nestes mesmos estudos se encontraram células TUNEL+ nos linfonodos quinze dias após a primeira inoculação sendo resultado da involução das áreas extrafoliculares, devido a uma resposta T dependente, a qual regride e como consequência mostra uma alta taxa de morte *in situ*.

O uso de modelos animais apropriados para imunizações têm mostrado claramente que há um delicado equilíbrio nas subpopulações de células T ativadas, influenciando assim o resultado da vacinação. Também outros fatores podem contribuir nesse delicado equilíbrio na ativação diferencial e na diferenciação de subpopulações de células T CD4+.

A AICD de linfócitos T hígidos quando induzida por peptídeos sintéticos não tem sido estudada, razão pela qual ainda há muitas questões sobre a expressão e regulação dos mecanismos apoptóticos em estudos *in vitro* com estes tipos celulares. Embora os estudos de cinética da resposta imune nos órgãos linfóides periféricos tenham mostrado a presença de apoptose é de fundamental importância o estudo *in vitro* da AICD após reconhecimento do peptídeo. A caracterização da AICD em linfócitos T reativos ao peptídeo SBm7462, poderia permitir um melhor entendimento da maquinaria apoptótica que modula a resposta imunológica a este peptídeo *in vivo* e conseqüentemente relacioná-la com dose e freqüência de uso.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar as possíveis vias de indução da morte celular por ativação (AICD) após apresentação e reconhecimento do peptídeo sintético SBm7462.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a viabilidade e proliferação celular pelo uso do corante azul de tripan.

-Avaliar o efeito de drogas indutoras de AICD pelo uso de :

- a. Inibição da expressão de myc (mitramicina)
- b. Inibição da síntese de proteínas e aumento na expressão de FasL (cicloheximida)

-Avaliar o efeito de drogas inibidoras de AICD pelo uso de:

- a. Inibição da transcrição do RNA (benzamida ribósido)
- b. Inibição de calcineurina e FasL (ciclosporina A)

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

A resposta imune adaptativa envolve a geração de uma população de linfócitos T e B efetores através do processo de ativação, proliferação e diferenciação seguida por morte destas células. Se a resposta ocorre na ausência de estímulos inflamatórios (resposta tolerogênica), o grau de morte de células T ativadas é tão intenso que depois da resposta o animal terá um número muito reduzido de células antígeno específicas, semelhante ao que tinha antes da resposta ocorrida. Entretanto, se a resposta é acompanhada por estímulos inflamatórios (resposta imunogênica), tais como os induzidos por agentes infecciosos e outros imunógenos, o animal terá maior quantidade de células T antígeno específicas do que antes da resposta ocorrida. O animal é assim imunizado pela resposta e pela formação de células de memória, as quais sobrevivem para protegê-lo contra desafios posteriores com o mesmo antígeno (HILDEMAN et al., 2002).

A remoção de células supérfluas, defeituosas, lesadas ou reativas é crítica para o normal desenvolvimento e homeostasia tissular em organismos multicelulares. A morte destas células não desejadas ocorre pelo processo chamado morte celular programada (PCD) ou apoptose. Esta via genética de

eliminação celular pode responder a estímulos normais e patológicos (MARSDEN & STRASSER, 2003).

Características morfológicas típicas de apoptose incluem a condensação do citoplasma e do núcleo que levam a redução do volume celular. Clivagem inter-nucleosomal da cromatina e fragmentação do DNA, o qual tem lugar em duas etapas: primeiro se formam fragmentos de elevado peso molecular, concretamente de 300 quilopares de bases (kpb) que refletem as estruturas hexaméricas dos lóbulos da cromatina, conhecidas como rosetas e de 50 kpb, equivalentes a um só dos lóbulos (FILIPSKI et al., 1990). Segundo o tamanho dos fragmentos anteriores, eles são degradados em fragmentos menores de 180 pb que coincidem em longitude com as regiões nucleossômicas e que em gel de agarosa dão o característico padrão em escada (WYLLIE et al., 1980; ARENDS et al., 1990).

Outras características incluem: formação de bolhas na membrana plasmática devido á que no citoplasma os filamentos do citoesqueleto se alinham em forma paralela e o retículo endoplasmático se dilata fusionando-se à membrana. Todo o anterior leva a um forte comprometimento da integridade da membrana plasmática pela perda de assimetria dos fosfolipídios, das microvilosidades e das uniões célula-célula. Como conseqüência disto a célula se dissocia das vizinhas, sofre redução de tamanho e formam-se pequenas protuberâncias separadas pela união das membranas intracitoplasmáticas, para posteriormente serem separados em “corpos apoptóticos” que são rapidamente reconhecidos e fagocitados por células vizinhas ou macrófagos (JOHNSON et al., 1997).

Bioquimicamente, a exposição de moléculas na superfície celular como fosfatidilserina sinalizam fagocitose da célula moribunda. Uma característica fundamental deste processo é que a membrana celular permanece intacta, prevenindo o vazamento do conteúdo celular, assegurando assim uma resposta não inflamatória (OPFERMAN & KORSMEYER, 2003).

A via final da apoptose é o resultado da ativação de endonucleases que levam à fragmentação do DNA e à junção inter-nucleosomal. O processo de apoptose é controlado geneticamente, havendo genes que podem promovê-lo ou inibi-lo. Os genes que regulam a PCD foram primeiro descobertos no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, cujo desenvolvimento é acompanhado pela morte intensa de células mediada por esse processo (GUPTA, 1996), razão pela qual este nematódeo tem sido um bom organismo para o estudo dos componentes da maquinaria de morte celular programada. Os produtos de três genes de *C. elegans* são essenciais para controlar este processo: *ced-3* e *ced-4* promovem apoptose, enquanto que *ced-9* a inibe (HENGARTNER & HORVITZ, 1995). O gene *ced-3* apresenta homologia com IL-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) de humanos e é uma caspase cisteína protease, que cliva proteínas com resíduo ácido aspartato específico, estas proteases existem como zimogênios que são ativados através da própria clivagem. O gene *ced-9* tem mostrado que protege células de PCD em *C. elegans* e tem homologia com o gene *bcl-2* de mamíferos (HENGARTNER et al., 1995).

Células de metazoários contêm um aparelho enzimático similar que inicia a apoptose após ativação (STELLER, 1995). As caspases dos mamíferos são similares a *ced-3* (SALVENSEN & DIXIT, 1997). Apaf-1 é o homólogo de *ced-4* conhecido até agora em mamíferos (ZOU et al., 1997). Os produtos da família de genes *bcl-2* de mamíferos estão relacionados com *ced-9*, mais incluem subgrupos de proteínas que inibem o promovem apoptose (ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

O proto-oncogene *bcl-2* foi originalmente descoberto no locus de imunoglobulinas como resultado de uma translocação cromossomal t(14;18) em linfoma folicular em humanos (TSUJIMOTO et al., 1989). Este gene codifica para proteínas associadas à membrana que são localizadas na membrana mitocondrial e na membrana perinuclear (TSUJIMOTO & CROCE, 1985).

A família Bcl-2 compreende membros pró-apoptóticos e anti apoptóticos. Os membros altamente conservados da família com propriedades anti apoptóticas são Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e A1 que contêm quatro domínios BH, dos quais o BH-1-BH-3 estruturalmente formam um pacote capaz de se ligar ao domínio BH3 de outros membros da família. Diferente dos membros anti apoptóticos, os membros pró apoptóticos podem ser subdivididos pelo número de domínios BH que eles possuem. Os membros pró apoptóticos multi domínio mais conservados (Bax, Bak e Bok) possuem os domínios BH1, BH2 e BH3. Em contraste, os membros “BH3-only” (Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa e Puma) contêm somente o domínio de morte BH3 e não tem mostrado que haja conservação de seqüência fora deste domínio (OPFERMAN & KORSMEYER, 2003).

Então, a família de proteínas Bcl-2 representa um ponto crítico intracelular na via apoptótica. A expressão de *bcl-2* aumenta a resistência de linfócitos para muitos estímulos de morte, incluindo diminuição de citocina, dano ao DNA e estresse oxidativo (HOCKENBERY et al., 1990; HOCKENBERY et al., 1993)

A proteína supressora de tumores codificada pelo gene *p53* é uma das mais importantes reguladoras do ciclo celular. O gene *p53* é supressor de tumores e sua inativação tem-se implicado em numerosos tipos de câncer (LEVINE et al., 1991). Este gene, além de ser promotor de diferenciação, inibe o crescimento celular e é capaz de induzir apoptose (RUIZ, 1997). Outro gene envolvido na morte por apoptose é o proto-oncogene *c-myc* o qual tem mostrado que pode causar PCD. De forma similar ao gene *p53*, *c-myc* é também específico para o estímulo e para o tipo celular, sendo considerado indutor de apoptose (EVAN et al., 1992).

Tem-se descrito que em hibridomas de células T de camundongo, a expressão deste gene é necessária para a indução de apoptose após ativação via TCR/CD3 (SHI et al., 1992). Por outro lado, também foi observado que em células T leucêmicas humanas e em outros tipos de

células linfóides, a expressão de *c-myc* é fundamental para proteger essas células da indução de apoptose (THULASI et al., 1993; FISCHER et al., 1994). Isto foi demonstrado por RUIZ (1997) em estudos *in vitro* com células Jurkat, linha celular freqüentemente usada como sistema modelo *in vitro* de AICD para analisar a ativação de células T através do complexo TCR/CD3, já que é uma célula leucêmica do tipo CD4+. O tratamento com 50nM de Mitramicina mostrou que este medicamento inibe a proliferação celular, constatando-se também que a partir de 8 horas há uma redução nos níveis do mRNA de *c-myc*, o qual desaparece praticamente às 15 horas de tratamento. O mecanismo de ação da mitramicina está fundamentado na união a seqüências de DNA ricas em G-C, impedindo a união do fator de transcrição SP1 a este tipo de seqüências situadas na região promotora de alguns genes, dentre eles o *c-myc* (SNYDER et al., 1991). Apesar desses resultados, o papel de *c-myc* na indução de apoptose parece ser dual, sendo dependente do tipo celular e do agente indutor (RUIZ, 1997).

Recentemente a maquinaria molecular responsável pelo processo de apoptose tem sido elucidada, revelando uma família de proteases intracelulares, as caspases, as quais são responsáveis direta ou indiretamente pelas alterações morfológicas e bioquímicas que caracterizam este processo. Diversos reguladores das caspases também têm sido descobertos, incluindo ativadores e inibidores dessas proteases. Igualmente, algumas vias na tradução do sinal e de ativação da maquinaria de morte têm sido identificadas, demonstrando que há vias de ligação entre o estímulo externo e a resposta celular, seja de morte ou de sobrevivência (REED, 2000). A maquinaria efetora de morte celular, direcionada pela família de caspases, cliva muitas proteínas celulares vitais e ativa proteoliticamente enzimas que contribuem para a destruição celular, tais como a DNase DFF40/CAD. Muitas caspases estão presentes em células normais como pró-enzimas cataliticamente inativas (zimogênios), as quais são ativadas em

resposta a sinais programados e a estímulos de estresse que induzem apoptose (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998).

A apoptose mediada pela família das caspases é o principal tipo de morte celular programada em muitos processos fisiológicos e do desenvolvimento. Isto poderia ser perigoso para um organismo já que dependeria de uma só família de proteases para a remoção de células não desejadas e que são potencialmente perigosas. Entretanto, estudos recentes indicam que a morte celular programada pode ocorrer na completa ausência de caspases, como no caso de dano de organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático ou lisossomos que aumentam a liberação de cálcio, algumas espécies de radicais livres de oxigênio e liberação de proteínas efetoras (JÄÄTTELA & TSCHOPP, 2003).

Existem dois mecanismos para a ativação das caspases: a) Certos zimogênios (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9,10,11 e 12) têm longos pró-domínios N-terminal de baixa interação homotípica com proteínas adaptadoras específicas, tais como, FAAD/MORT-1 ou Apaf-1. Estes promotores de agregação de zimogênios que possuem baixa atividade enzimática promovem uma ação autocatalítica para gerar polipeptídios de 20 kDa e 10 kDa que se acoplam com sucesso dentro da atividade das caspases. b) caspasas com pró-domínios curtos (caspases 3, 6, e 7) são ativadas predominantemente através de proteólise por caspasas ativadas ou por granzimas: serina proteasas aspartato-específicas (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998).

A atividade das caspases na célula pode ser controlada em dois níveis. Primeiro, a atividade caspase é induzida por um complexo de vias de sinalização de apoptose que são altamente reguladas. Segundo certas caspases podem ser antagonizadas pelas proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). Estas IAPs ligam-se ao sítio ativo das caspasas, atuando como inibidores competitivos. O efeito anti apoptótico das IAPs é neutralizado pela

liberação de proteínas mitocôndriais, tais como Smac/DIABLO e htra2, as quais podem seqüestrar as IAPs (VERHAGEN et al., 2001).

Embora possam existir muitas vias para ativação de caspases, unicamente duas foram elucidadas com detalhes. Uma delas se centra na família de receptores fator de necrose tumoral (TNF), os quais usam a ativação das caspases como um mecanismo sinalizador, conectando esses ligantes sobre a superfície celular com indução de apoptose (WALLACH et al., 1998).

A outra via envolve a participação de mitocôndrias, as quais liberam caspases que ativam proteínas no citosol levando então a apoptose (SALVENSEN & DIXIT, 1999). Os receptores de morte e a ativação de caspases via mitocôndrias são freqüentemente referidas como vias extrínseca e intrínseca da apoptose, respectivamente (REED, 2000). As caspases são consideradas as executoras da apoptose, uma vez que sua ativação leva a clivagem de importantes substratos celulares. Em linfócitos T maduros a apoptose induzida por falta de fatores de crescimento e a morte celular induzida por ativação são mediadas por estes complexos enzimáticos (DE ALBORÁN et al., 2003).

Receptores da superfície celular que transmitem sinais apoptóticos iniciados por ligantes de morte específicos são chamados receptores de morte. Estes receptores podem ativar em segundos caspases de morte, pela união aos ligantes, causando eliminação apoptótica da célula em horas (ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

Os receptores de morte pertencem à superfamília de receptores de TNF, os quais são definidos por domínios extracelulares ricos em cisteína. Os receptores de morte contêm seqüências homólogas citoplasmáticas, denominadas domínios de morte, as quais permitem o acoplamento da maquinaria apoptótica (SMITH et al., 1995).

Os receptores de morte melhor caracterizados são: Fas (também chamado CD95 ou Apo-1) e TNFR1 (também chamado p55 ou CD120a)

(SMITH et al., 1995). Outros receptores de morte são: CAR1, receptor de morte 3 (DR3, também chamado Apo3, WSL-1, TRAMP, ou LARD) (CHINNAIYAN et al., 1996). DR4 e DR5 (também chamado Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2 ou KILLER). Os ligantes que ativam estes receptores são: CD95 ligante ou FasL (CD95L); TNF e linfotóxina- $\alpha$  se unem a TNFR1; Apo3 ligando (Apo3L, também chamado TWEAK) liga com DR3 e Apo2 ligando (Apo2L, também chamado TRAIL) liga-se a DR4 e DR5. O ligante para CAR1 não é conhecido. Acredita-se que todos os ligantes formam trímeros para se ligarem a seus receptores (ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

O sistema Fas/FasL tem um papel muito importante porque é o mediador de três tipos de morte celular fisiológica: deleção periférica de células T ativadas e fim de uma resposta imune; morte de células infectadas por vírus ou células cancerígenas por células T citotóxicas e por células assassinas naturais (NK); e por último, morte de células inflamatórias em sítios imunologicamente privilegiados como olho, testículo e ovário (ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

O receptor Fas (CD95/APO-1) tem três domínios extracelulares ricos em cisteína e um domínio de morte intracelular essencial para sinalização (PETER & KRAMMER, 1998). Este domínio intracitoplasmático tem 80 aminoácidos e é encontrado em todos os receptores de morte (ITOH & NAGATA., 1993). Estes receptores podem traduzir dentro da célula um sinal de morte que depende estritamente da integridade do domínio (TIBBETTS et al., 2003).

Uma característica da sinalização por Fas é o desenvolvimento de um complexo molecular de proteínas por ligações cruzadas de Fas com FasL "*leucine-zipper*." A estrutura formada é chamada complexo de sinalização induzindo morte (DISC) (KISCHKEL et al., 1995). A oligomerização de Fas cria uma conformação do receptor DD (Domínio de morte) o qual, por interações homologas, atrai o adaptador FADD (Domínio de morte associado a Fas, também chamado MORT-1). FADD possui um sítio amino-terminal

DED (Domínio executor de morte) pelo qual se une a caspasa 8A/b (também chamado FLICE ou MACH) e CAP3. A pró caspasa 8<sup>a</sup>/b cliva DISC em dois passos consecutivos levando à formação de caspase-8 ativada (MEDEMA et al., 1997).

A caspase-8 tem um papel central na apoptose induzida por Fas, já que ela é diretamente ativada pelo complexo molecular formado pelas ligações cruzadas de Fas/FasL ou DISC. Técnicas de marcação por afinidade têm revelado que a caspase-8 ativa as caspases 3 e 7 e que a caspase-3 pode ativar a caspase-6. As caspases 6 e 3 clivam proteínas envolvendo apoptose nuclear (HIRATA et al., 1998). A caspase-8 pode também ser ativada diretamente por granzima B liberada de linfócitos T citolíticos dando início à cascata caspase apoptótica (MEDEMA et al., 1997). Caspases ativadas clivam uma grande quantidade de substratos celulares que dão a característica morfológica de apoptose e clivagem oligosomal do DNA (MARTIN & GREEN, 1995).

A família de proteínas virais chamadas vFLIPs e uma proteína celular chamada cFLIP (também chamada Casper, I-FLICE, FLAME, ou CASH) contêm um domínio efetor que é similar ao segmento correspondente em FADD e caspasa-8 (THOME et al., 1997). O papel de FLIP é controverso, já que pode inibir o induzir apoptose (THOME et al., 1997; THOME & TSCHOPP, 2001).

O TNF é produzido por macrófagos ativados e células T em resposta à infecção. Pela união a seu receptor TNFR1 se ativam os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e APO-1, levando a expressão de genes imunomoduladores e pró-inflamatórios (TARTAGLIA & GOEDDEL, 1992). Nesse mesmo tipo de células o TNF também induz apoptose através de TNFR1 embora isto raramente aconteça, a não ser que a síntese de proteínas seja bloqueada, o que sugere a pré-existência de fatores celulares que podem suprimir os estímulos apoptóticos gerados por TNF (ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

O TNF trimeriza após união a TNFR1 induzindo associação dos domínios de morte dos receptores, em seguida um adaptador chamado TRADD (domínio de morte associado a TNFR) se liga a esses domínios de morte (HSU et al., 1995). TRADD funciona como uma plataforma adaptadora que recruta varias moléculas sinalizadoras utilizadas para a atividade do receptor, por exemplo TNFR associado a Fator 2 (TRAF2) e Proteína Interatuando com Receptor (RIP), os quais estimulam vias que levam à ativação de NF- $\kappa$ B e de JNK/AP-1 em quanto FADD medeia ativação de apoptose (CHINNAIYAN et al., 1996; HSU et al., 1996).

A ligação de receptores de morte (ex: Fas/APO-1/CD95, TNF-R1) causa formação de complexos de sinalização induzindo morte (STRASSER et al., 2000), nos quais as proteínas adaptadoras FADD e TRADD se ligam com seu domínio de morte (DD) ao DD da região citoplasmática dos receptores (BOLDIN et al., 1995; CHINNAIYAN et al., 1995). Através de interações homotípicas de domínios efetores de morte (DED), FADD causa recrutamento e ativação da caspase-8 (BOLDIN et al., 1996; MUZIO et al., 1996).

Proteínas que têm domínios DED desempenham um papel chave na sinalização por Fas e outros receptores de morte. Por exemplo, FADD é um adaptador crucial que conecta Fas com as caspases. Em particular dois membros da família das caspases, a caspase-8 e a caspase-10, as quais contem dois DEDs N-terminal que medeiam recrutamento de complexos Fas-FADD (MUZIO et al., 1996).

Proteínas que possuem DED também são antagonistas da morte celular. Proteínas que contem DED anti apoptótico têm sido identificadas em vários herpesvírus e no poxvírus vírus *Molluscum contagiosum* (MCV). Proteínas contendo DED viral têm sido coletivamente chamadas proteínas inibitórias FLICE viral (vFLICE) porque elas podem inibir a função de FADD e a caspase-8 (as quais são também conhecidas como cFLICE) e por isso

inibem TNF- $\alpha$  e a apoptose induzida por Fas apesar da ativação das caspasas (THOME et al., 1997).

Recentemente tem sido observado que proteínas contendo DED também estão envolvidas na proliferação de linfócitos, já que experimentos *in vivo* e *in vitro* com células T humanas mostraram que as caspases desempenham um papel na ativação destas células. Igualmente, tem-se observado que peptídeos sintéticos bloqueadores de caspases inibem a proliferação de células T e a produção de IL-2 em culturas primárias de células T humanas (ALAM et al., 1999).

Então, proteínas contendo DED representariam uma classe de proteínas que podem controlar o crescimento e a morte celular. Elas fazem parte de uma lista crescente de moléculas, incluindo c-Myc e Ras, que atuam em várias vias de sinalização. Isto significa que, para estas moléculas, os velhos esquemas de vias bioquímicas com função só de enzima não poderiam ser empregados, já que as vias de informação levando a proliferação ou morte também estão interconectadas em vias não participativas. É evidente que alterações nas proteínas tais como FADD e caspase-8 podem ter potencialmente efeitos paralelos sobre processos opostos, como a proliferação e apoptose (TIBBETS et al., 2003).

As vias fundamentais da apoptose têm sido conservadas através da evolução. Em linfócitos existem vários sinais inibitórios que evitam a morte celular, por exemplo, vários membros da família de interleucinas têm mostrado que possuem atividade anti-apoptóticas. A exposição de uma célula T a um estímulo antigênico origina sua ativação e como conseqüência se produz um aumento na síntese de receptores de citocinas que se dispõem na membrana plasmática, bem como de novas citocinas que regulam o crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose das células T e de outras células do sistema imune (CRABTREE, 1989).

A morte de linfócitos T e B que é induzida por receptores específicos pode ocorrer em órgãos linfóides centrais e periféricos. Em órgãos centrais

como medula óssea e timo as células B e T, respectivamente, são negativamente selecionadas. Para assegurar a própria tolerância e a diminuição da resposta imune bem como de outros mecanismos reguladores, a eliminação de ambas classes de linfócitos ocorre nos órgãos linfóides periféricos e envolve indução de apoptose (ARNOLD et al., 1993; Ruiz, 1997; SCAFFIDI et al., 1999).

Com o termo de morte celular induzida por ativação (AICD) se conhece a morte celular induzida com os mesmos sinais que em outras circunstâncias podem conduzir a proliferação e ativação da célula T, tais como: reconhecimento do antígeno, união de um anticorpo a seu antígeno receptor ou exposição à mitógenos (GREEN & SCOTT, 1994).

O processo de AICD pode ocorrer em células T imaturas ou em células transformadas assim como também em células T maduras e ativadas de sangue periférico (JONES et al., 1990; NEWELL et al., 1990; WESSELBORG et al., 1993; THOME et al., 1997; KRAMMER, 2000; HILDEMAN et al., 2002; CHEN et al., 2003).

Estudos realizados *in vitro* por Tamaoki e Nakano (1990) mostraram evidências de que todas as células animais expressam constitutivamente as proteínas necessárias para sofrer apoptoses. Estes autores comprovaram que na presença de cicloheximida (CHX), um antibiótico originado do *Streptomyces griseus* cuja atividade biológica é inibição da síntese de proteínas, se produzia parada do crescimento e morte celular por apoptose. Entretanto, estudos com células Jurkat estimuladas simultaneamente com o ionóforo de cálcio A23187 na presença de 10µg/ml de CHX mostraram que não se produzia bloqueio da morte celular induzida pelo ionóforo. Inclusive, se constatou que a própria CHX provoca uma perda importante da viabilidade celular e induz à degradação do DNA com o padrão em escada (RUIZ, 1997).

NIWA et al. (1999) observaram que o tratamento de neutrófilos circulantes com TNF- $\alpha$  na presença de 1µg/ml de CHX aumentava

significativamente a capacidade do TNF de induzir apoptose. Paralelamente, constataram que o tratamento só com CHX acelerava o processo de morte celular (Tabela 1). Os autores sugeriram que, no modelo utilizado, a síntese de proteínas não seria necessária para a indução de apoptose embora a apoptose espontânea dos neutrófilos é inibida por proteínas sintetizadas *de novo*.

Blom et al. (1999), utilizando cultura primária de hepatócitos e CHX em concentrações variando de 1µM -300 µM observaram que a apoptose se iniciava a partir de 2 horas da adição de CHX. Eles observaram apoptose máxima após 4 horas em concentrações de 100 µM e constataram que não havia diferença na intensidade da morte celular com o uso de concentrações maiores.

Já, Marotta et al. (2002) observaram que o tratamento de neurônios da camada granular do cerebelo com 10µM de CHX diminuía em 18,2% a sua sobrevivência, enquanto que concentrações de  $10^{-27}$  M aumentavam a viabilidade neuronal em 5%, sugerindo um efeito neuroprotetor da CHX quando utilizada em concentrações muito baixas.

Kongphanich et al. (2002) usando as linhas celulares HUT102 e MT-2, células T humanas transformadas pelo vírus HTLV-I, e o anticorpo monoclonal anti Fas CH11 para medir a sensibilidade à morte mediada por Fas na presença de 10 µg de CHX constataram aumento significativo de células apoptóticas. Também observaram durante os três dias de tratamento que foi mínimo o efeito da CHX sozinha.

Outros trabalhos têm mostrado que o uso de inibidores de RNA como o Ribósido (BR), em concentrações de 125µM, o qual atua após ser convertido na sua forma ativa BAD (dinucleotídeo adenina benzamida), um análogo de NAD (dinucleotídeo adenina nicotinamida), com frequência não inibe a morte por apoptose em células Jurkat estimuladas com A23187 (RUIZ, 1997). Porém, o tratamento de células leucêmicas L1210 com BR nas doses de dois, 5 ou 10µM induziu apoptose dose-dependente, sendo a

intensidade de fragmentação do DNA 2,6; 3,4 e 4,3 vezes maior nas doses utilizadas quando comparada com o controle (RAUKO et al. 2001).

**Tabela 1.** Drogas usadas para inibir ou induzir apoptose de acordo com a dose e o tipo celular.

<b>Droga</b>	<b>Dose</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
<b>Mitramicina</b>	50nM	Jurkat	Induz	Ruiz, 1997
<b>Cicloheximida</b>	20µg/mL	Astrocitos	Induz	
	10µM	Neurônios	Induz	Marotta et. al., 2002
	30-300µM	Hepatocitos	Induz	Bloom et. al., 1999
	10 <sup>-27</sup> M	Neurônios	Inibe	Marotta et. al., 2002
	0,05µg/mL	Células B	Inibe	Lemaire et. al., 1999
	2,5µg/mL	Células B	Induz	Lemaire et. al., 1999
	1µg/mL	Timocitos rato	Inibe	
<b>Benzamida ribósido</b>	2, 5, 10µM	L1210	Induz	Rauko et. al., 2000
	50µM	NSCLC H520	Induz	Khanna et. al., 2004
	10-20µM	N.1 (carcinoma ovariano)	Induz	Grusch et. al., 1999
	125µM	Jurkat	Inibe	Ruiz, 1997
<b>Ciclosporina A</b>	200ng/mL	Células T	Induz	Zheng et. al., 1998
	150ng/mL	Jurkat	Inibe	Ruiz, 1997

Com o passar do tempo, o conhecimento dos mecanismos intracelulares da morte celular por apoptose e seu controle, levaram a que as pesquisas se focalizaram sobre as evidências descritas por Jacobson et al. (1997), as quais mostravam que os componentes protéicos responsáveis por

este processo são constitutivamente expressos em todas as células animais; que a execução do programa de morte celular envolve cascatas proteolíticas cuja ativação é controlada por uma família de proteínas reguladoras intracelulares e que a ativação do programa durante o desenvolvimento pode ser controlado geralmente por transcrição.

A ativação de células T é um passo crítico no início da resposta imune adaptativa. O antígeno é apresentado por moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC-II) localizado na membrana das células apresentadoras de antígeno (APCs), o qual se une ao complexo receptor para o antígeno da célula T (TCR/CD3).

Dois sinais, ambos derivados das APCs, são requeridos para proliferação induzida por ativação de células T; primeiro o acoplamento do TCR a um complexo antígeno/MHC-II sobre a APC e segundo o acoplamento de moléculas co-estimuladoras como o CD28 na célula T e a família de proteínas B7 expressadas pela APC. O TCR e CD28 induzem vias sinérgicas de proliferação de células T, estimulando proliferação e regulando a expressão de citocinas reguladoras do crescimento, tais como IL-2. Antígenos encontrados por células T induzem ambas vias, proliferativa e de sobrevivência, as quais direcionam a expansão dos linfócitos e levam ao desenvolvimento de imunidade. Depois do "clearance" do antígeno, o acoplamento da célula T-APC diminui, podendo resultar rapidamente na indução de morte celular. Esta forma de morte da célula T, chamada de morte celular passiva, é crucial para finalização de uma resposta imune e manutenção da homeostasia de células T (ZHENG et al., 2003).

Associado não covalentemente ao TCR se encontra o complexo protéico CD3, que está formado por cinco polipeptídeos  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ . Estes dímeros são também proteínas de transmembrana, mas seu domínio intracitoplasmático é maior que o de TCR  $\alpha\beta$  e são os encarregados de traduzir os sinais após a ativação do complexo ao interior da célula (MALISSEN & MALISSEN, 1996; RUIZ, 1997).

A estimulação *in vitro* de células T com anticorpos anti CD3 induz uma resposta sinalizadora com estimulação de atividade proteína tirosina quinase (PTK) em poucos segundos (SAMELSON et al., 1986). Este primeiro evento leva a uma série de mudanças bioquímicas que envolvem um período de muitas horas, estes incluem a expressão de receptores de citocinas (cerca de duas horas), a secreção de citocinas (cerca de 6 horas), a iniciação da replicação do DNA (cerca de 24 horas) e a aquisição de um caráter diferencial alterado (durante um período de vários dias) (CRABTREE, 1989).

Acúmulos de fosfotirosina sobre proteínas do complexo TCR também provêm sítios de ligação para um número de polipeptídeos intracelulares solúveis que possuem domínios de interação e sítios de fosforilação de tirosina, mas não tem uma atividade enzimática. Estas proteínas são chamadas adaptadoras. Ligações de proteínas adaptadoras podem servir como um mecanismo primário que regula o recrutamento de vias de sinalização para os ligantes acoplados aos TCRs. O sistema efetor predominante envolvido na transmissão intracelular de TCR é similar a outros sistemas, envolve cinases dependentes de cálcio, fosfatases e cascatas cinase treonina/serina do tipo MAPK (ALBEROLLA-ILA et al., 1997).

Em linhas leucêmicas de células T humanas e hibridomas de células T murinas, as uniões de ligantes com TCR ou CD3 produzem um aumento na concentração de cálcio livre intracitoplasmático, RNA e síntese de proteínas, ativação de uma endonucleasa dependente de cálcio e morte celular programada (WANG et al., 1994).

Tanto a elevação de cálcio intracelular como a ativação de Ras conduz a ativação de numerosos genes, dentre eles o gene de IL-2. Este gene está controlado por vários fatores de transcrição como AP-1, NF $\kappa$ B, Oct-1 e NFAT (fator nuclear de células T ativadas) (RUIZ, 1997).

Sinalização através do complexo TCR/CD3 induz apoptose em timócitos CD4+/CD8+, em cultura de órgãos e em animais vivos. Estudos realizados por Wang et al. (1994) mostraram que em camundongos

transgênicos para CD3 $\epsilon$ , os quais são completamente imunodeficientes, os timócitos morrem antes da diferenciação em células T maduras, indicando que o incremento na sinalização através do CD3 $\epsilon$  pode induzir morte celular programada.

A estimulação de células T maduras via seu complexo TCR/CD3 com o apropriado complexo antígeno/MHC e sinais estimulatórias adequadas, usualmente resultam em diferenciação e proliferação destas células, mas também pode resultar em morte por apoptose. As ligações cruzadas de TCR ou CD3 têm resultado em morte celular programada de células T periféricas (KAEBELITZ et al., 1993).

A interação entre Fas e Fas-L esta envolvida na apoptose induzida pelo TCR/CD3 na célula T como foi demonstrado nos estudos realizados por DEHIN et al. (1995) e YANG et al. (1995).

A AICD de células T periféricas depende do estado de ativação da célula, ou seja, células T ativadas recentemente são resistentes à indução de apoptose e esta resistência inicial precede a um posterior fenótipo sensível. Este processo representa a fase de diminuição da resposta imune e a eliminação de clones reativos. Somente poucas células T sobrevivem como células de memória. A AICD ocorre por mecanismos suicidas ou fratricidas, envolvendo prematuramente o sistema Fas após estimulação do TCR e o TNF-R2 nos estágios posteriores. A importância do sistema Fas/FasL para AICD foi recentemente demonstrada pelo descobrimento de um receptor solúvel chamado DcR3, que se liga ao FasL inibindo a apoptose quando induzida por este fator (SCAFFIDI et al., 1999).

Muitos experimentos *in vivo* têm descrito o papel de Fas na morte de células T ativadas usando exposições repetidas ao antígeno, persistência de altas doses de antígenos ou antígeno expressado sistemicamente (STRASSER et al., 1995; VAN PARIJS et al., 1998; ZHOU et al., 2002). Nestas condições, as estimulações repetidas levam a um incremento dos níveis de IL-2 e diminuição nos níveis de FLIP nas células (ALGECIRAS-

SCHIMNICH et al., 1999). Entretanto, estas células T são unicamente susceptíveis para morte mediada por Fas se elas encontram antígenos durante um determinado período do ciclo celular (HILDEMAN et al., 2002).

A calcineurina (serina-fosfatase dependente de cálcio-calmodulina) tem um papel muito importante na ativação de células T já que além de ativar o NF- $\kappa$ B necessário para a transcrição do gene da IL-2, também está envolvido na fragmentação do DNA e na morte celular induzida por ativação. Isto foi demonstrado com o uso de Ciclosporina (CsA), um metabólito oligopéptido cíclico não polar derivado do fungo *Tolypocladium inflatum* e que é um inibidor específico da calcineurina (WIEDERRECHT et al., 1993), que bloqueia não só a ativação e transcrição do gene da IL-2 (RUIZ, 1997), como também a apoptose induzida a través do complexo receptor para o antígeno (FRUMAN et al., 1992). Além disto, se tem demonstrado que a CsA também bloqueia a transcrição do gene que codifica FasL. A CsA forma um complexo com o receptor intracelular ciclofilina o qual se liga à calcineurina, inibindo sua atividade enzimática e bloqueando a indução da expressão do ligante de Fas após a ativação da célula T (ANEL et al., 1994).

O sistema TNF/Fas regula a defesa imune já que seus efeitos são caracterizados por uma marcada dualidade, por um lado indução de dano e por outro, a indução de reparação e expansão clonal. A morte celular é induzida juntamente com o crescimento celular e resistência à morte, hematopoiese é suprimida simultaneamente com indução de fatores de crescimento hematopoiéticos, a inflamação é promovida e a sua vez suprimida. Estes contrastes resultam em um processo complexo que ainda não está elucidado (WALLACH et al., 1999).

Existem vários sinais inibitórios da apoptose que evitam a AICD, por exemplo, alguns membros da família das interleucinas têm mostrado que possuem atividade anti apoptótica. A IL-2, por exemplo, atua na ativação e proliferação de células T e também protege estas células pelo aumento da expressão de Bcl-2, mas também podem mediar a morte celular (AYROLD et

al.,1998). A exposição de uma célula T a um estímulo antigênico origina sua ativação e como consequência se produz um aumento na síntese de receptores de citocinas que se dispõem na membrana plasmática, bem como de novas citocinas que regulam o crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose das células T e de outras células do sistema imune (CRABTREE, 1989).

A AICD em células não transformadas requer a combinação de dois estímulos mitogênicos em altas doses, um antígeno ou mitôgeno ativando a via do TCR ou uma molécula de ativação alternativa e uma citocina como a IL-2 e IL-4 (JANSSEN et al., 1991; UCKER et al., 1992). Células T não transformadas especialmente linfócitos T CD8+ que não são capazes de gerar um crescimento autócrino são úteis para o estudo da indução de AICD (UCKER et al., 1992). Células T CD8+ cultivadas com um estímulo de ativação, em ausência de citocinas estimulatórias, exibem uma leve proliferação. Já, aquelas células que expressam receptores para IL-2 e que foram ativadas recentemente via TCR respondem a esta citocina com proliferação aumentada. Isto significaria que a combinação de um estímulo de ativação na presença de citocina produziria a morte celular mas não em um só deles (LENARDO, 1991). Com células T CD4+ que produzem endogenamente suficiente quantidade de IL-2, a adição de citocina exógena não é necessária para a indução de AICD com altas doses antigênicas (UCKER et al.,1994).

Isolados frescos de linfócitos T esplênicos são relativamente resistentes à indução de AICD desenvolvida via TCR ou à associação do complexo CD3, embora a pré-ativação via complexo TCR/CD3 as torna susceptíveis (OWEN-SCAUB et al., 1992).

Os linfócitos usam vários mecanismos para iniciar a morte celular na fase de declínio da resposta imune. Além do sistema Fas/FasL, outro mecanismo que ajuda na resolução de uma resposta imune seria que os sinais traduzidos pelo receptor do antígeno e as moléculas coestimulatórias

(TCR/CD3) começam a diminuir, levando conseqüentemente a uma diminuição na interação com as células apresentadoras de antígeno. Esta diminuição dos sinais leva a redução na expressão de moléculas anti apoptóticas e um aumento nas pró-apoptóticas. Então, tanto os receptores de morte quanto o desequilíbrio entre proteínas pró e anti apoptóticas seriam os responsáveis pela diminuição dos linfócitos antígeno-específicos originados durante uma resposta imune adaptativa (OPFERMAN & KORSMEYER, 2003).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Antígeno SBm7462**

Como antígeno foi utilizado o peptídeo sintético SBm7462, desenhado no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/BIOAGRO/DVT da Universidade Federal de Viçosa e sintetizado com o auxílio da “Fundação Instituto de Imunologia da Colômbia (FIDIC)” em Bogotá, Colômbia, a partir da estrutura da proteína Bm86, empregando a técnica “Good Manufacture Procedure” (GMP) descrita por MERREFIELD (1963) e modificada por HOUGHTEN (1985), de acordo com a técnica t-Boc.

### **4.2. Animais**

Foram utilizados 70 camundongos machos da raça BALB/c, com 12 semanas de idade, pesando em torno de 25 gramas, os quais foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram divididos em três grupos: grupo I com 20 animais, grupo II com

20 animais e grupo III com 30 animais, cada grupo sendo subdividido em cinco animais/gaiola.

Durante todo o experimento, os animais permaneceram no biotério da Universidade Federal de Viçosa, localizado no Departamento de Veterinária, sendo a temperatura e umidade regulada numa faixa que proporcionasse maior conforto, com um regime diário de luz artificial de 12 horas. Os animais receberam, durante o decorrer do estudo, água *ad libitum* e ração comercial peletizada com composição nutricional adequada para esta espécie animal.

#### **4.3. Imunização e sacrifício dos animais**

Os animais foram inoculados duas vezes no dorso, via subcutânea, com intervalo de três semanas, de acordo com os seguintes tratamentos:

- Grupo I (controle): animais inoculados com 100 µL de água milliQ;
- Grupo II: animais imunizados com 100µg do peptídeo SBm7462 diluído em água milliQ.
- Grupo III: animais não imunizados que foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais.

Aos 9, 15 dias após a primeira imunização e 9 e quinze dias após da segunda imunização foram sacrificados cinco animais dos grupos I e II.

#### **4.4. Isolamento de Esplenócitos**

Após o sacrifício dos cinco animais do grupo II, os camundongos foram mergulhados em álcool 70% durante cinco minutos. Sob condições de esterilidade em capela de fluxo laminar retirou-se a pele do abdome de cada animal e após incisão dos músculos abdominais foi exposta a cavidade peritoneal para retirada do baço, o qual foi imediatamente colocado em meio

de cultura RPMI incompleto mantido no gelo. Todos os baços obtidos de cada grupo foram macerados em malha metálica com êmbolo de seringa plástico. A suspensão obtida foi lavada três vezes com meio de cultura RPMI-1640 incompleto e tampão ACK pH 7,2 (90 ml de solução A:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15M e 10ml de solução B: Tris 0,17M) na proporção de 3:1 a 1500rpm durante cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio de cultura incompleto. Após contagem em câmara de Neubauer, as células foram criopreservadas [40% albumina sérica bovina a 20%, 60% de solução crioprotetora (FARMOTERAPICA<sup>®</sup>), 10% da solução final de dimetilsulfóxido (DMSO) e 2UI de heparina sódica/ml] e mantidas em freezer a -70°C até utilização.

#### **4.5. Separação de Linfócitos T e B**

Suspensões de células esplênicas podem ser fracionadas levando em consideração a sua capacidade de aderência diferencial às fibras de nylon. A 37°C e na presença de soro fetal bovino, linfócitos B se unem avidamente a colunas de lã de náilon levando a uma efluente população de linfócitos T virtualmente puros.

Colocaram-se 600mg de lã de nylon estéril, aproximadamente 6ml, dentro de uma seringa de 20 ml e em seguida foi lavada com médio DMEM contendo 5 % de SFB e logo a seguir foi incubada 37°C por uma hora em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esta incubação a coluna foi retirada da estufa e lavada novamente com meio DMEM para corrigir qualquer câmbio de pH ocorrido durante a incubação. Adicionaram-se 2 ml de suspensão celular,  $5 \times 10^7$  linfócitos/ml, provenientes de camundongos inoculados com o peptídeo sintético SBm7462, previamente descongelados e lavados com meio DMEM incompleto a 1500rpm a 4°C por cinco minutos. A coluna foi tampada e incubada por 45 minutos a 37°C em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ , depois foi lavada com 25 ml de meio DMEM a 37°C, e as células livres foram

coletadas e concentradas por centrifugação a 1300rpm a 4°C por 10 minutos. Posteriormente foi determinado o número de linfócitos viáveis usando a técnica de exclusão por azul de tripan.

#### **4.6. Obtenção de células apresentadoras de antígeno do baço**

Após o sacrifício dos animais do grupo I, eles foram mergulhados em álcool 70% durante cinco minutos. A técnica de obtenção de esplenócitos foi a mesma como detalhada no item 4.4.

O sedimento obtido foi ressuscitado em meio RPMI incompleto e em seguida adicionaram-se 50µg/ml de mitomicina C na suspensão celular cuja concentração era de  $5 \times 10^7$  células/mL. Deixou-se incubar na estufa durante 20 minutos a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub>, evitando a exposição direta à luz. Após este período se fez lavagem com meio RPMI-1640 com 5% de SFB durante 10 minutos a 1200 rpm a 4°C, se descartou o sobrenadante e se repetiu o procedimento duas vezes.

Após lavagens as células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços, a uma concentração de  $6 \times 10^6$  APCs/ poço durante 24 horas. Decorrido este tempo se adicionaram em cada poço  $2 \times 10^6$  linfócitos T isolados de animais imunizados com o peptídeo sintético e 1 µg de peptídeo sintético SBm7462/ $1 \times 10^6$  células, em um volume final de 2.5 ml de RPMI-1640 completo com 10% de SFB. Incubou-se por 10 dias em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.7. Obtenção da linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos.**

APCs do baço de animais não inoculados, obtidos como descrito no item 4.6, foram semeados em placas de 24 poços a uma concentração de  $6 \times 10^6$  células/ poço e mantidos em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 horas. Após este tempo, os linfócitos T de animais imunizados e obtidos por

separação em coluna de náilon foram colocados a uma concentração de  $2 \times 10^6$  linfócitos T/ poço e se adicionou 1  $\mu\text{g}$  de peptídeo sintético SBm7462/ $1 \times 10^6$  células em um volume final de 2 mL de RPMI-1640 completo. Incubou-se por 10 dias em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Os linfócitos SBm7462-reativos foram transferidos a uma nova placa.

Para cada coleta foram obtidos linfócitos T SBm7462-reativos, sendo processados em placas diferentes conforme protocolo anterior.

#### **4.8. Obtenção de macrófagos peritoneais**

Foram anestesiados e sacrificados 30 camundongos, os quais foram inoculados três dias antes com 3ml/animal de meio Tioglicolato de Brewer via intra-peritoneal. Após o sacrifício os animais foram mergulhados em álcool 70% durante cinco minutos.

Em condições de esterilidade retirou-se a pele do abdômen e se inocularam 5ml de meio RPMI incompleto gelado na cavidade peritoneal. Massageou-se o peritônio com a ponta dos dedos durante quatro minutos e em seguida coletou-se o meio com as células liberadas e passou-se imediatamente para tubos de centrifuga plásticos de poliestireno mantidos sob gelo. A seguir foi feita lavagem das células com meio de cultura RPMI-1640 incompleto a 1500 rpm durante cinco minutos a  $4^\circ\text{C}$ .

Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em RPMI-1640 completo com 10% de SFB. Realizou-se a contagem das células com azul de tripan e estas foram semeadas a uma proporção de  $6 \times 10^6$ /poço em placas de 24 poços. Deixaram-se durante 24 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ , e após deste tempo o sobrenadante foi retirado e colocado novo meio de cultivo.

#### 4.9. Avaliação de AICD

Incubaram-se  $2 \times 10^6$  linfócitos T SBm7462-reativos/well em placas de 24 wells com  $6 \times 10^6$  macrófagos peritoneais pré-tratados com  $1 \mu\text{g}$  de peptídeo SBm7462/ $1 \times 10^6$  células, durante quatro horas, tanto para o sistema modelo quanto para o controle do peptídeo. Para o controle do medicamento os macrófagos não foram pré-tratados com peptídeo. Todas as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1x de Antibiótico e Antimicótico (SIGMA®) e 2mM de Glutamina e mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse período se adicionaram os diferentes medicamentos, de acordo ao esquema da cultura mostrado no quadro 1. As dosagens usadas destes medicamentos no estudo foram determinadas pelas pesquisas realizadas por RUIZ (1997), na linha leucêmica humana de linfócitos T CD4 Jurkat, a qual é utilizada como modelo para o estudo de AICD. Para cada medicamento e para cada sacrifício determinou-se a porcentagem de viabilidade mediante exclusão do azul tripan, ao final de cada tratamento.

Avaliou-se o efeito de drogas indutoras de AICD pelo uso de :

- a. Inibição da expressão de myc mediante tratamento com 50nM de mitramicina SIGMA® durante 72 horas.
- c. Inibição da síntese de proteínas e aumento na expressão de Fas com  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  de cicloheximida (CHX) SIGMA®, durante 10 horas.

Avaliou-se o efeito de drogas inibidoras de AICD pelo uso de:

- a. Inibição da transcrição do RNA com  $125 \mu\text{M}$  de benzamida ribósido SIGMA® durante 15 horas.
- b. Inibição de calcineurina e FasL com  $200 \text{ng}/\text{mL}$  de ciclosporina A SIGMA® durante 24 horas.

**Quadro 1.** Tratamentos e drogas utilizadas \*

<b>TRATAMENTO</b>	<b>Mitramicina (50nM)</b>	<b>Cicloheximida (10µg/mL)</b>	<b>Ribósido (125µM)</b>	<b>Ciclosporina (200ng/ml)</b>
<b>L T SBm7462-reativos q peritoneais Peptídeo (tratamento I)</b>	<b>não</b>	<b>não</b>	<b>não</b>	<b>não</b>
<b>L T SBm7462-reativos q peritoneais peptideo droga (tratamento II)</b>	<b>sim</b>	<b>sim</b>	<b>sim</b>	<b>sim</b>
<b>L T SBm7462-reativos q peritoneais droga (tratamento III)</b>	<b>sim</b>	<b>sim</b>	<b>sim</b>	<b>sim</b>

\*SIGMA®

#### **4.10. Preparações em citocentrífuga**

Após o período de incubação específico para cada um dos tratamentos, os linfócitos foram coletados e concentrados por centrifugação a 1500rpm por 5 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e ajustado a uma concentração de  $300 \times 10^5$  células /200µl.

Os esfregaços celulares foram realizados por centrifugação em micro centrífuga citospin a 1300rpm por 10 minutos. Em seguida as lâminas foram secadas a temperatura ambiente e fixadas em paraformaldeído a 4%.

#### **4.11. Hibridização *in situ* para detecção de apoptose pela técnica de TUNEL**

As lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4 e incubadas com solução de bloqueio da peroxidase endógena (3% peróxido de hidrogênio em metanol) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir as células foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,4 e em seguida foram permeabilizadas (0,1 % Triton<sup>®</sup>X-100 em citrato de sódio 0,1%) durante dois minutos, sobre gelo. Após, se lavaram duas vezes com PBS pH 7.4 e incubou-se durante 60 minutos em câmara úmida a 37°C com 50µl da mistura TUNEL conforme indicação do fabricante ROCHE<sup>®</sup>. Posteriormente, foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4 e logo a seguir adicionou-se 50µl de anticorpo anti-fluoresceína conjugado com peroxidase sobre cada amostra, e os esfregaços foram imediatamente cobertos com lamínula. Incubou-se em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e repetiram-se as lavagens com PBS pH 7,4.

A revelação foi feita com solução de diaminobenzidina (20mg de DAB em 20ml de Tris 0,1M pH 7,4 e 20µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes), durante 10 minutos a temperatura ambiente e lavadas três vezes com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada. Os esfregaços foram contracolorados com hematoxilina de Harris 1:10 durante 15 segundos sendo em seguida desidratados em álcool, diafanizados em xilol e as lamínulas montadas com Entellan<sup>®</sup> (Merck) entre lâmina e lamínula.

As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico binocular ECLIPSE E600<sup>1</sup>, com objetiva de 40X, contou-se o número de linfócitos positivos à reação de TUNEL em 15 campos diferentes e o resultado foi dado em porcentagem para cada tratamento.

---

<sup>1</sup> Microscópio Óptico – Eclipse E600 – Nikon – Japan

#### **4.12. Coloração com Laranja de Acridina**

Após fixar as células com paraformaldeído ao 4%, se procedeu à coloração com Acridina Laranja SIGMA®. Colocaram-se 30 µl de solução de laranja de acridina (10mg/mL) em cada lâmina e imediatamente foi feita a leitura em microscópio de fluorescência de luz verde. Contaram-se as células apoptóticas e não apoptóticas em quinze campos diferentes para cada lamina, sendo expresso como porcentagem.

#### **4.13. Análise estatística**

Os dados obtidos das contagens das células com a técnica de TUNEL e Laranja de Acridina e as porcentagens de viabilidade das populações celulares obtidas pela técnica de exclusão de azul de tripan foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de uma comparação entre médias com o movimento do período por meio do teste de Tukey, nível de 5% de probabilidade.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

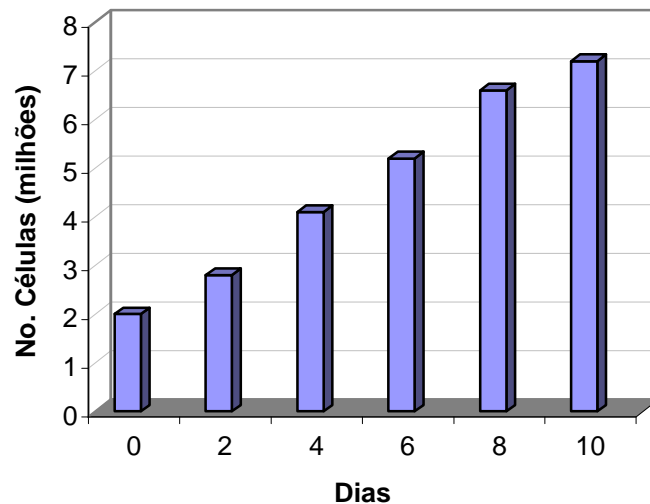
### **5.1. Estabelecimento da Linhagem de Linfócitos T SBm7462-reativos**

A metodologia utilizada na obtenção de linfócitos T altamente reativos ao antígeno, a partir de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo sintético SBm7462, proporcionou culturas celulares formadas por populações homogêneas de células arredondadas, com características fenotípicas de linfócitos observadas em cultura e com a coloração de Giemsa, tais como: núcleo volumoso, escasso citoplasma as quais proliferaram ativamente em suspensão.

### **5.2. Comprovação da natureza específica dos linfócitos T para o peptídeo sintético SBm7462.**

Os linfócitos isolados dos baços obtidos de cada uma das coletas foram cultivados durante dez dias em placas diferentes. Todas as culturas mostraram padrão semelhante quanto a proliferação e reprodutibilidade.

A natureza específica dos linfócitos T foi confirmada pelo aumento no número destas células após reestimulação “*in vitro*” com o peptídeo sintético SBm7462, o que foi comprovado pelas contagens realizadas a cada 48 horas durante dez dias de cultura para cada uma das coletas (Figura 1).



**Figura 1.** Número de Linfócitos T SBm7462-reativos mantidos durante 10 dias em cultura. Coleta aos 9 dias após a primeira imunização.

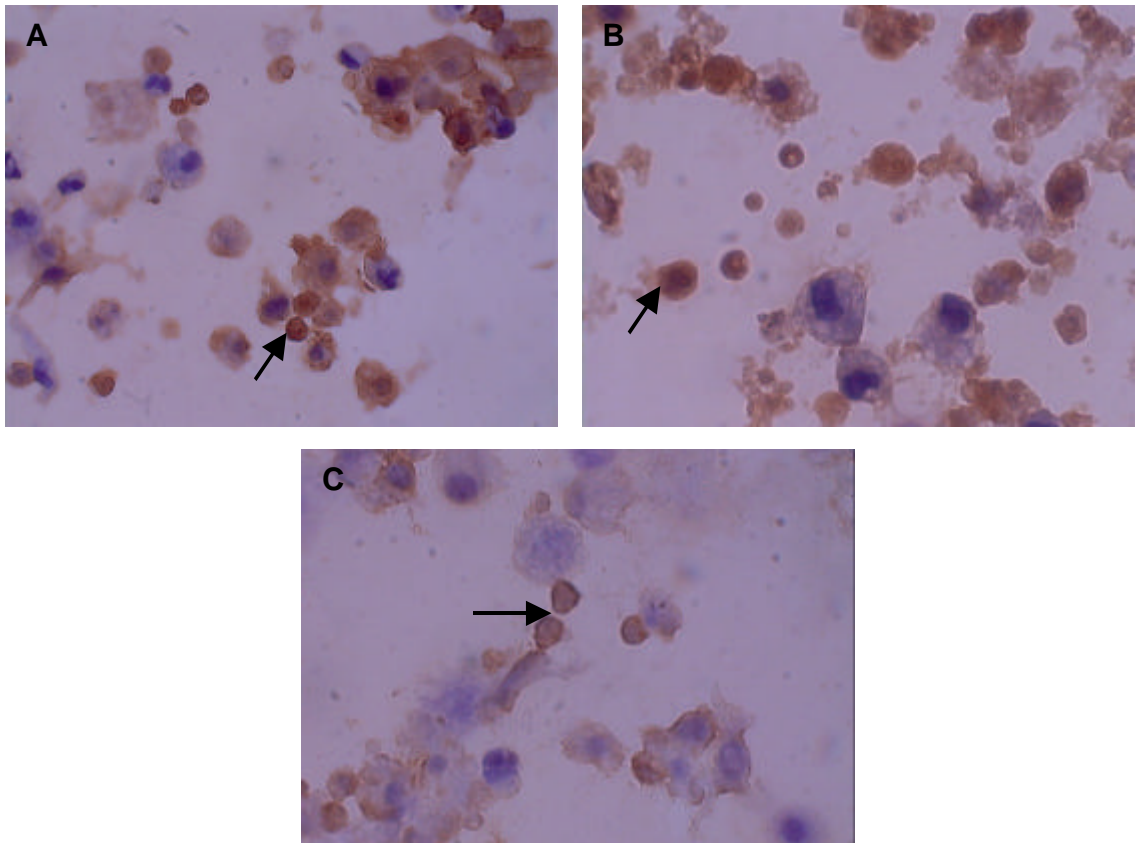
### 5.3. Efeito de drogas indutoras e inibidoras de AICD

Seguindo o critério de exclusão do corante azul de tripan e considerando que a apoptose não é um processo sincronizado, é possível que em populações celulares incubadas com o estímulo apoptótico durante o tempo suficiente para que a viabilidade celular oscile entre 50-70% e nesse momento, em que 40% das células estejam mortas, provavelmente se tenha um maior número de células em apoptose, com as características bioquímicas e morfológicas próprias deste processo e que ainda são viáveis porque a membrana celular permanece intacta. Isto explicaria a diferença

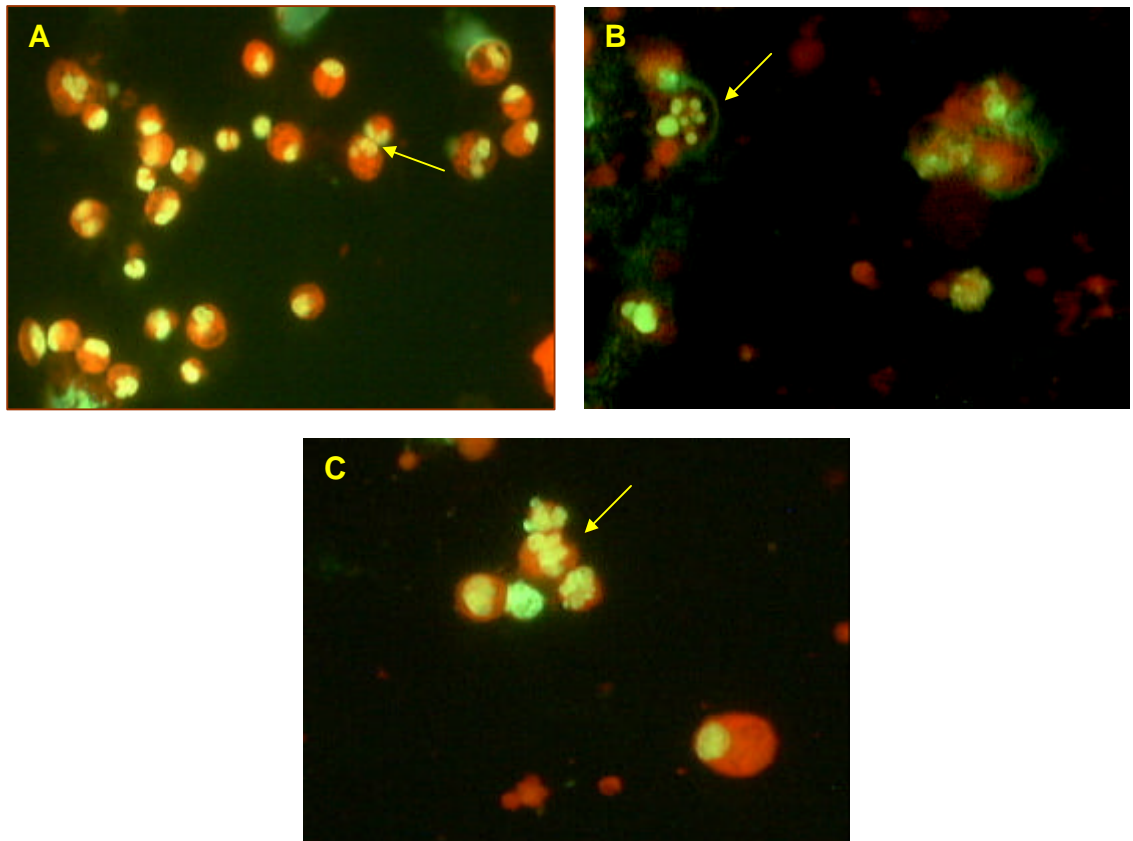
que foi observada ao se compararem os valores de viabilidade obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan nos tratamentos com as quatro drogas, com aqueles que foram constatados com os métodos de detecção da fragmentação do DNA técnica de TUNEL e laranja de acridina (Tabelas 1, 2, 3 e 4). E embora a técnica de TUNEL seja um método imunohistoquímico, se deve considerar que a sua especificidade é maior quando ainda não ocorreu a completa degradação do DNA.

A comparação estatística das médias das porcentagens obtidas entre os tratamentos I, II e III, para cada uma das datas de coleta e para cada uma das drogas foi realizada mediante o teste de "Tukey". A comparação entre as drogas não foi realizada devido a que cada uma delas atua por vias diferentes.

A técnica de TUNEL detectou células apoptóticas (TUNEL+) em todos os tratamentos (Figura 2). A detecção de apoptose com o corante fluorescente laranja de acridina se realizou pela observação das alterações nucleares típicas de apoptose (Figura 3) para todos os tratamentos.



**Figura 2.** Linfócitos T SBm7462-reativos após estímulo com o peptídeo sintético na presença de mitramicina. Células TUNEL+ (setas). **A)** 9 dias após a primeira imunização. **B)** 30 dias após a primeira imunização. **C)** 45 dias após a primeira imunização. Técnica de TUNEL, 1000X.



**Figura 3.** Linfócitos T SBm7462-reativos após estímulo com o peptídeo sintético na presença de ciclosporina A apresentando morfologia típica de apoptose (setas). **A)** 9 dias após a primeira imunização. **B)** 30 dias após a primeira imunização. **C)** 45 dias após a primeira imunização. Técnica de acridina laranja, 400X.

### 5.3.1. Efeito de drogas indutoras de AICD

### 5.3.1.1. Mitramicina

**Tabela 2.** Médias das porcentagens de viabilidade e médias das porcentagens de células apoptóticas em linfócitos T SBm7462-reativos das diferentes coletas e tratamentos após 72 horas de estímulo.

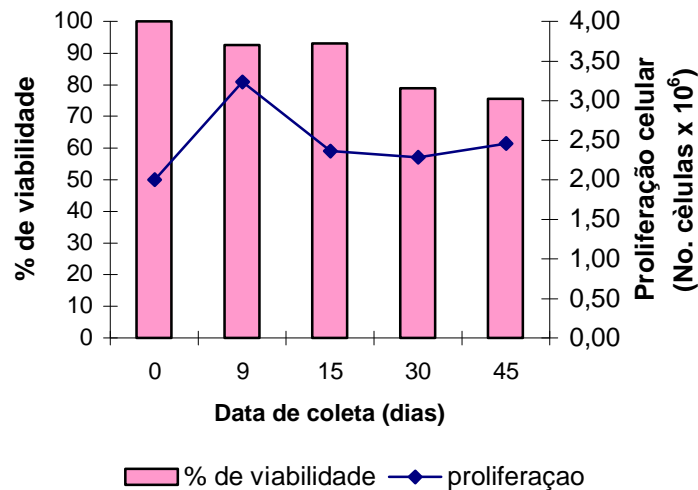
Tratamento	Datas de coleta (dias)	% de viabilidade técnica de azul de tripan	% de células apoptóticas técnica de TUNEL	% de células apoptóticas laranja de acridina
I L T SBm7462 q peritoneais Peptídeo	9	92,59	13,14 b	18,10 a
	15	93,18	16,12 ab	19,04 a
	30	78,94	14,65 ab	12,67 a
	45	75,55	18,69 a	20,36 a
II L T SBm7462 q peritoneais peptideo mitramicina	9	71,14	10,28 d	23,78 b
	15	64,13	17,00 c	26,91 b
	30	25,02	39,25 b	70,25 a
	45	25,73	52,31 a	67,55 a
III L T SBm7462 q peritoneais mitramicina	9	65,00	22,30 c	49,49 c
	15	42,05	24,62 c	35,32 c
	30	21,00	39,32 b	52,94 b
	45	16,93	76,52 a	77,52 a

\* Médias seguidas pelas mesmas letras de cor preta nas colunas, para cada um dos tratamentos não diferem estatisticamente entre si pelo teste de "Tukey" a 5 % de probabilidade.

No caso da droga mitramicina pode-se observar que houve no tratamento II uma mortalidade intensa (53,92%), principalmente naqueles linfócitos que foram coletados aos 30 dias após a primeira imunização, embora tenha sido um pouco menor que a observada no tratamento III

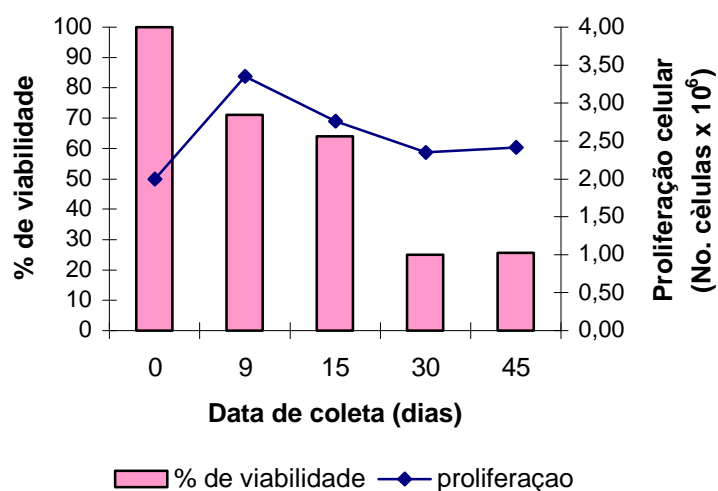
(57,94%), que também se mostrou intensa aos 45 dias (58,62%) (Tabela 1 e Figuras 2, 3 e 4).

Na Tabela 1, quando foi avaliada a mitramicina pela técnica de TUNEL pode-se observar que as maiores médias de porcentagens de células apoptóticas correspondem ao tratamento III e que foram estatisticamente diferentes quando comparadas com os tratamentos I e II. Ainda, se pode observar que as médias de células apoptóticas constatadas aos 30 dias não mostraram diferença estatística entre os tratamentos II e III.



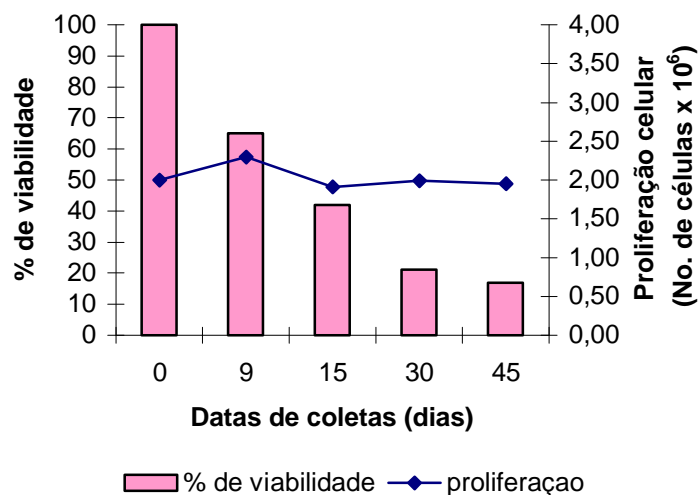
**Figura 4.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 72 horas de estímulo com o peptídeo sintético.

Na comparação das médias dentro de cada tratamento encontrou-se que houve diferença estatística entre os valores médios obtidos para o tratamento II nas quatro coletas, sendo que no dia 45 se obtiveram médias com maior porcentagem de células apoptóticas, diferentemente daquelas que foram obtidas no dia 9 cujas médias foram menores (Tabela 1 e Figura 6).



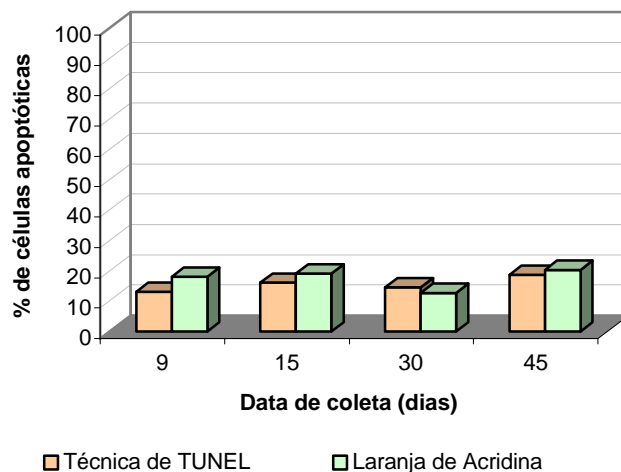
**Figura 5.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 72 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de mitramicina.

As médias das porcentagens de células apoptóticas quando avaliadas pela técnica de laranja de acridina mostraram diferença significativa quando se compararam os valores observados aos 30 e 45 dias no tratamento II e nos tratamentos I e III (Tabela 1 e Figuras 5, 6 e 7). Já quando se comparam as médias nos diferentes tempos de coleta no tratamento II se observa que houve diferença estatística aos 9 e 15 dias quando comparado com 30 e 45 dias (Tabela 1).



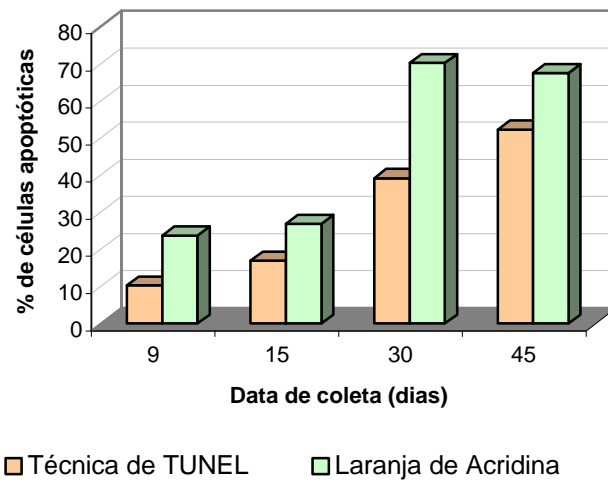
**Figura 6.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 72 horas na presença de mitramicina.

A diferença do que foi descrito por Ruiz (1997) em células Jurkat pré-tratadas com mitramicina, no tratamento II não houve inibição da proliferação celular após re-estímulo e embora se tenha observado maior porcentagem de células apoptóticas nos linfócitos que foram coletados 30 e 45 dias após a primeira imunização (Tabela 1), assim mesmo houve alguma proliferação celular (Figura 3). A diferença nestes resultados pode ser devida ao fato que os linfócitos T SBm7462-reativos não foram pré-tratados com o medicamento. Já, as porcentagens de células apoptóticas que foram encontradas parecem indicar que a mitramicina não influenciou na AICD via sinalização do TCR, principalmente nos linfócitos coletados aos 9 e 15 dias após a primeira imunização (Tabela 1).



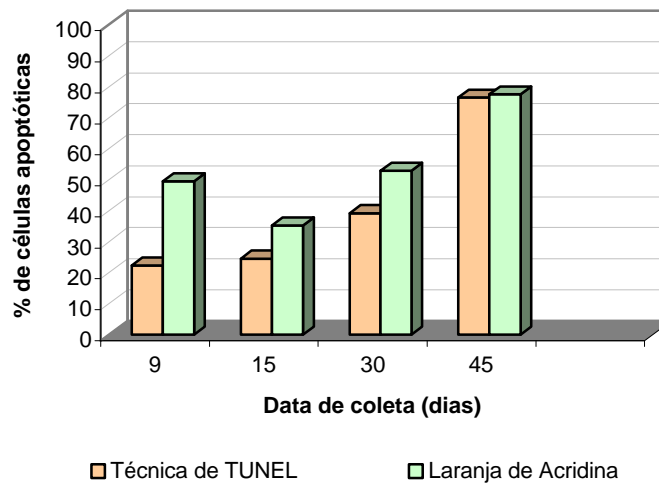
**Figura 7.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 72 horas de estímulo com o peptídeo sintético.

Esse efeito sobre AICD também foi observado por Ruiz (1997). Entretanto, Chatterjee et al. (2001) encontraram que a mitramicina teve um efeito protetor sobre a apoptose de neurônios induzidos a estresse oxidativo e a agentes genotóxicos. eles relacionaram esse efeito protetor com a capacidade da Mitramicina se ligar a sequências ricas em G-C impedindo os fatores de transcrição SP1 e SP3, o que pode levar à inibição do gene *c-myc* nas primeiras 24 horas (RUIZ, 1997). A não expressão deste gene relaciona-se com inibição da proliferação, o que significa que no tratamento II não houve inibição deste gene após tratamento com a Mitramicina. Isto está baseado nas observações sobre proliferação e porcentagens de células apoptóticas que foram constatadas no sistema modelo após re-estímulo com o peptídeo (Tabelas 2, 3, 4 e 5).



**Figura 8.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 72 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de mitramicina.

**Figura 9.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T



SBm7462-reativos no tratamento III, após 72 horas na presença de mitramicina.

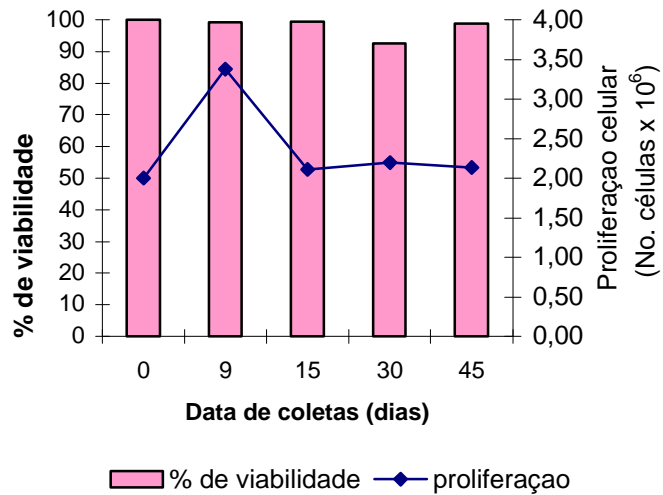
### 5.3.1.2 Cicloheximida

**Tabela 3.** Médias das porcentagens de viabilidade e médias das porcentagens de células apoptóticas em linfócitos T SBm7462-reativos das diferentes coletas e tratamentos após 10 horas de estímulo.

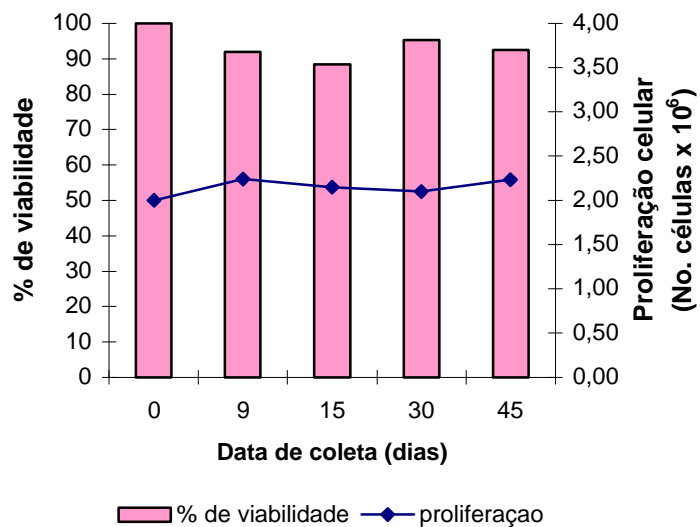
Tratamento	Datas de coleta (dias)	% de viabilidade técnica de azul de tripan	% de células apoptóticas técnica de TUNEL	% de células apoptóticas laranja de acridina	
<b>I</b> L T SBm7462 q peritoneais Peptídeo	9	99,29	9,78	13,77	b
	15	99,43	8,48	9,26	b
	30	92,48	11,23	20,51	a
	45	98,87	10,09	11,48	b
<b>II</b> L T SBm7462 q peritoneais peptideo ciclohexemida	9	91,88	9,51	16,93	a
	15	88,42	9,21	16,44	a
	30	95,29	10,63	15,48	a
	45	92,44	8,84	7,54	b
<b>III</b> L T SBm7462 q peritoneais ciclohexemida	9	90,70	11,59	18,81	a
	15	88,78	8,71	11,03	b
	30	97,80	12,74	13,84	ab
	45	89,18	12,37	14,84	ab

\*Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, para cada um dos tratamentos não diferem estatisticamente entre si pelo teste de "Tukey" a 5 % de probabilidade.

\*\* As médias obtidas para esta droga na técnica de TUNEL não tiveram diferença significativa em ANOVA.

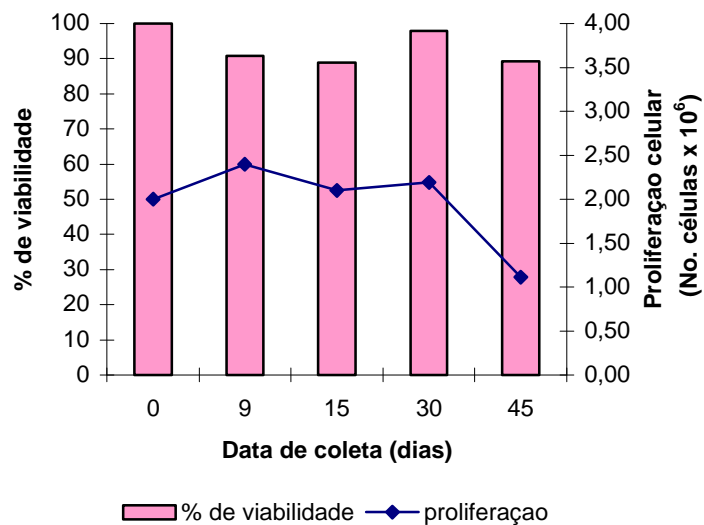


**Figura 10.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 10 horas de estímulo com o peptídeo sintético.



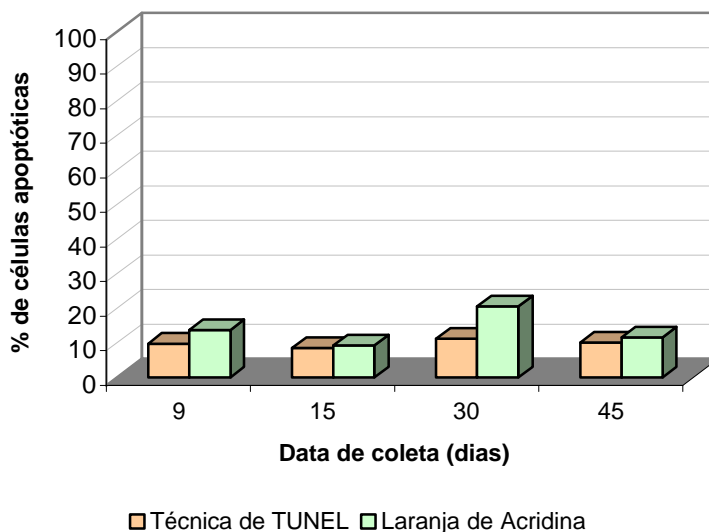
**Figura 11.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 10 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de cicloheximida.

As porcentagens de viabilidade no tratamento com cicloheximida foram altas para os três tratamentos, embora, o tratamento I foi o que obteve médias mais altas. Ao se comparar com o tratamento II verifica-se que os linfócitos coletados aos 15 dias após imunização tiveram uma redução na sobrevivência de 11,01%, semelhante ao que se observou no tratamento III (Tabela 1 e Figuras 2, 3, 4, 5).



**Figura 12.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 10 horas na presença de cicloheximida.

As médias das porcentagens de células apoptóticas nos testes realizados com a técnica de TUNEL nos linfócitos antígeno reativos coletados aos 9, 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização mostraram que não houve variação nem diferença estatisticamente significativa no teste de ANOVA quando se compararam os tratamentos I, II e III na presença de cicloheximida (Tabela 2 Figura 19).



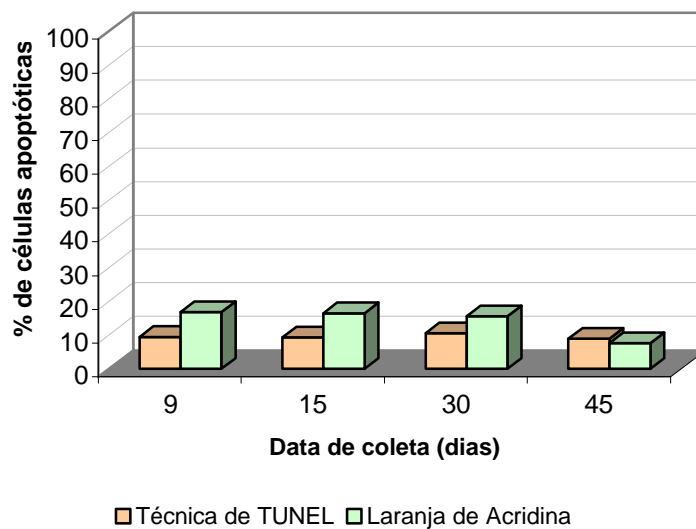
**Figura 13.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 10 horas de estímulo com o peptídeo sintético.

Os resultados para o medicamento cicloheximida pelo corante laranja de acridina mostram que as médias das porcentagens de células apoptóticas para o dia 9 não apresentaram diferença estatística entre os três tratamentos. No dia 15 o valor maior das médias correspondeu ao tratamento II, sendo estatisticamente diferente àquelas dos tratamentos I e II. No dia 30 não houve diferença estatística entre as médias obtidas para o tratamento III e os valores obtidos para o tratamento II. Para o dia 45 a média maior se encontrou no tratamento III e a menor no tratamento II (Tabela 4 e Figura 24).

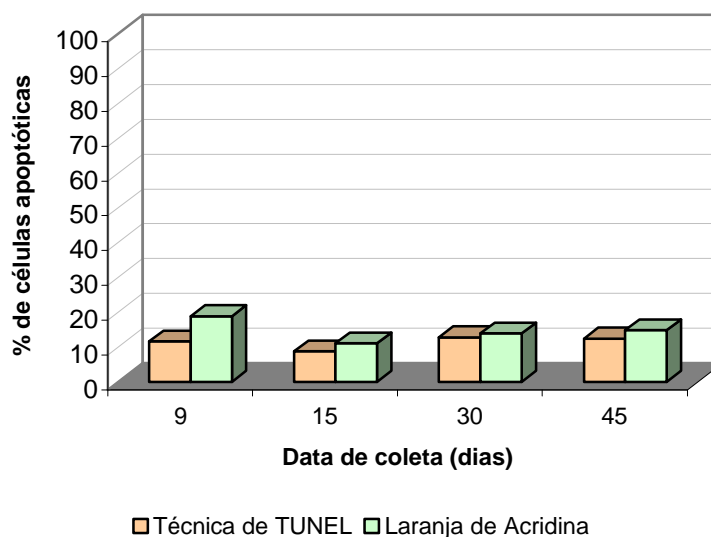
Os resultados de viabilidade obtidos com a dose de 10µg/ml de CHX, nos três tratamentos, bem como as médias das porcentagens de células apoptóticas obtidas pelos métodos de detecção utilizados mostram que esta droga não inibiu a morte celular induzida por ativação, o que indicaria que no tratamento II utilizado no presente trabalho não estaria envolvido o processo

de síntese *de novo* de proteínas para que ocorra o processo de apoptose após sinalização do TCR.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Ruiz (1997) quem também constatou, usando essa mesma dose, que a CHX não bloqueia a apoptose induzida por A23187. Igualmente, Niwa et al. (1999) encontraram que em neutrófilos a síntese de proteínas não é requerida para estimulação de apoptose por TNF- $\alpha$ , embora outros estudos realizados por Shi et al. (1989) mostraram que a síntese de proteínas é um pré-requisito para a indução de apoptose em hibridomas de células T. Esta dualidade de efeitos já foi descrita por vários autores em hibridomas de células T (Martin et al., 1990; Meisenholder et al., 1996; Ruiz, 1997), em culturas primárias de hepatócitos (Blom et al., 1999) e em neurônios (Marotta et al. 2002), sendo que os mecanismos pelos quais a CHX induz apoptose não são bem entendidos.



**Figura 14.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 10 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de cicloheximida.



**Figura 15.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 10 horas na presença de cicloheximida.

Embora a síntese macromolecular tenha sido considerada essencial para a morte celular por apoptose, atualmente se considera que de acordo com o sistema celular utilizado experimentalmente, a presença de inibidores da síntese protéica podem levar à prevenção ou estimulação da apoptose (Lemaire et al. 1999). Ainda, Tsuchida et al. (2002) sugerem que dependendo da concentração de CHX, seus efeitos são diversos e freqüentemente não relacionados com inibição da síntese de proteínas. A prevenção da morte celular na presença de CHX tem sido atribuída ao fato de interferir com processos ativos, através da inibição da síntese de produtos de genes de morte, como também com a expressão aumentada de genes de vida, incluindo Bcl-2 e moléculas envolvidas na função mitocôndrial.

Assim, os efeitos da CHX sobre a indução de apoptose têm levado a especular que a maquinaria apoptótica poderia ser constitutivamente expressa de uma forma latente, estando sob restrição de proteínas de vida lábeis ou de fatores anti apoptóticos (Lemaire, et al. 1999). Fundamentado no anteriormente exposto, pode-se inferir que a presença de CHX no tratamento II não foi necessária para estimular a apoptose. Entretanto, nos linfócitos que foram coletados 30 dias após a primeira imunização parece ter havido prevenção de apoptose, já que ao se comparar com o tratamento I se observa que as porcentagens de células apoptóticas foram menores (Tabela 2).

Ainda, a CHX na dose utilizada não produziu efeito tóxico sobre as células. Isto está demonstrado nos resultados obtidos com a técnica de TUNEL que mostram não haver diferença estatística entre as médias de células apoptóticas nos três tratamentos. Resultados similares foram obtidos por Kongphanich et al. (2002) usando as linhas celulares T humanas HUT102 e MT-2, já que eles comprovaram que após três dias de tratamento só com CHX a porcentagem de apoptose era mínima.

Blom et al. (1999), utilizando doses entre 30-300 $\mu$ M constataram que apenas 4% dos hepatócitos eram apoptóticos após duas horas da adição de CHX, embora observaram que com a dose de 100 $\mu$ M a apoptose aumentou em 10% após 4 horas. E apesar de que com a técnica de laranja de acridina se tenha observado diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4), parece que esta diferença está mais relacionada à sensibilidade dos linfócitos de memória a AICD, já que o valor máximo de apoptose foi de 16,93% naqueles linfócitos coletados aos 9 dias após a primeira imunização. Por outro lado, Marotta et al. (2002) encontraram que a dose de 10 $\mu$ M de CHX diminuía a sobrevivência em 18% dos neurônios isquêmicos que foram tratados com este medicamento. A diferença do reportado por estes autores, a viabilidade no tratamento II foi reduzida apenas em 11,01% nos linfócitos que foram coletados 15 dias após a primeira imunização.

### 5.3.2. Efeito de drogas inibidoras de apoptose

#### 5.3.2.1 Benzamida rubósido

**Tabela 4.** Médias das porcentagens de viabilidade e médias das porcentagens de células apoptóticas em linfócitos T SBm7462-reativos das diferentes coletas e tratamentos após 15 horas de estímulo.

Tratamento	Datas de coleta (dias)	% de viabilidade técnica de azul de tripan	% de células apoptóticas técnica de TUNEL	% de células apoptóticas laranja de acridina
I L T SBm7462 q peritoneais Peptídeo	9	98,89	8,31 b	11,68 ab
	15	99,47	8,87 b	12,34 ab
	30	97,33	16,79 a	9,81 b
	45	97,59	10,74 b	13,75 a
II L T SBm7462 q peritoneais peptideo benzamida rubósido	9	94,06	8,62 b	18,32 ab
	15	87,73	14,21 a	12,44 b
	30	71,97	17,88 a	23,32 a
	45	89,26	14,40 a	14,47 b
III L T SBm7462 q peritoneais benzamida rubósido	9	99,00	9,90 b	15,58 a
	15	92,30	8,48 b	8,90 b
	30	77,14	16,55 a	17,85 a
	45	89,00	17,31 a	18,24 a

\* Médias seguidas pelas mesmas letras de cor preta nas colunas, para cada um dos tratamentos não diferem estatisticamente entre si pelo teste de "Tukey" a 5 % de probabilidade.

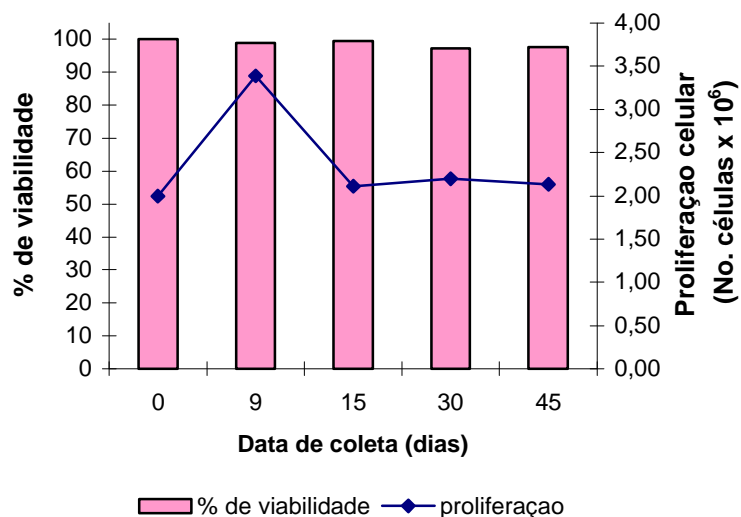
Com a droga benzamida rubósido se encontrou que a mortalidade no tratamento I foi menor que a observada no tratamento II que mostrou uma queda de 25,36% de sobrevivência na coleta realizada 30 dias após a primeira imunização, a diferença do tratamento III que teve redução de 20,19% (Tabela 3 e Figuras 16, 17 e 18).

As médias das porcentagens de células apoptóticas detectadas pela técnica de TUNEL obtidas para o tratamento com benzamida ribósido não apresentaram diferença estatística aos 9 e 30 dias após a primeira imunização. No dia 15 o tratamento II apresentou médias de células apoptóticas maior que os tratamentos I e III, sendo estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Tabela 3 e Figuras 19, 20 e 21 ).

Entretanto, ao se compararem as médias obtidas nas diferentes datas de coletas se observou que para o tratamento II o menor valor médio obtido foi no dia 9 e este valor foi estatisticamente diferente aos valores obtidos para os dias 15, 30 e 45 os quais não apresentaram diferença estatística (Tabela 3).

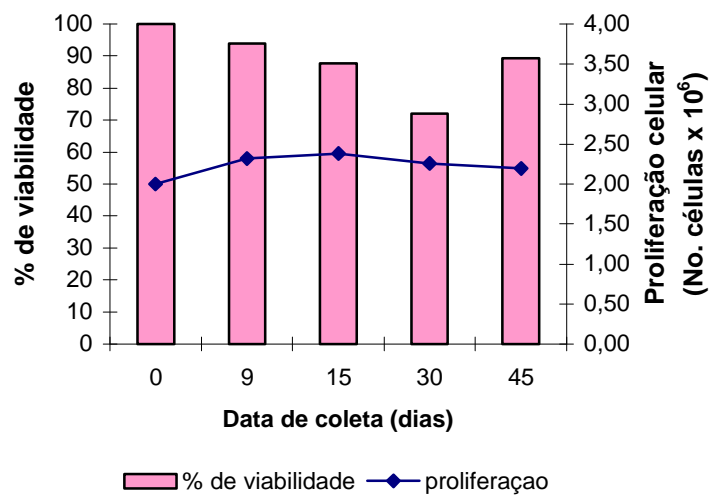
Quanto à técnica de laranja de acridina se observou diferença estatística nos dia 15 e 30 quando se compararam as médias dos tratamentos II e III, enquanto que aos 9 e 45 dias não se encontrou diferença estatística entre eles. Porém, aos 9 e 30 dias se encontrou diferença estatística quando se compararam as médias de células apoptóticas observadas nos tratamentos I e II (Tabela 3 e Figuras 19, 20 e 21).

Quando se compararam as médias das porcentagens de células apoptóticas observadas no tratamento II, nas diferentes datas de coletas, se encontrou que houve maior número de células apoptóticas na coleta do dia 45 e que a média encontrada no dia 15 não foi estatisticamente diferente das outras (Tabela 3).

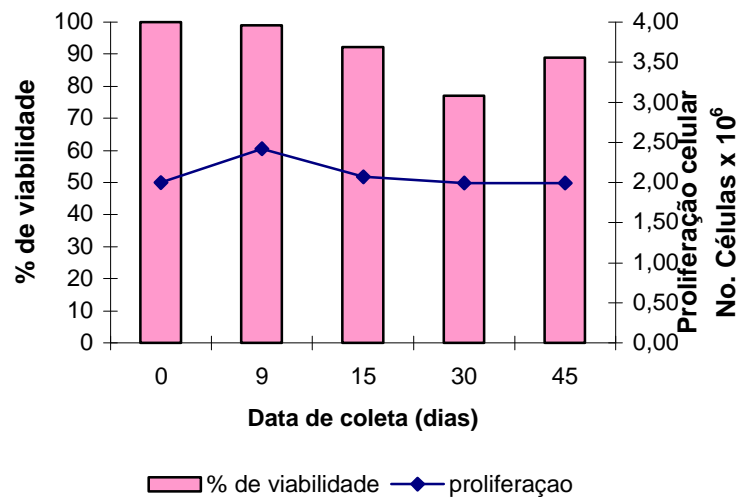


**Figura 16.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 15 horas de estímulo com o peptídeo sintético.

Nos grupos tratados com benzamida ribósido se observa que não houve inibição da morte induzida via sinalização do TCR (Tabela 3), pelo que se pode inferir que esta droga não se ligou ao RNA e conseqüentemente não houve inibição de síntese de proteínas, estes resultados estão em desacordo com os que foram descritos por Rauko et al. (2001). Porém, Ruiz (1997) também constatou que uma dose de 125 $\mu$ M/ml não inibia a apoptose em células Jurkat, concluindo que estas células expressam constitutivamente toda a maquinaria necessária para a indução de apoptose, o que também deve acontecer nos linfócitos T SBm7462-reativos que foram utilizados.

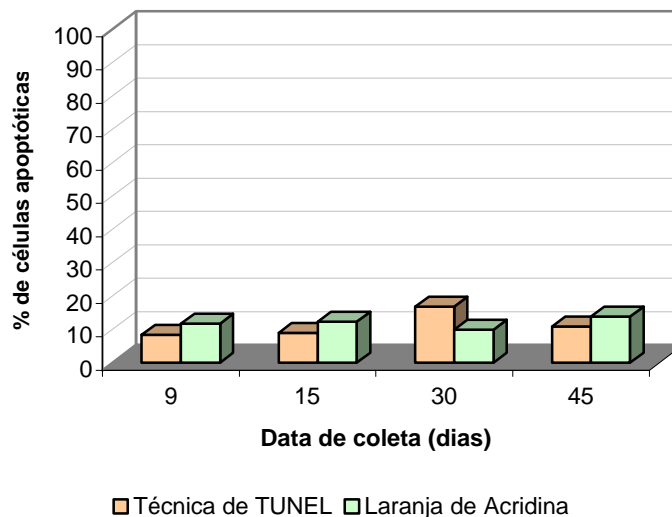


**Figura 17.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 15 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de benzamida ribósido.



**Figura 18.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 15 horas na presença de benzamida ribósido.

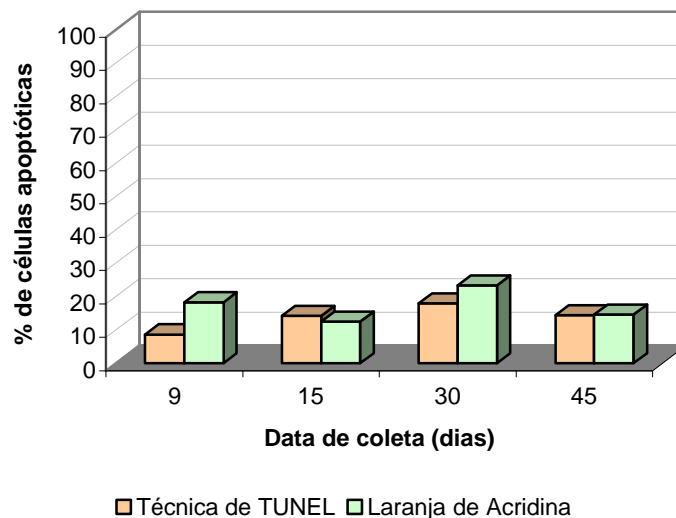
Recentemente, Khanna et al. (2004) descreveram os efeitos do ribósido em células H520, células neoplásicas de pulmão, utilizando 50 $\mu$ M desta droga. Eles constataram que houve aparecimento de apoptose, a qual foi induzida pela baixa regulação da proteína anti apoptótica Bcl-2, o que levaria a liberação de citocromo C e ativação da caspase-9. Ainda, estes autores comprovaram que não se produzia diminuição nos níveis de proteínas indutoras de apoptose (AIF). Entretanto, outros autores relatam que a apoptose mediada pelo ribósido parece ser consequência da inibição da enzima inosina 5'-monofosfato desidrogenase, (IMPDH) (POLGAR, et al., 2002).



**Figura 19.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 15 horas de estímulo com o peptídeo sintético.

A discrepância nos resultados descritos na literatura e aqueles que foram aqui observados, podem ser justificados pela diferença dos sistemas utilizados, principalmente pelo fato de que essas pesquisas têm sido conduzidas em hibridomas ou em linhas celulares neoplásicas, as quais

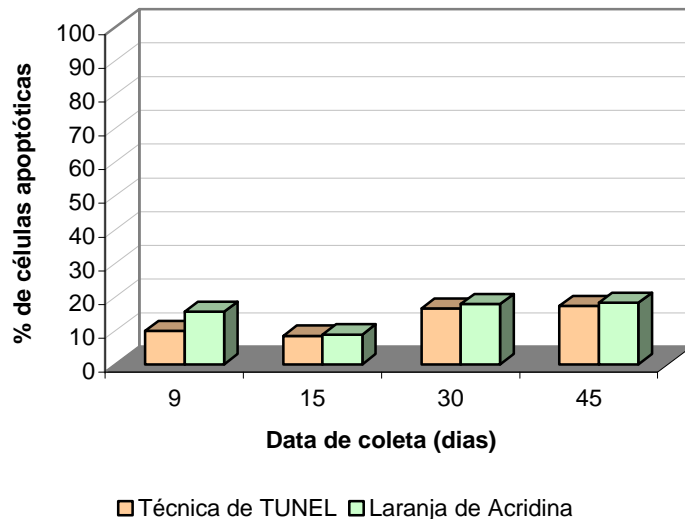
freqüentemente mostram algum defeito na regulação do gene bcl-2 e também porque essas células expressam níveis muito altos de IMPDH II, diferente das células normais que expressam a isoforma IMPDH I, além de que os tempos de observação foram superiores a 24 horas.



**Figura 20.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 15 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de benzamida ribósido.

Khanna et al. (2004) observou 45% de apoptose quando usou a benzamida ribósido na concentração de 50 $\mu$ M em células KH520 a diferença do que foi constatado neste estudo, em que os níveis de apoptose não foram superiores a 24% (Tabela 3) pelo método de coloração com laranja de acridina, o que comprova mais uma vez que no sistema que foi utilizado não houve efeito cumulativo e/ou inibitório da benzamida ribósido na AICD após ativação pelo antígeno, efeito este que se demonstra pelos valores de viabilidade e proliferação que foram observados (Figura 16, 17 e 18),

discordando com o que foi sugerido por estes autores a respeito do efeito antiproliferativo que foi constatado com a referida droga.



**Figura 21.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 15 horas na presença de benzamida ribósido.

### 5.3.2.2 Ciclosporina A

A porcentagem de viabilidade avaliada para os grupos tratados com ciclosporina A mostrou uma diminuição da sobrevivência das células aos 30 e 45 após a primeira imunização, tanto para o tratamento II quanto para o tratamento III, sendo respectivamente 20,21% e 21,03% para o tratamento II e 18,94% e 17,34% para o tratamento III (Tabela 4 e Figuras 22, 23 e 24).

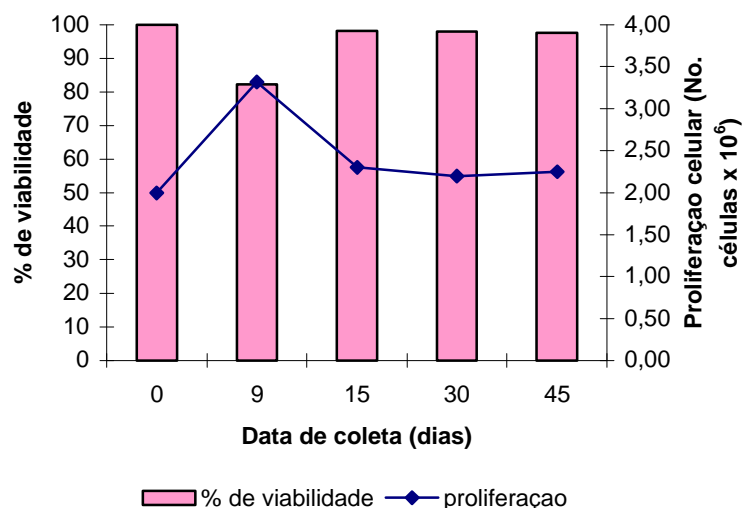
Encontrou-se que o menor valor das médias quando utilizada a técnica de TUNEL corresponde ao tratamento II no dia 9 tendo sido estatisticamente diferente aos tratamentos I e III. Já para as coletas dos dias 15, 30 e 45 o tratamento I mostrou médias menores quando se compararam com os valores médios obtidos para os tratamentos II e III (Tabela 4 e Figura 25, 26 e 27).

**Tabela 5.** Médias das porcentagens de viabilidade e médias das porcentagens de células apoptóticas em linfócitos T SBm7462-reativos das diferentes coletas e tratamentos após 24 horas de estímulo.

Tratamento	Datas de coleta (dias)	% de viabilidade técnica de azul de tripan	% de células apoptóticas técnica de TUNEL	% de células apoptóticas laranja de acridina
<b>I</b> L T SBm7462 q peritoneais peptideo	9	82,25	9,48	a 15,36 a
	15	98,09	9,62	a 14,79 ab
	30	98,04	10,58	a 10,80 b
	45	97,56	7,90	a 14,76 ab
<b>II</b> L T SBm7462 q peritoneais peptideo ciclosporina A	9	81,29	4,90	b 30,51 a
	15	82,67	14,03	a 16,31 c
	30	77,83	12,14	a 22,81 b
	45	76,53	17,18	a 22,65 b
<b>III</b> L T SBm7462 q peritoneais ciclosporina A	9	57,00	12,54	a 23,64 a
	15	74,19	15,41	a 20,15 a
	30	79,10	16,04	a 21,10 a
	45	80,20	15,25	a 25,94 a

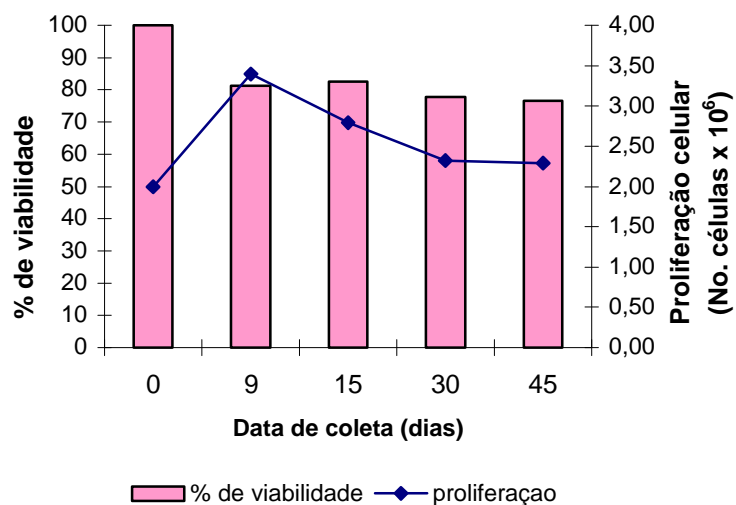
\* Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, para cada um dos tratamentos não diferem estatisticamente entre si pelo teste de "Tukey" a 5 % de probabilidade.

Igualmente, se observou que no caso do tratamento II o valor da média obtida para o dia nove foi diferente estatisticamente quando comparado com os valores médios das porcentagens correspondentes aos dias 15, 30 e 45 que mostraram valores maiores de apoptose. Também se pode observar que não houve diferença estatística quando se compararam as médias de células apoptóticas para o tratamento I e para o tratamento III (Tabela 4).

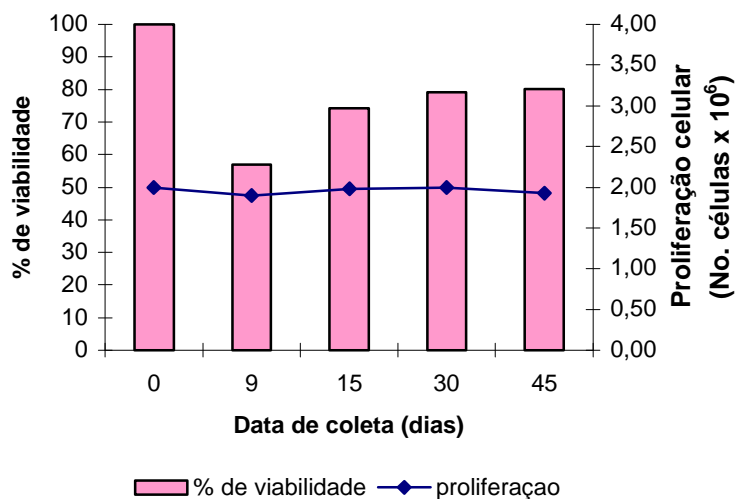


**Figura 22.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação celular dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 24 horas de estímulo com o peptídeo sintético.

Ao utilizar a técnica de laranja de acridina as médias das porcentagens de células apoptóticas obtidas para o tratamento II foram maiores no dia 9 e 30 após a primeira imunização. Entretanto, estas médias foram semelhantes para os dias 15, 30 e 45 quando se compararam os tratamentos I e III com o tratamento II (Tabela 4 e Figuras 25, 26 e 27). Na análise do tratamento II a través do tempo se observa que a maior média de porcentagens de células apoptóticas foi obtida no dia nove, sendo estatisticamente diferente quando comparada com as médias obtidas nas outras datas de coleta (Tabela 4).

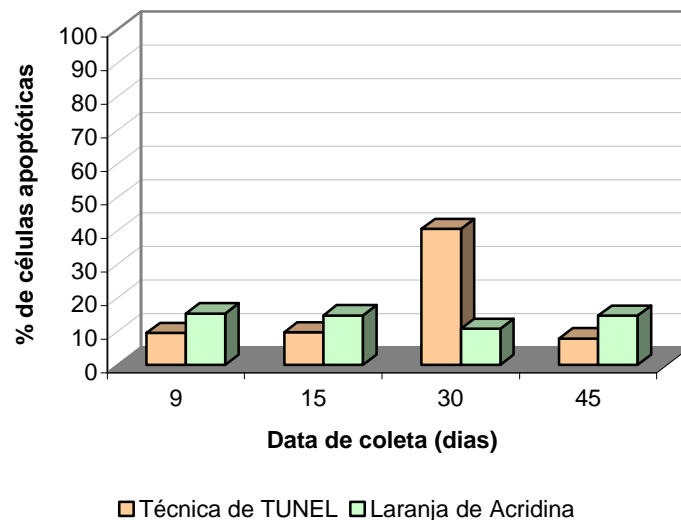


**Figura 23.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 24 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de ciclosporina A.



**Figura 24.** Médias das porcentagens de viabilidade e de proliferação dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 24 horas na presença de ciclosporina A.

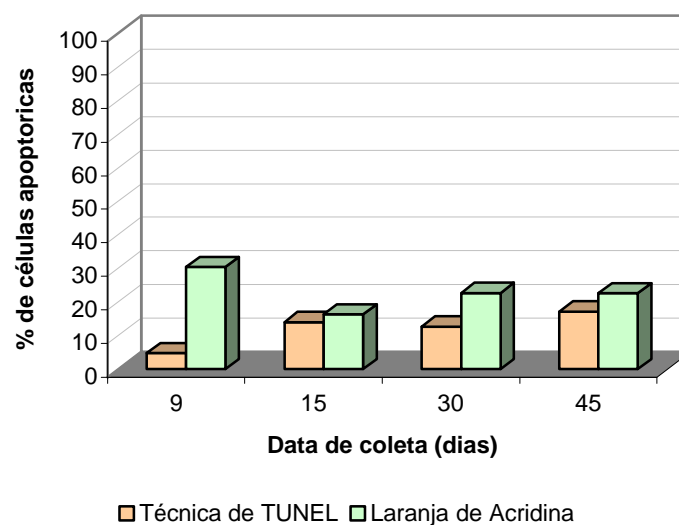
Estes resultados indicam que esta droga não foi capaz de bloquear a perda de viabilidade celular após reestimulação dos linfócitos T SBm7462 reativos, concordando com o que foi descrito por Ruiz (1997), embora diferentes daqueles que foram observados por Fruman et al. (1992). As porcentagens de células apoptóticas que foram observadas no tratamento III estão de acordo com os resultados obtidos por Cheng et al. (2002) em células MDCK, usando 50 $\mu$ M de CsA sozinha constataram 20-30% de morte celular.



**Figura 25.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento I, após 24 horas de estímulo com o peptídeo sintético.

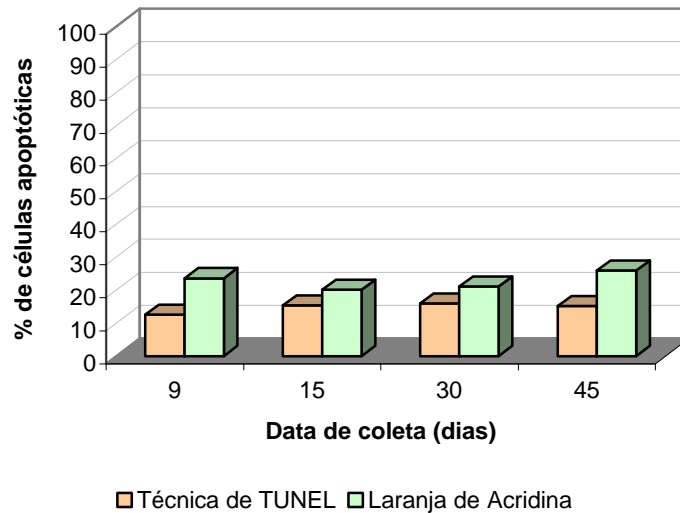
Já, Zheng et al. (1998) observaram que a perda de células T após estímulo com anticorpo anti CD3 era aproximadamente de 40%. Eles adicionaram 150ng/ml de CsA em culturas de linfócitos T de camundongos simultaneamente com as células e constataram que quando as células T estão realmente no ciclo celular, a CsA é incapaz de bloquear completamente a apoptose induzida via sinalização do TCR. Então, a

semelhança do que foi observado por estes autores, no sistema que foi utilizado se observou que a CsA na dose de 200ng/ml, colocada juntamente com as células, não foi capaz de inibir a apoptose dos linfócitos T SBm7462 reativos após o reestímulo (Tabela 4), o que parece indicar que no sistema que foi usado, a AICD induzida pelo antígeno foi mediada por uma via independente da calcineurina.



**Figura 26.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento II, após 24 horas de estímulo com o peptídeo sintético na presença de ciclosporina A.

O efeito da CsA parece envolver processos complexos já que doses altas não inibem completamente a morte de células T, o que pode ser devido ao fato de que a síntese do mRNA de IL-2 e a proliferação como resposta ao estímulo via TCR são completamente bloqueados, enquanto que a expressão de moléculas como Fas e algumas relacionadas com TNF induzidas via TCR são parcialmente inibidas, indicando então que os genes dessas moléculas usam outra via independente de calcineurina (ZHENG et al., 1998).



**Figura 27.** Médias das porcentagens de células apoptóticas dos linfócitos T SBm7462-reativos no tratamento III, após 24 horas na presença de ciclosporina A.

#### 5.4. Considerações Finais

Os resultados que foram observados neste trabalho após o tratamento com as diferentes drogas mostram que após o re-estímulo houve respostas diferentes em relação à sensibilidade dos linfócitos a AICD segundo a data de coleta após imunizações. Isto poderia ser explicado pelos estudos em camundongos que mostram que há uma dicotomia entre células *naive* e de memória (CD4+) na sua resposta à ligação de receptores de Fas. A re-estimulação com o antígeno marca as células de memória a expressarem altos níveis de FLIP, um inibidor de apoptose mediada por Fas, tornando as células resistentes a AICD. Também a alta expressão de CD43 nessas células contribui para sua resistência a apoptose via Fas (CHEN et al., 2003). Entretanto, pode ser que estas afirmações não se cumpram

completamente no sistema que foi utilizado pelo fato de que os linfócitos T SBm7462-reativos foram selecionados em cultura. A este respeito, Critchfield et al. (1995) afirmaram que o estabelecimento de clones de células T não transformadas pode selecionar variantes que diferem significativamente daquelas presentes nos órgãos linfóides periféricos. Por exemplo, clones de células T expressam constitutivamente receptores de alta afinidade para IL-2 e variam na sua habilidade para produzi-la e proliferar. Mais importante ainda é o fato de que certos clones de células T “long-term” não sofrem apoptose induzida via TCR tão eficientemente quanto outros, o que pode ser devido às condições sobre as quais um clone foi derivado e cultivado.

Ainda, Zhang et al. (1997) comentam que há diferenças na susceptibilidade a AICD entre clones de células Th1 e Th2, já que uma das desvantagens da seleção *in vitro* é justamente a obtenção de células que são relativamente resistentes à morte celular e comprovaram que células Th1 e não Th2 sofrem rápida AICD mediada via Fas/FasL após reativação com o antígeno.

Respeito às diferenças entre os métodos de detecção de apoptose, elas podem ser devidas a perdas durante a preparação das lâminas em citocentrífuga ou ao número de células que foi utilizado, o que poderia dificultar a permeabilização das células e conseqüentemente a ligação de TdT no método de TUNEL.

## 6. CONCLUSÕES

- O método utilizado para a obtenção de linfócitos T SBm7462-reativos produziu clones altamente específicos e que foram resistentes a AICD.
- Os macrófagos peritoneais são sensibilizados para apresentar o peptídeo sintético SBm7462 quando pré tratados com meio tioglicolato.
- Os linfócitos T SBm7462-reativos expressam constitutivamente a maquinaria necessária para indução de apoptose após ativação com o peptídeo sintético e o processo de síntese *de novo* de proteínas não está envolvido na AICD, após sinalização via TCR.
- O peptídeo sintético SBm7462 induz proliferação dos linfócitos específicos e esta proliferação não é inibida pelo uso das drogas indutoras ou inibidoras de apoptose usadas neste trabalho.
- A AICD induzida pelo peptídeo sintético SBm7462 foi mediada por uma via independente da calcineurina.
- Não houve inibição do gene *c-myc* após re-estimulação de linfócitos T SBm7462-reativos.

## 6.1. Perspectivas Futuras

Pesquisar outras vias de AICD no sistema modelo, com o uso de outras drogas, tais como: Bisindolilmaleimide que é um inibidor seletivo de proteína Cinasa C (PKC), levando a um bloqueio de Fas e IL-2, assim como o uso de Ortovanadato sódico que exerce sua ação inibindo ATPases (Tyrosinase).

Testar os medicamentos usados no presente estudo, em diferentes dosagens e diferentes tempos de estimulação.

Devem-se utilizar outras técnicas de avaliação de apoptose, como a Citometria de Fluxo e a marcação celular dupla, mediante a combinação dos corantes laranja de acridina e brometo de etídio.

A AICD de linfócitos T hígidos quando induzida por peptídeos sintéticos não tem sido estudada, razão pela qual ainda existem muitas questões sobre a expressão e regulação dos mecanismos apoptóticos em estudos *ex vivo* com estes tipos celulares. A caracterização da AICD em linfócitos T reativos ao peptídeo SBm7462, poderia permitir um melhor entendimento da maquinaria apoptótica que modula a resposta imunológica a este peptídeo *in vivo* e conseqüentemente relaciona-la com dose e freqüência de uso.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, A., COHEN, L.Y., AOUAD, S., SEKALY, R.P. (1999) Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *Journal of Experimental Medical* 190, 1879-1890.
- ALBEROLA-ILA, J., TAKAKI, S., KERNER, J.D., PERLMUTTER, R.M. (1997) Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annual Review of Immunology* 15, 125-154.
- ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., GRIFFITH, T.S., LYNCH, D.H., PAYA, C.V. (1999) Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Journal of Immunology* 162, 5205-5211.
- ANEL, A., BUFERNE, M., BOYER, C., SCHMITT-VERHULST, A.M., GOLSTEIN, P. (1994) T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine Kinase inhibitors and cyclosporin A. *European Journal of Immunology* 24, 2469-2476.
- ARNOLD, B., SCHÖNRICH, G., HÄMMERLING, G.J. (1993) Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunology Today* 14, 12-14.

- ASHKENAZI, A., DIXIT, V.M. (1998) Death Receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- AYROLDI, E., ZOLLO, O., CANNARILE, L., D'ADAMIO, F., GROHMANN, U., DELFINO, D.V., RICCARDI, C. (1998) Interleukin-6(IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/FasL expression and cell death. *Blood* 92, 4212-4219.
- BLOM, M., BONT, H.J.G.D., MEIJERMAN, I., MULDER, G.J., MAGELKERKE, J.F. (1999) Prevention of Cycloheximide-Induced apoptosis in hepatocytes by adenosine and by caspase inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 58, 1891-1898.
- BOLDIN, M.P., CARFOLOMEEV, E.E., PANCER, Z., METT, I.L., CAMONIS, J.H., WALLACH, D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 and initiates apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 270, 7795-7798.
- CHATTERJEE, S., ZAMAN, K., RYU, H., CONFORTO, A., RATAN, R.R. (2001) Sequence-selective DNA binding drugs mithramycin A and chromomycin A3 are potent inhibitors of neuronal apoptosis induced by oxidative stress and DNA damage in cortical neurons. *Annual Neurology* 49, 345-354.
- CHEN, A., ZHENG, G., TYKOCINSKI, M.L. (2003) Quantitative interplay between activating and pro-apoptotic signals dictates T cell responses. *Cellular Immunology* 221, 128-137.
- CHINNAIYAN, A.M., O'ROURKE, K., TEWARI, M., DIXIT, V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- CHINNAIYAN, A.M., O'ROUKE, K., YU, G.-L., LYONS, R.H., GARG, M., DUAN, D.R., XING, L., GENTZ, R., NI, J., DIXIT, V.M. (1996) Signal Transduction by DR3, a Death Domain-Containing Receptor Related to TNRF-1 and CD95. *Science* 274, 990.
- CRABTREE, G.R. (1989) Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243, 355-361.
- CRITCHFIELD, J.M., BOEHME, S.A. AND LENARDO, M.J. (1995) The regulation of antigen-induced apoptosis in mature T lymphocytes. In: C.D. Gregory (Ed) *Apoptosis and The immune Response*. Wiley-Liss Inc., New York, p. 55-114.

- DE ALBORÁN, I.M., ROBLES, M.S., BRAS, A., BAENA, E. AND MARTÍNEZ-A, C. (2003) Cell death during lymphocyte development and activation. *Seminars in Immunology* 15, 125-133.
- DHEIN, J., WALCKZAK, H., BÄUMLER, C., DEBATIN, K.M. AND KRAMMER, P.H. (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(fas/CD95). *Nature* 373, 438-441.
- EVAN, G.I., WYLLIE, A.H., GILBERT, C.S., LITTLEWOOD, T.D., LAND, H., BROOKS, M., WATERS, C.M., PENN, L.Z. AND HANCOCK, D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- FILIPSKI, J., LEBLANC, J., YOUNG, T., SIKORSKA, M. AND WALKER, P.R. (1990) Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO Journal* 9, 1319-1327.
- FISCHER, G., KENT, S.C., JOSEPH, L., GREEN, D.R. AND SCOTT, D.W. (1994) Lymphoma models for B cell activation and tolerance. X. Anti-MIU-mediated growth arrest and apoptosis of murine B cell lymphomas is prevented by the stabilization of myc. *Journal of Experimental Medical* 179, 221-228.
- FRUMAN, D.A., MATHER, P.E., BURAKOFF, S.J. AND BIERER, B.E. (1992) Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas. *European Journal of Immunology* 22, 2513-2517.
- GONZALEZ, C. Z. (2004) Resposta immune de bovinos vacinados com o peptídeo sintético SBm7462 com vistas ao controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Em: Departamento de Veterinária. Laboratório de Biología e Controle de Hematozoários. Tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa p. 91.
- GREEN, D.R. AND SCOTT, D.W. (1994) Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 6, 476-487.
- GUPTA, S. (1996) Apoptosis/Programmed Cell Death: A historical Perspective. In: P. Press (Ed) *Mechanisms of lymphocyte Activation and Immune Regulation VI*, Vol. 406. Plenum Publishing Corporation, New York, p. 270.
- HENGARTNER, M.O., ELLIS, R.E. AND HORVITZ, H.R. (1995) *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494.

- HILDEMAN, D.A., ZHU, Y., MITCHELL, T.C., KAPPLER, J. AND MARRACK, P. (2002) Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Current Opinion in Immunology* 14, 354-359.
- HIRATA, H., TAKAHASHI, A., KOBAYASHI, S., YONEHARA, S., SAWAI, H., OKAZAKI, T., YAMAMOTO, K. AND BASADA, M. (1998) Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medical* 187, 567-600.
- HOCKENBERY, D., NUNEZ, G., MILLIMAN, C., SCHREIBER, R.D. AND KORSMEYER, J.T. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.
- HOCKENBERY, D.M., OLTVAI, Z.N., YIN, X.M., MILLIMAN, C.L. AND KORSMEYER, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251.
- HOUGHTEN, A.R. (1985) General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of National Academy of Science, U.S.A.* 82, 5131-5135.
- HSU, H., HUANG, J., SHU, H.-B., BAICHWAL, V. AND GOEDEL, D.V. (1996a) TNF-Dependent Recruitment of The Protein Kinase RIP to the TNF Receptor-1 Signaling Complex. *Immunity* 4, 387-396.
- HSU, H., SHU, H.-B., PAN, M.-G. AND GOEDEL, D.V. (1996b) TRADD-TRAF2 and TRADD-FAAD interactions Define Two Distinct TNF Receptor 1 Signal Transduction Pathways. *Cell* 84, 299-308.
- ITOH, N. AND NAGATA, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 10932-10937.
- IZQUIERDO, M., DOWNWARD, J., GRAVES, J.D. AND CANTRELL, D.A. (1992) Role of protein Kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21 ras : evidence that two p21 ras regulatory pathways coexist in T cells. *Molecular Cell Biology* 12, 3305-3312.
- JÄÄTTELÄ, M. AND TSCHOPP, J. (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nature immunology* 4, 416-422.

- JACOBSON, M., WEIL, M., RAFF, M.C. (1997) Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 88, 347-354.
- JANSSEN, O., WESSELBORG, S., HECKL-OSTREICHER, B., PECHHOLD, K., BENDER, A., SCHONDELMAIER, S., MOLDENHAUER, G., KABELITZ, D. (1991) T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor gamma delta + T cells. *Journal of Immunology* 146, 35-39.
- JOHNSON, S., HARRISON, D.J., WYLLIE, A.H. (1997) Apoptosis: An Overview of the process and its relevance in disease. In: S.H. Kaufmann (Ed) *Apoptosis: Pharmacologic implications and therapeutic opportunities*, Vol. 41. Academic Press, Rochester, Minnesota.
- JONES, L.A., CHIN, L.T., LONGO, D.L., KRUISBEEK, A.M. (1990) Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science* 250, 1726-1729.
- KHANNA, N., JAYARAM, H.N., SINGH, N. (2004) Benzamide riboside induced mitochondrial mediated apoptosis in human lung cancer H520 cells. *Life Sciences Article in press*.
- KISCHKEL, F.C., HELLBARDT, S., BEHRMANN, I., GERMER, M., PAWLITA, M., KRAMMER, P.H., PETER, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1(Fas/CD95)-associated Proteins Form a Death-inducing Signalling Complex (DISC) with the Receptor. *EMBO Journal* 14, 5579-5588.
- KONGPHANICH, A., HIEDA, M., KUROKAWA, K., MURATA, T., KOBAYASHI, N. (2002) Overcoming the blockade at the ustream of caspase cascade in Fas-resistant HTLV-I-infected T cells By cycloheximide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 714-718.
- KRAMMER, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- LEEVEERS, S.J., MARSHALL, C.J. (1992) Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *EMBO Journal* 11, 569-574.
- LEMAIRE, C., ANDRÉAU, K., SOUVANNAVONG, V., ADAM, A. (1999) Specific dual effect of cycloheximide on B lymphocyte apoptosis: Involvement of CPP32/Caspase-3. *Biochemical Pharmacology* 58, 85-93.

- LENARDO, M.J. (1991) Interleukin-2 programs mouse T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353, 858-861.
- LEVINE, A.J., MOMAND, J., FINLAY, C.A. (1991) The p53 Tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.
- MALISSEN, B., MALISSEN, M. (1996) Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation. *Current Opinion in Immunology* 8, 383-393.
- MAROTTA, D., MARINI, A., BANAUDHA, K., MAHARAJ, S., IVES, J., MORRISSETTE, C.R., JONAS, W.B. (2002) Non-linear effects of Cycloheximide in glutamate-treated cultures rat cerebellar neurons. *Neurotoxicology* 23, 307-312.
- MARSDEN, V.S., STRASSER, A. (2003) Control of apoptosis in the immune system: Bcl2, BH3-Only proteins and More. *Annual Review of Immunology* 21, 71-105.
- MARTIN, S.J., GREEN, D.R. (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82, 349-352.
- MARTIN, S.J., LENNON, S.V., A.M., BONHAM, A.M., COTTER, T.G. (1990) Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *Journal of Immunology* 145, 1859-1867.
- MEDEMA, J.P., SCAFFIDI, C., KISCHKEL, F.C., SHEVCHENKO, A., MANN, M. (1997a) FLICE is activated by association with the CD95 Death-inducing Signaling Complex (DISC). *EMBO Journal* 16, 2794-2804.
- MEDEMA, J.P., TOES, R.E.M., SCAFFIDI, C., ZHENG, T.S., FLAWELL, R.A., MELIEF, C.J.M., PETER, M.E., OFFRINGA, R., KRAMMER, P.H. (1997b) Cleavage of FLICE by granzyme B during cytotoxic T Lymphocyte-induced apoptosis. *European Journal of Immunology* 27, 3492-3498.
- MEISENHOLDER, G.W., MARTIN, S.J., GREEN, D.R., NORDBERG, J., BABIOR, B.M., GOTTLIEB, R.A. (1996) Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection. *Journal of Biological Chemistry* 271, 16260-16262.
- MERRIFIELD, R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of American Chemistry Society*. 85, 2149.

- MUZIO, M., CHINNAIYAN, A.M., KISCHKEL, F.C., O'ROURKE, K., SHEVCHENCO, A., NI, J., SCAFFIDI, C., BRETZ, J.D., ZHANG, M., GENTZ, R., MANN, M., KRAMMER, P.H., PETER, M.E., DIXIT, V.M. (1996) FLICE, a novel FADD homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- NEWELL, M.K., HAUGHN, L.J., MAROUN, C.R., JULIUS, M.H. (1990) Death of mature cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* 347, 286-289.
- NIWA, M., HARA, A., KANAMORI, Y., MATSUNO, H., KOZAWA, O., YOSHIMI, N., MORI, H., UEMATSU, T. (1999) inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  induced neutrophil apoptosis by cyclic AMP: involvement of caspase cascade. *European Journal of Pharmacology* 371, 59-67.
- OPFERMAN, J.T., KORSMEYER, S.J. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology* 4, 410-415.
- OWEN-SCHAUB, L.B., YONEHARA, S., CRUMP, W.L.R., GRIMM, E.A. (1992) DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunology* 140, 197-205.
- PETER, M.E., KRAMMER, P.H. (1998) Mechanisms of CD95(Apo-1/Fas) mediated apoptosis. *Current Opinion in Immunology* 10, 545-551.
- POLGAR, D., GFATTER, S., UHL, M., KASSIE, F., LEISSER, C., KRUPITZA, G., GRUSCH, M. (2002) Potential mechanisms of benzamide riboside mediated cell death. *Current Medical Chemistry* 9, 765-771.
- PRUD'HOMME, G.J., VANIER, L.E., BOCARRO, D.C., STE-CROIX, H. (1995) Effects of cyclosporin A, Rapamycin, and FK520 on peripheral T-cell deletion and anergy. *Cellular Immunology* 164, 47-56.
- RAUKO, P., NOVOTNY, L., DOVINOVA, I., HUNAKOVA, L., SZEKERES, T., JAYARAM, H.N. (2001) Antitumor activity of benzamide riboside and its combination with Cisplatin and Staurosporine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12, 387-394.
- REED, J.C. (2000) Warner Lambert/Parke Davis award lecture: mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology* 157, 1415-1430.

- RUIZ, M.D.C.R. (1997) Identificación y estudio de moléculas de la superficie de células T con capacidad de inducir apoptosis. En: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis de doctorado Universidad de Granada, Granada, 155p.
- SALES, P. A. (2003) Utilização de microesferas biodegradáveis PLGA como sistema de liberação para a vacina sintética SBm7462 no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) modelo experimental em camundongos. Em: Departamento de Veterinaria. Laboratorio de Biología e controle de Hematozoarios. Tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa., Viçosa, 94p.
- SALVENSEN, G.S., DIXIT, V.M. (1997) Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. *Cell* 91, 443-446.
- SAMELSON, L.E., PATEL, M.D., WEISSMAN, A.M., HARFORD, J.B., KLAUSNER, R.D. (1986) Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 46, 1083-1090.
- SATOH, T., NAKAFUKU, M., KAZIRO, Y. (1992) Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 267, 24149-24152.
- SCAFFIDI, C., KIRCHHOFF, S., KRAMMER, P.H., PETER, M.E. (1999) Apoptosis signaling in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 11, 277-285.
- SHI, Y., GLYNN, J.M., GUILBERT, L.J., COTTER, T.G., BISSONNETTE, R.P., GREEN, D. (1992) Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 257, 212-214.
- SHI, Y., SAHAI, B.M., GREEN, D.R. (1989) Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 339, 625-626.
- SMITH, M.L., CHEN, I.T., ZHAN, Q., O'CONNOR, P.M., FORNACE, A.J. JR. (1995) Involvement of the p53 tumor suppressor gene in repair of UV-type DNA damage. *Oncogene* 10, 1053-1059.
- SNYDER, R.C., RAY, R., BLUME, S., MILLER, D.M. (1991) Mithramycin blocks transcriptional initiation of the c-myc P1 and P2 promoters. *Biochemistry* 30, 4290-4297.

- STELLER, H. (1995) Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science* 267, 1445-1449.
- STRASSER, A., HARRIS, A.W., HUANG, D.C., KRAMMER, P.H., CORY, S. (1995) Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO Journal* 14, 6136-6147.
- STRASSER, A., O'CONNOR, L., DIXIT, V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry* 69, 217-245.
- TAMAOKI, T., NAKANO, H. (1990) Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Bio Technology* 8, 732-735.
- TARTAGLIA, L.A., GOEDDEL, D.V. (1992) Two TNF receptors. *Immunology Today* 13, 151-153.
- THOME, M., SCHNEIDER, P., HOFMANN, K., FICKENSCHER, H., MEINL, E., NEIPEL, F., MATTMANN, C., BURNS, K., BODMER, J.L., SCHROTER, M., SCAFFIDI, C., KRAMMER, P.H., PETER, M.E., TSCHOPP, J. (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.
- THOME, M., TSCHOPP, J. (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nature Reviews Immunology* 1, 50-58.
- THORNBERRY, N.A., LAZEBNIK, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- THULASI, R., HARBOUR, D.V., THOMPSON, E.B. (1993) Suppression of c-myc is a critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. *Journal of Biological Chemistry* 268, 18306-18312.
- TIBBETTS, M.D., ZHENG, L., LENARDO, M.J. (2003) The Death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nature Immunology* 4, 404-409.
- TSUCHIDA, T., KATO, T., YAMADA, A.Y., KAWAMOTO, K. (2002) Cycloheximide induces apoptosis of astrocytes. *Pathology International* 52, 181-185.
- TSUJIMOTO, Y., CROCE, C.M. (1985) Analysis of structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proceeding National Academy of Science (USA)* 83, 5214.

- TSUJIMOTO, Y., FINGER, L.R., YUNIS, J., NOWELL, P.C., CROCE, C.M. (1989) Cloning of Chromosomes break point of neoplastic B cell with t(14:18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097.
- UCKER, D.S., DHEBSHI, L., BLOMQUIST, J.F., TORBETT, B.E. (1994) Physiological T-cell death: susceptibility is modulated by activation, aging, and transformation, but the mechanism is constant. *Immunology Review* 142, 273-299.
- UCKER, D.S., MEYERS, J., OBERMILLER, P.S. (1992) Activation-driven T cell death. II. Quantitative differences alone distinguish stimuli triggering nontransformed T cell proliferation or death. *Journal of Immunology* 149, 1583-1592.
- VAN-PARIJS, L., PETERSON, D.A., ABBAS, A.K. (1998) The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens. *Immunity* 8, 265-274.
- VERHAGEN, A.M., COULSON, E.J., VAUX, D.L. (2001) Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology* 2, 1-10.
- WALLACH, D., KOVALENKO, A.V., VARFOLOMEEV, E.E., BOLDIN, M.P. (1998) Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrib verdict. *Current Opinion in Immunology* 10, 279-288.
- WANG, Z., DUDHANE, A., ORLIKOWSKY, T., CLARKE, K., LI, X., DARZYNKIEWICK, Z., HOFFMANN, M.K. (1994) CD4 engagement induces Fas antigen-dependent apoptosis of T cells in vivo. *European Journal of Immunology* 24, 1549-1552.
- WESSELBORG, S., JANSSEN, O., KABELITZ, D. (1993) Induction of activation-driven death(apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *Journal of Immunology* 150, 4338-4345.
- WIEDERRECHT, G., LAM, E., HUNG, S., MARTIN, M., SIGAL, N. (1993) The mechanism of action of FK-506 and cyclosporine A. *American New York Academic Science* 696, 9-19.
- YANG, E., ZHA, J., JOCKEL, J., KORSMEYER. S.J. (1995.) Bad: a heterodimeric partner of Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.

- ZHANG, X., BRUNNER, T., CARTER, L., DUTTON, R.W., ROGERS, P., BRADLEY, L., SATO, T., REED, J.C., GREEN, D., SWAIN, S.L. (1997) Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but no Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *Journal of Experimental Medical* 185, 1837-1849.
- ZHENG, L., TRAGESER, C.L., WILLERFORD, D.M., LENARDO, M.J. (1998) T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte Death. *The Journal of Immunology* 160, 763-769.
- ZHENG, Y., VIG, M., LYONS, J., PARIJS, L.V., BEG, A.A. (2003) Combined Deficiency of p50 and cRel in CD4+ T cells Reveals an essential requirement for nuclear factor kB in Regulating Mature T cell survival and in vivo function. *Journal of Experimental Medical* 197, 861-874.
- ZHOU, S., OU, R., HUANG, L., MOSKOPHIDIS, D. (2002) Critical role for perforin-Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *Journal of Virology* 76, 829-840.
- ZOU, H., HENZEL, W.J., LIU, X., LUTSCH, A., WANG, X. (1997) Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.