

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

EFEITO DA PIPERINA SOBRE CÉLULAS B
MURINAS E NO MODELO LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES) INDUZIDO
POR PRISTANE EM CAMUNDONGOS BALB/c

ALINE RODRIGUES BERNARDO

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
SANIDADE ANIMAL**

**EFEITO DA PIPERINA SOBRE CÉLULAS B MURINAS E NO
MODELO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES) INDUZIDO POR
PRISTANE EM CAMUNDONGOS BALB/c**

ALINE RODRIGUES BERNARDO

Sob a Orientação da Professora
Maria das Graças Miranda Danelli

e Co-orientação da Professora
Lígia Maria Torres Peçanha

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências, no Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinária, Área de Concentração
em Sanidade Animal

Seropédica, RJ
Março 2013

615.323952

B523e

T

Bernardo, Aline Rodrigues, 1981-

Efeito da piperina sobre células B murinas e no modelo lúpus eritematoso sistêmico (LES) induzido por pristane em camundongos BALB/c / Aline Rodrigues Bernardo - 2013.

65 f.: il.

Orientador: Maria das Graças Miranda Danelli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 53-65.

1. Pimenta - Uso terapêutico - Teses. 2. Pimenta - Efeito fisiológico - Teses. 3. Células B - Teses. 4. Imunidade celular - Teses. 5. Lúpus eritematoso sistêmico - Teses. 6. Camundongo como animal de laboratório - Teses. I. Danelli, Maria das Graças Miranda, 1962-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ALINE RODRIGUES BERNARDO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal

TESE APROVADA EM 07/03/2013



Maria das Graças Miranda Danelli. PhD. UFRRJ
(Orientador)



Débora Decote Ricardo de Lima. PhD. UFRRJ

Célio Geraldo Freire de Lima. PhD. UFRJ

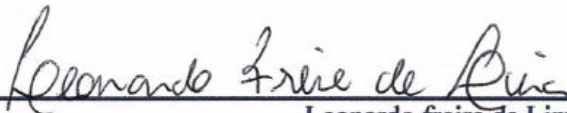


Viveca Antonia Giongo Galvão da Silva. PhD. UFF



Luciana Souza de Paiva. PhD. UFF

Patrícia Fampa Negreiros Lima. PhD. UFRRJ
(Suplente)



Leonardo Freire de Lima. PhD. UFRJ
(Suplente)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo amor, dedicação, confiança e apoio em todas as trajetórias de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me conceber saúde, sabedoria e força para a realização deste trabalho.

À professora Maria das Graças Miranda Danelli que esteve presente em toda minha trajetória científica fazendo parte do meu crescimento profissional e pessoal.

À professora Lígia Maria Torres Peçanha, pelo carinho e apoio científico.

À professora Débora Decoté, pela amizade e apoio científico.

À professora Aparecida Alves do Nascimento pela amizade.

À todas as pessoas que passaram e aos que ainda estão presente no Laboratório de Virose Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ, por terem feito parte deste trabalho mesmo que de forma indireta.

À Amanda Brito Wardini pelos anos de amizade e apoio em todos os momentos.

À Juliana Dutra Barbosa da Rocha, pela indispensável participação neste trabalho e pela nova amizade conquistada.

À Maria Carolina de Freitas Garcia pelo apoio e amizade.

À técnica Ilza, do laboratório de citologia e embriologia, pela amizade e apoio.

Ao meu namorado, Felipe Machado Calil Elias, pela paciência, compreensão para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias por possibilitar a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

BERNARDO, Aline Rodrigues. **Efeito da piperina sobre células B murinas e no modelo Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) induzido por pristane em camundongos BALB/c.** 2013. 83 p. Tese (Doutorado em Ciências, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Os linfócitos B estão envolvidos na resposta imune humoral e têm capacidade de se diferenciar em células plasmáticas produtoras de anticorpos de alta especificidade contra patógenos e em células de memória. No entanto, fatores genéticos, ambientais e hormonais podem ser responsáveis pela desregulação do sistema imune, o qual se torna incapaz de impedir ou eliminar do organismo as células B autorreativas produtoras de autoanticorpos. O papel patogênico da célula B vem recebendo considerável atenção após estabelecimento de tratamentos das doenças autoimunes. A piperina, principal constituinte dos frutos da pimenta preta (*Piper nigrum* Linn.) e da pimenta longa (*P. longum* Linn.), possui diversos efeitos fisiológicos, inclusive sobre as funções imunes em células normais e transformadas, conferindo possibilidades no seu uso terapêutico. O objetivo geral de nosso estudo foi avaliar *in vitro*, a capacidade da piperina em modular a resposta de células B esplênicas purificadas de camundongos da linhagem BALB/c, e *in vivo*, o efeito da piperina sobre o modelo de autoimunidade, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), como também seu efeito sobre a resposta a antígeno timo-dependente e timo-independente. O efeito citotóxico de diferentes concentrações de piperina foi avaliado pelo método de XTT e as concentrações de 15 μM , 3 μM e 1 μM de piperina foram selecionadas para os experimentos *in vitro*. Verificamos que a dose 15 μM de piperina foi capaz de inibir a proliferação das células B esplênicas purificadas, pelas vias TLR4 e BCR, a secreção de IgM, pela via BCR e a expressão da molécula co-estimulatória CD86, pelas vias TLR4 e BCR. A dose 3 μM de piperina, foi capaz de inibir apenas a expressão da molécula co-estimulatória CD86. Na avaliação da piperina sobre o modelo LES observamos que as doses de piperina (2,25mg/Kg e 4,5mg/Kg) não impediram o desenvolvimento de sinais característicos da doença como, formação de lipogranulomas, edema articular, deposição de imunocomplexo nos glomérulos renais e esplenomegalia. Apenas a dose 4,5mg/Kg de piperina reduziu a proteinúria dos animais no modelo LES. Na resposta a antígenos Timo-dependente e Timo-independente a piperina (2,25mg/Kg e 4,5mg/Kg) não afetou os níveis de IgG séricos aos 14^o e 21^o dias e os níveis séricos de IgM aos 7^o e 14^o dias, respectivamente. Com base nesses resultados, podemos concluir que a piperina modulou apenas as células B murinas *in vitro*, não tendo efeito sobre o desenvolvimento do LES.

Palavras-chave: Linfócito B, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Piperina.

ABSTRACT

BERNARDO, Aline Rodrigues. **Effect of piperine on murine B cells and model Systemic Lupus Erythematosus (SLE) induced by pristane in BALB/c.** 2013. 83 p. Thesis (Doctor of Science, Animal Health). Institute of Veterinary, Department of Veterinary Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The B lymphocytes are involved in humoral immune response. They have the capacity to differentiate into plasma cells producing of antibodies with high specificity against pathogens and in memory cells. However, genetic, environmental and hormonal factors may be responsible by dysregulation for the immune system, which becomes unable to prevent or eliminate the body's auto-reactive B cells producing autoantibodies. The pathogenic role of B cells has received considerable attention after establishing treatment of autoimmune diseases. Piperine, the main constituent of the fruit of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) and long pepper (*P. longum* Linn.) has various physiological effects, including on immune function in normal and transformed cells, giving possibilities in its therapeutic use. The overall goal of our study was to evaluate *in vitro* the ability of piperine in modulating the response of purified splenic B cells from mice of BALB/c mice, and *in vivo*, the effect of piperine on the model of autoimmunity, Systemic Lupus Erythematosus (SLE), as well as its effect on the response to thymus-dependent and thymus-independent antigens. The cytotoxic effect of different concentrations of the piperine was evaluated by XTT method and the concentrations of 15 μ M, 3 μ M and 1 μ M of piperine were selected to the experiments *in vitro*. We found that 15 μ M dose of piperine was able to inhibit proliferation of splenic B cells purified by route BCR and TLR4, the secretion of IgM by route BCR and expression of co-stimulatory molecule CD86 by route TLR4 and BCR. The dose of piperine 3 μ M was only able to inhibit the expression of co-stimulatory molecule CD86. In the evaluation of piperine on the model SLE observed that doses of piperine (2.25mg/kg and 4.5mg/kg) did not prevent development of the typical signs of the disease as lipogranulomas formation, joint swelling, immune complex deposition in the glomerulus kidney and splenomegaly. Only the dose 4.5mg/kg of piperine reduced proteinuria of animals at the SLE. In response to thymus-dependent antigens and thymus-independent piperine (2.25mg/kg and 4.5 mg/kg) did not affect the levels of serum IgG at 14th and 21th days and the serum levels of IgM to 7th and 14th days, respectively. Based on these results, we can conclude only that piperine modulates murine B cells *in vitro*, with no effect on the development of SLE.

Keywords: B-Lymphocyte, Systemic Lupus Erythematosus, Piperine.

TABELAS

Tabela 1. Lesões histopatológicas observadas no modelo LES induzido por pristane.. 43

FIGURAS

Figura 1. Visão global do desenvolvimento das células B.....	2
Figura 2. Receptor de antígeno dos linfócitos B (BCR).....	6
Figura 3. Sinalização da célula B.	8
Figura 4. Via de sinalização de PI-3K.....	9
Figura 5. Papel do receptor TLR na função da célula B.	10
Figura 6. Sinalização via receptor TLR.....	12
Figura 7. Potenciais alvos e relevantes drogas na terapia de LES.....	17
Figura 8. Fórmula química da piperina.	18
Figura 9. Efeito da piperina sobre a viabilidade das células A20 e dos esplenócitos totais por XTT.	28
Figura 10. Efeito da piperina sobre a proliferação das células B policlonais ativadas.	29
Figura 11. Efeito da piperina sobre a capacidade dos linfócitos B esplênicos em secretar IgM.	30
Figura 12. Efeito da piperina sobre a expressão da molécula co-estimulatória CD86 em células B esplênicas.	31
Figura 13. Efeito da piperina sobre o ganho de peso no modelo LES induzido por pristane.	32
Figura 14. Efeito da piperina sobre o edema articular das patas no modelo LES induzido por pristane.	33
Figura 15. Efeito da piperina sobre o edema na articulação da região do metatarso no modelo LES induzido por pristane.	35
Figura 16. Efeito da piperina sobre os lipogranuloma da cavidade peritoneal no modelo de LES induzido por pristane.....	37
Figura 17. Efeito da piperina sobre o tamanho e peso do baço no modelo LES induzido por pristane	38
Figura 18. Efeito da piperina sobre as células sanguíneas no modelo LES induzido por pristane.	41
Figura 19. Efeito da piperina sobre a proteinúria no modelo de LES induzido por pristane.	42
Figura 20. Efeito da piperina sobre a deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais no modelo LES induzido por pristane.....	45
Figura 21. Efeito da piperina sobre a resposta Timo-independente.....	46
Figura 22 Efeito da piperina sobre a resposta timo-dependente.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	LINFÓCITOS B	2
2.1.1	ONTOGÊNESE DOS LINFÓCITOS B.....	2
2.1.2	POPULAÇÕES DE CÉLULAS B	4
2.1.3	ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS B2.....	6
2.1.4	RESPOSTA DA CÉLULA B PARA ANTÍGENOS	13
2.2	DOENÇAS AUTOIMUNES	14
2.2.1	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	14
2.3	PRODUTOS NATURAIS	17
2.3.1	PIPERINA	18
3	MATERIAIS E MÉTODO.....	22
3.1	PURIFICAÇÃO DA PIPERINA.....	22
3.2	ANIMAIS	22
3.3	ENSAIO IN VITRO	22
3.3.1	LINHAGEM CELULAR	22
3.3.2	ATIVIDADE CITOTÓXICA DA PIPERINA PARA CÉLULA A20 E CÉLULAS ESPLÊNICAS EM CULTURA	22
3.3.3	PURIFICAÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS B	23
3.3.4	PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS B.....	23
3.3.5	NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINA NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS.....	23
3.3.6	MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS B.....	23
3.4	LUPUS ERITREMATOSO SISTÊMICO INDUZIDO POR PRISTANE.....	24
3.4.1	MODELO EXPERIMENTAL	24
3.4.2	ANÁLISE DE PROTEÍNA NA URINA.....	24
3.4.3	ANÁLISE DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS	24
3.4.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	24
3.4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA	24
3.5	ENSAIO IN VIVO	25
3.5.1	RESPOSTA TIMO INDEPENDENTE.....	25
3.5.2	RESPOSTA TIMO-DEPENDENTE.....	25
3.5.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICO.....	26
3.6	ANÁLISES ESTASTÍTICAS	26
4	RESULTADOS	27
4.1	AVALIAR O EFEITO CITOTÓXICO DA PIPERINA SOBRE A LINHAGEM DE CÉLULA A20 E CÉLULAS ESPLÊNCAS.....	27
4.2	EFEITO DA PIPERINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DOS LINFÓCITOS B ESTIMULADOS VIA RECEPTOR TLR E BCR.	29
4.3	EFEITO DA PIPERINA SOBRE A CAPACIDADE DOS LINFÓCITOS B ESPLÊNCOS EM SECRETAR ANTICORPOS IgM QUANDO ESTIMULADOS PELA VIA TLR4.	30
4.4	EFEITO DA PIPERINA SOBRE A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD86 EM LINFÓCITOS B ESPLÊNICO.....	31
4.5	AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.....	32
4.6	AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR DAS PATAS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.....	33

4.7 AVALIAÇÃO VISUAL DAS PATAS MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.....	34
4.8 AVALIAÇÃO DOS LIPOGRANULOMAS PERITONEAL NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.....	36
4.9 AVALIAÇÃO NO TAMANHO E PESO DO BAÇO NO MODELO lês INDUZIDO POR PRISTANE.....	38
4.10 ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.....	39
4.11 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNURIA NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.....	42
4.12 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS RINS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.....	43
4.13 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS RINS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.....	44
4.14 EFEITO DA PIPERINA SOBRE A RESPOSTA TIMO-INDEPENDENTE.....	46
4.15 EFEITO DA PIPERINA SOBRE A RESPOSTA TIMO-DEPENDENTE.....	47
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Os linfócitos B, oriundos da medula óssea a partir de seus precursores linfóides, são capazes de se diferenciarem em células plasmáticas produtoras de anticorpos. A qualidade e quantidade de anticorpos que circulam no organismo são o resultado final de um sistema altamente elaborado: o sistema imune humoral. O linfócito B é a célula central desse sistema e seu papel é crítico para a resposta imune adaptativa contra agentes patogênicos. A função efetora dessa linhagem celular é a produção de anticorpos antígeno-específico, mediada pela geração de células plasmáticas, sustentada pela persistência de seus precursores de vida longa (células B de memória). Todavia, a célula B tem um papel chave no desenvolvimento e na manutenção de muitas doenças autoimunes, através da produção de autoanticorpos. Esse papel patogênico da célula B vem recebendo considerável atenção após estabelecimento de tratamentos das doenças autoimunes tendo como alvo essas células. Os resultados obtidos por esses estudos reforçam a importância das células B na patogênese de diversas doenças como artrite reumatóide, esclerose múltipla, diabetes mellitus tipo 1 e lúpus eritematoso sistêmico (LES).

Estudos envolvendo substâncias naturais como curcumina, warafteína e resveratrol, têm demonstrado a capacidade desses componentes bioativos em modular a resposta dos linfócitos B, suprimindo sua ativação e a produção de imunoglobulinas. Piperina é um alcalóide facilmente extraído e purificado dos frutos secos da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e compartilha com a curcumina diversas atividades farmacológicas, como atividade antioxidante, antiinflamatória e anticancerígena, amplamente reconhecidas na literatura científica. Além disso, a piperina desempenha diversas funções imunes em células normais e transformadas, conferindo possibilidades no seu uso terapêutico; porém, não existe na literatura nenhum estudo sobre a ação da piperina sobre linfócitos B purificados.

O objetivo geral de nosso estudo foi avaliar a capacidade da piperina em modular a resposta de células B de camundongos da linhagem BALB/c, tanto em células B purificada quanto em um modelo de autoimunidade, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), como também seu efeito sobre as respostas a antígeno timo-dependente e timo-independente.

No intuito de alcançar tal objetivo, traçamos as seguintes metas:

- Analisar a citotoxicidade de diferentes doses de piperina sobre células A20 e células esplênicas;
- Avaliar a capacidade de proliferação dos linfócitos B esplênicos, com diferentes doses de piperina, na presença ou não de LPS ou de α -IgM;
- Avaliar os níveis de imunoglobulina M no sobrenadante de cultura de linfócitos B esplênicos, com diferentes doses de piperina, na presença ou não de LPS;
- Avaliar a expressão da molécula co-estimulatória CD86, com diferentes doses de piperina, na presença ou não de LPS ou de α -IgM;
- Avaliar o efeito da piperina no modelo de Lupus Eritematoso Sistêmico induzido por pristane em camundongos BALB/c através da formação e deposição de imunocomplexos, do desenvolvimento dos lipogranulomas, da glomerulonefrite e da artrite;
- Avaliar os títulos de anticorpos circulantes anti TNP-Ficoll em camundongos tratados com piperina e inoculados com TNP-Ficoll;
- Avaliar os títulos de anticorpos circulantes anti-SRBC em camundongos tratados com piperina e inoculados com SRBC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LINFÓCITOS B

2.1.1 ONTOGÊNESE DOS LINFÓCITOS B

Os linfócitos B são células originadas na medula óssea, ambiente adequado onde seus precursores têm uma estreita interação com as células do estroma, passando por uma sequência de estágios intermediários para reorganização gênica e formação de seu receptor para antígeno (BCR). Através de um processo independente de antígeno, são gerados linfócitos B com BCRs de diferentes especificidades. Em camundongo e humanos, a diversidade do repertório dos BCRs resulta do rearranjo ordenado de segmentos gênicos V, D e J do locus da cadeia pesada e dos segmentos gênicos V e J do locus da cadeia leve da imunoglobulina. Esse processo é dirigido pela ativação de genes de recombinação linfóide-específicos (RAG) (SCHATZ; OETTINGER; BALTIMORE, 1989).

A figura 1 mostra uma visão geral do desenvolvimento dos linfócitos B. De um modo geral, o locus da cadeia pesada da imunoglobulina das células pré-BI passam pelo processo de recombinação gênica, resultando na produção da cadeia pesada μ . Em seguida, ocorre associação dessa cadeia pesada μ com uma cadeia substituta invariante, gerando a expressão de um pré-BCR e iniciando a transição para o estágio pré-BII. Com a transformação dos genes que codificam a cadeia substituta invariante, as células param o ciclo celular, enquanto o loci da cadeia leve das células pré-BII são recombinados. A expressão de uma cadeia leve de isotipo κ ou λ leva a sua montagem com a cadeia pesada pré-existente e a expressão do BCR. Tal fato, provoca a transição para o estágio de célula B imatura, que expressam IgM monomérica na sua superfície celular, juntamente com $Ig\alpha/Ig\beta$, formando um BCR capaz de sinalizar o encontro com o antígeno (YOUINOU, 2007; CERUTTI; PUGA; COLS, 2012; ALMQVIST; MARTENSSON, 2012).

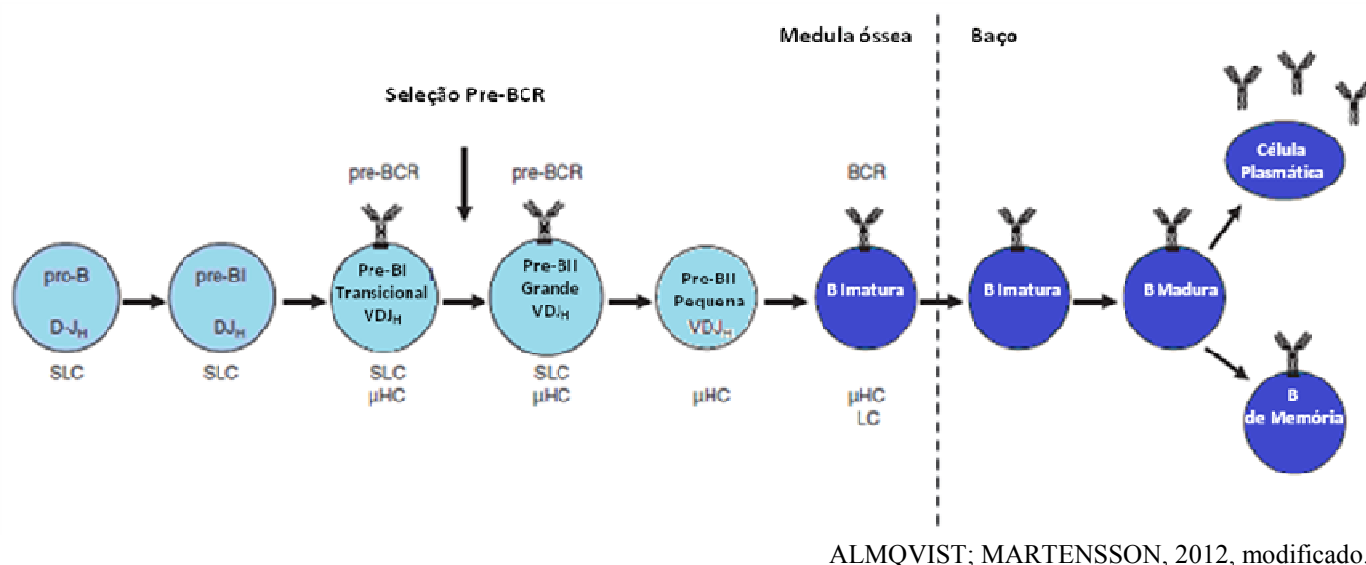


Figura 1. Visão global do desenvolvimento das células B. Em adultos, o desenvolvimento das células B acontece na medula óssea e depois disso, as células B imaturas migram para o baço, onde a maturação é finalizada. A diferença dos estágios é definida pelo status de recombinação do locus HC e LC.

Nesse estágio, células B autorreativas são sujeitas a seleção negativa através do processo de edição de receptores ou anergia para certificar um repertório relativamente livre de células B autorreativas funcionais, caso isso não ocorra, as células autorreativas sofrem deleção. Em torno de 2×10^7 células B BCR⁺ (IgM⁺), diariamente desenvolvidas na medula óssea de camundongo, somente 10% existem na periferia. Dessas, cerca de 1/3 progridem para o “pool” de células B maduras nos órgãos linfoides periféricos (CHUNG et al., 2003).

Os linfócitos B imaturos migram para os órgãos linfoides secundários como células B transicionais (Bt), e sua maturação depende de seu contato com antígeno específico. As células Bt possuem características fenotípicas chave, como níveis mais elevados de IgM, e níveis mais baixos de CD22 e B220, quando comparados com células B maduras (CHUNG et al., 2002). A estimulação do BCR de células Bt leva a um estado de anergia ou à morte celular, ao contrário da estimulação do BCR de uma célula B madura, que envolve ativação e proliferação celular (CHUNG; SILVERMAN; MONROE, 2003). Essas células Bt anérgicas podem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças autoimunes, já que elas não são eliminadas e nem reeditadas, permanecendo na periferia em estado não responsivo a antígenos e que em algum momento podem escapar do estado de anergia tornando-se células B autorreativas (MERRELL et al., 2006).

LODER et al. (1999) propuseram a separação das células Bt em duas subpopulações, T1 e T2, baseados em seu fenótipo e características funcionais. Algumas diferenças existem no número de subgrupos e nas características funcionais da população T2. Células Bt T1 são IgM^{high} IgD⁻ CD21⁻ CD23⁻ e células T2 são IgM^{high} IgD⁺ CD21⁺ CD23⁺. ALLMAN et al. (2001), utilizando anticorpos monoclonais AA4, descreveram a terceira população não proliferativa (T3), fenotipicamente parecida com a população T2, com exceção da baixa expressão dos níveis de IgM na superfície celular.

Quando deixam a medula óssea, as células Bt entram na circulação sanguínea periférica e, no baço, sua circulação aberta leva essas células à polpa vermelha do órgão, através dos ramos terminal das arteríolas centrais. Da polpa vermelha, essas células penetram nos sinusóides da zona marginal para alcançar a zona externa da bainha linfóide periarteriolar (BLPA) (LIN; ZHU; SCHARFF, 1997). As células Bt são excluídas dos linfonodos, sendo a falta de expressão de CD62L ou de fibronectina no tecido linfóide a causa dessa exclusão (LODER et al., 1999; FLAISHON et al., 2000). No baço, as células Bt diferem na sua localização: células T1, além de presentes nos sinusóides da medula óssea, aparecem no limite externo da BLPA; células T2 e T3 migram para os folículos de células B (CHUNG et al., 2002; LODER et al., 1999; SCHIEMANN et al., 2001). Essa migração é dependente da expressão do receptor para a quimiocina CXCR5, presentes na superfície da maioria dos linfócitos B maduros e tem importante papel no direcionamento das células B para o folículo esplênico. Tal receptor tem baixa expressão na superfície de células Bt T1 (GOODNOW et al., 2010).

O meio extramedular representa o sítio de deleção por apoptose das células B imaturas autorreativas e, acredita-se que o baço possa representar o caminho ideal para a maturação das células Bt. Os macrófagos dos sinusóides da polpa vermelha estão estrategicamente situados para o rápido engolfamento dos linfócitos mortos, bem como dos eritrócitos velhos e plaquetas esgotadas. Todavia, experimentos com camundongos esplenectomizados revelaram um pool de células B maduras normal, sugerindo que o baço, apesar de ser o sítio preferencial da maturação das células Bt, não é necessariamente requerido para o desenvolvimento das células B periféricas (WARDEMANN et al., 2002). A possibilidade de existir um tecido esplênico ectópico para suportar os finais de maturação das células B ainda não foi evidenciada.

Existem diferenças funcionais chaves na sinalização mediada pelo BCR quando células Bt vão para o estágio maduro. Enquanto as células B maduras respondem para o cross-

linking do BCR com o aumento da hidrólise do fosfatidilinositol 4.5 bifosfato [PtdIns(4.5)P₂] e elevação do nível de cálcio intracelular, as células B imaturas aumentam o nível de cálcio intracelular sem a hidrólise do PtdIns(4.5)P₂ (YELLEN et al., 1991). A diferença na hidrólise do PtdIns(4.5)P₂ pode refletir diferenças na organização do complexo de sinalização supramolecular que se forma em resposta a ligação do antígeno ao receptor. Células B maduras co-polarizam o BCR com balsas lipídicas, local preferencial da PtdIns(4.5)P₂, acompanhando a agregação do BCR. Já células B tratadas com anti-BCR promovem a agregação do BCR sem a co-polarização com as balsas lipídicas (CHUNG; BAUMEISTER; MONROE, 2001). Outra diferença entre células maduras e imaturas é que a última não aumenta a expressão da molécula co-estimulatória CD86 quando o BCR é estimulado (CHUNG et al., 2002; MARSHALL-CLARKE; TASKER; PARKHOUSE, 2000).

Além da interação antígeno-específico, sinais acessórios cooperam positivamente ou negativamente com o BCR e tem um papel crítico no desenvolvimento e diferenciação da célula B. A citocina BAFF (fator de ativação do linfócito B), pertencente à superfamília TNF, é produzido e secretado por diferentes tipos celulares e considerado um fator crítico para o desenvolvimento da célula B; sua ligação ao receptor BAFF fornece sinais constitutivos necessários para sobrevivência, especialmente no estágio T2, e também são requeridos para a maturação da célula B. Outro sinal acessório importante é o do receptor semelhante ao Toll 4 (TLR4) que pode estimular efetivamente a maturação dos linfócitos B independentemente ou complementando a via fisiológica de BAFF (HAYASHI, 2010; LIED; BERSTED, 2010).

Aparentemente, os linfócitos T auxiliares também são importantes no processo de amadurecimento das células B. Estudos com células B T2 purificadas mostraram que na presença de LT auxiliares, as células T2 sobrevivem e proliferam, enquanto que na ausência de LT auxiliares são induzidas a apoptose. Sinais de LT auxiliares, como IL-4 e CD40, são estímulos essenciais quando a célula B ganha acesso aos compartimentos periféricos ricos em antígenos e células T ativadas (CHUNG; SILVERMAN; MONROE, 2003).

2.1.2 POPULAÇÕES DE CÉLULAS B

As células B periféricas efetoras apresentam distintas características funcionais, topográfica e fenotípica, sendo subdivididas em células B1 (B-1a e B-1b) e células B2 (células B foliculares, células B da zona marginal e B regulatória).

A célula B1 foi descrita primeiramente na década de 80 a partir da pesquisa de células B normais que expressassem a molécula CD5 presente em células B tumorais referidas como Ly-1. As células B CD5⁺, secretoras de IgM de forma espontânea foram encontradas em pequeno número no baço e apenas em estudos posteriores puderam constatar que a célula B1 era a principal população de célula B da cavidade peritoneal e da cavidade pleural em camundongos e raras nos nódulos linfóides (MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2012). A descoberta da origem dessa célula tem sido controverso, no entanto dois modelos são utilizados para explicar o seu desenvolvimento. A hipótese da “diferenciação induzida”, que propõe que um precursor comum possa dar origem a célula B1 ou B2 de acordo com os sinais específicos recebidos durante o desenvolvimento e seleção, e a hipótese da “linhagem” em que as células B1 e B2 desenvolvem de distintos precursores de célula B. Esta última hipótese foi comprovada por Kantor et al., 1992 pela reconstituição apenas das células B1 em fígado fetal de recipientes irradiados e por Solvason; Kearney, 1991 que provaram que omento fetal seja uma fonte seletiva de células B1 (DORSHKIND; MONTECINO-RODRIGUEZ, 2007; MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2012).

A grande produção da célula B1 ocorre no fígado fetal através da sua célula progenitora (Lin⁻CD45R^{-lo}CD19⁺) ainda na fase embrionária e durante a primeira semana de nascimento

tendo como característica fenotípicas as moléculas de superfície $sIgM^{hi}sIgD^{lo}CD11b^{+}$, no entanto essas células podem ser subdivididas através da expressão de CD5 em população celular B-1a ($CD5^{+}$) e B-1b ($CD5^{-}$). Já na medula óssea esta produção é quase nula e isto é compensado pela capacidade de autorrenovação das células B1 que sustenta uma população estável ao longo tempo (MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2012).

Em relação às funções apresentadas pelas células B1 tem sido visto que elas são capazes de secretar anticorpos naturais o qual protege de choque endotóxico e melhora a peritonite bacteriana; de produzir anticorpos autorreativo que parece estar relacionados com a proteção precoce de organismos pré-imunizados; de contribuir para a geração da resposta antígeno timo independente do tipo 2 juntamente com as células B da zona marginal; de funcionar como a primeira defesa imune da mucosa intestinal e do trato respiratório por migrarem da cavidade peritoneal para o baço ou mucosa em resposta a um estímulo (IL5, IL10 e antagonistas de TLR) com produção de anticorpos IgM (B-1a) e IgA (B-1b). Além disso, podem desenvolver capacidade fagocítica e participar na apresentação de antígenos (GAO et al., 2012, BAUMGARTH, 2011, HASTINGS et al., 2006).

As células B foliculares (FO) expressam em sua superfície as moléculas $IgM^{+}IgD^{hi}CD21^{inter}CD23^{hi}$ e localizam-se na região folicular dos órgãos linfoides secundários; constituem o maior número de células B periféricas e possuem capacidade de recirculação através do sangue, linfa e órgãos linfoides secundários (baço, nódulos linfóides e placa de Payer). A região folicular dos órgãos linfoides secundários é o local em que essas células fazem a apresentação dos antígenos timo-dependente às células T cognatas ativadas, possibilitando sua diferenciação em células plasmáticas produtoras de anticorpos de alta afinidade, ou em células de memória em resposta a estes antígenos proteicos (KANAYAMA; CASCALHO; OHMORI, 2005).

Já as células B da zona marginal, expressam em sua superfície as moléculas $IgM^{hi}IgD^{low}CD21^{hi}CD23^{low/-}$. Tais células representam apenas 5% das células esplênicas, possuem uma reduzida capacidade de recirculação e localizam-se na zona marginal do baço em torno dos seios marginais, o que facilita a sua interação com patógenos oriundos da circulação sanguínea. Essa população é considerada a 1º linha de defesa das células B contra os patógenos bacterianos por exibir um estado pré-ativado e se diferenciar rapidamente em células secretoras de anticorpos de baixa afinidade na resposta timo-independente do tipo 2 (CAREY et al., 2008). Além disso, elas podem estar envolvidas na resposta de anticorpos timo dependente, pois são capazes de transportar o antígeno por complexos imunes para dentro do folículo esplênico. Em estudos *in vitro* e *in vivo* foi demonstrado sua maior eficiência em relação às células B foliculares na apresentação do antígeno as células T $CD4^{+}$ por sua alta expressão das moléculas MHC-II, B7-1 e B7-2, e posterior indução da expansão clonal das células T antígeno-específico (ALLMAN; PILLAI, 2008; ZOUALI; RICHARD, 2011). As células B da zona marginal também apresentam alta expressão de CD1d que pode potencialmente estar envolvido na apresentação de antígenos lipídicos para as célula T Natural Killer (NKT) que ativará as células B da zona marginal via interação CD40L-CD40 e ordenar a indução rápida de mudança de classe para a resposta de anticorpos (ALLMAN; PILLAI, 2008).

As células B regulatórias (Breg), outra população de célula B, em que sua diferenciação acredita-se ocorrer na fase transicional 2 pelo tipo de estímulo existente no microambiente, expressam em sua membrana as moléculas $IgM^{hi} IgD^{+} CD21^{hi} CD23^{+} CD19^{+} CD25^{hi} CD1d^{hi} CD5^{+}$ (KESSEL et al., 2012). Este conceito foi introduzido por Bhan e Mizoguchi onde viram que a colite era minimizada pela remoção de células apoptóticas favorecidas pelos autoanticorpos produzidos pela Breg, e, em outros experimentos, o processo inflamatório era reduzido devido à liberação de IL-10 pela mesma (MIZOGUCHI et al., 1997).

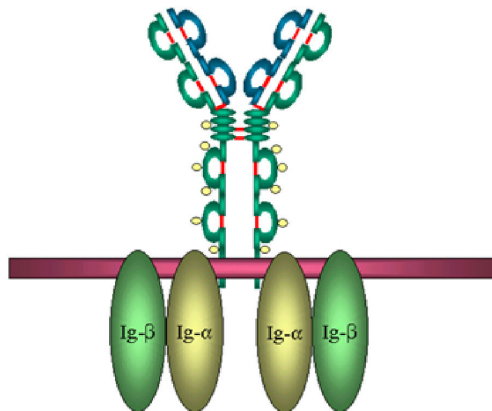
Essas células Breg têm habilidade de liberar citocinas IL-10 e TGF- β pela ligação simultânea do antígeno com o BCR e do receptor CD40 ao CD40L do linfócito T autorreativo. Estas citocinas suprimem a ativação e diferenciação de células TCD4⁺ e TCD8⁺, Natural Killer (NK), inibe resposta Th1 e ativação de células dendríticas, induz as células Treg e removem células apoptóticas opsonizadas pela liberação de anticorpos autorreativos. Essas células promovem respostas imunes protetoras em autoimunidade, transplantes, infecções e câncer (MAURI; EHRENSTEIN, 2008).

2.1.3 ATIVACÃO DAS CÉLULAS B2

2.1.3.1 VIA RECEPTOR BCR

A ativação das células B pelo receptor BCR é iniciada normalmente pela ligação cruzada de antígenos proteicos e glicoproteicos a imunoglobulina de membrana (Igm) dos linfócitos B com a participação indispensável das células T auxiliares para uma resposta humoral adaptativa eficiente, conhecida como antígeno timo-dependente. (BONILLA; HANS; OETTGEN, 2010).

O receptor BCR (figura 2) é um complexo proteico existente na superfície das células B maduras, constituído por isotipos de imunoglobulinas (IgM ou IgD) ligadas à membrana e que está associado com o heterodímero I α (CD79a) e I β (CD79b) por ponte dissulfídrica (CARRASCO; BATISTA, 2006).



<http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/igstruct2000.htm>

Figura 2. Receptor de antígeno dos linfócitos B (BCR)

A interação antígeno-BCR, postulado como primeiro sinal de ativação, além de induzir a sinalização transmembrana promove a internalização do antígeno. Esta internalização é feita por endocitose mediada por receptor para um compartimento endossomal ou lisossomal que processará o antígeno em peptídeos e os associará às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC II), formando o complexo peptídeo-MHC II que posteriormente serão expressos na membrana para sua apresentação ao linfócito T (STODDART et al.; 2002). Além disso, esta etapa garante o crescimento, proliferação e sobrevivência das células B e a expressão da molécula co-estimulatória CD86 necessária para a ativação das células T (RODRÍGUEZ-PINTO, 2005).

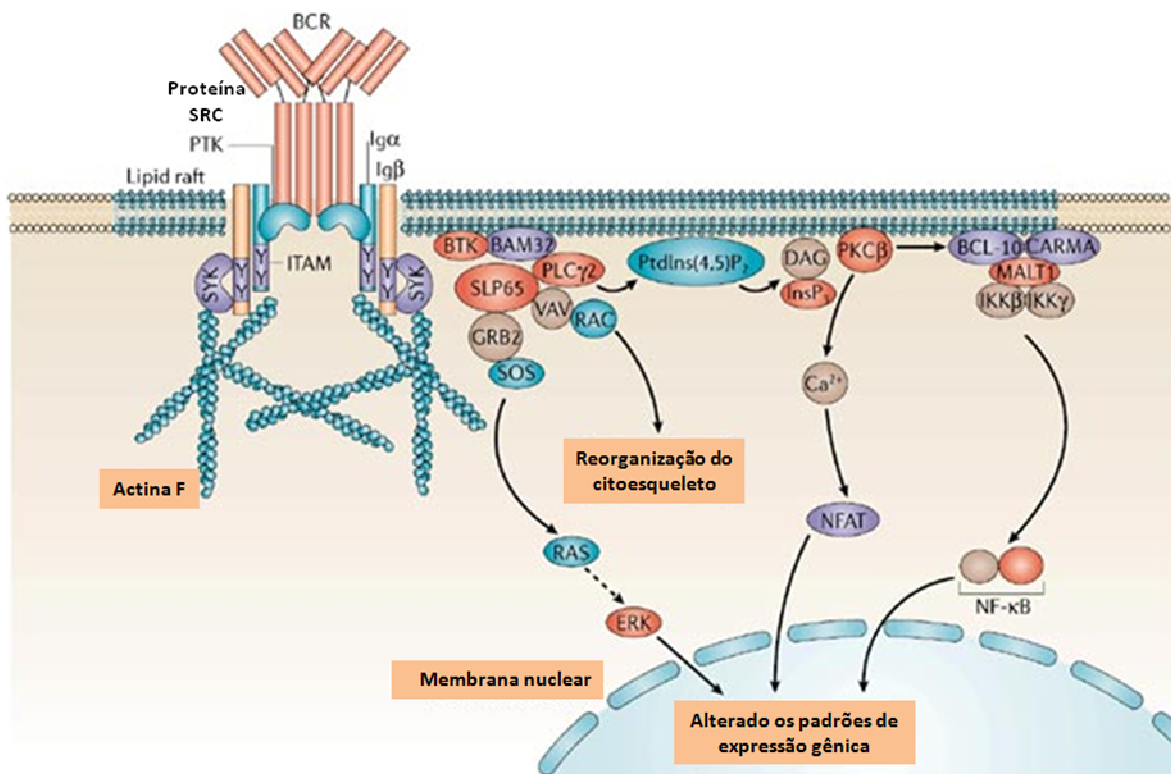
Os linfócitos T reconhecendo os peptídeos expressos na membrana da célula B pelo MHC II ativam-se e passam a liberar citocinas direcionadas aos linfócitos B e a expressarem

em sua membrana a molécula CD154 (ligante de CD40) que irá se ligar a molécula CD40 fornecendo sinais essenciais para a ativação das células B (CLATZA et al.; 2003). Este segundo sinal de ativação (CD40-CD154) gera mudanças na expressão gênica para sustentar a ativação das células B, proliferação e diferenciação em células secretoras de anticorpos e em células de memória, mudanças de isotipo, aprimoramento no processamento do antígeno, aumento da expressão de MHC II, estabilização da expressão de CD86 (B7.2) e indução da expressão de CD80 (B7.1) outra molécula co-estimulatória (RODRÍGUEZ-PINTO, 2005).

2.1.3.2 SINALIZAÇÃO VIA RECEPTOR BCR

Os sinais intracelulares obrigatórios para o desenvolvimento, ativação, proliferação e diferenciação das células B e até mesmo para a regulação do sistema imune podem ser gerados pelo complexo BCR através do domínio citoplasmático contendo o padrão de ativação baseado em imunorreceptores (ITAM) presentes no heterodímero Iga/Igβ pós-interação do antígeno a imunoglobulina de membrana (Figura 3) (KUROSAKI, 2011). O domínio citoplasmático dos ITAMs possuidores de dois resíduos de tirosina após o estímulo do receptor BCR são fosforilados pela família Src quinase que compreende as tirosinas quinases Lyn, Fyn ou Blk. Os ITAMs fosforilados tornam-se capazes de recrutar a tirosina quinase Syk e ativá-las sendo estas capazes de ativar diferentes quinases e facilitar o início de diferentes vias de sinalização (DAL PORTO et al.; 2004).

Na via de ativação da fosfolipase C γ (PLC- γ 2) a proteína tirosina quinase Syk ativada recruta rapidamente para o complexo de sinalização a molécula adaptadora BLNK (SLP-65) que fosforilada recruta PLC- γ 2 e Btk (tirosina quinase da família TEC) (SCHARENBERG; HUMPHRIES; RAWLINGS, 2007). A PLC- γ 2 ativada produz diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) a partir da hidrólise do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP₂). O inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) é responsável pela ativação do fator de transcrição N-FAT (fator nuclear de célula T ativada) através enzima calcineurina que é defosforilada pelo aumento de Ca⁺² intracitoplasmático decorrente da abertura de canais de Ca⁺² presentes na membrana do retículo endoplasmático e na membrana citoplasmática pela ligação do IP₃ a receptores de IP₃ (SCUPOLI; PIZZOLO, 2012). Já o diacilglicerol (DAG) promove ativação tanto do fator de transcrição NF- κ B pela via de sinalização da proteína quinase C (PKC) quanto do fator de transcrição AP-1 pela via de sinalização MAPquinase (MAPK). Na via de sinalização da MAPK o DAG ao se ligar a proteína trocadora de nucleotídeo (GEF) a fosforila tornando-se capaz de ativar o Ras (proteína G) e esta ativar uma cascata de MAPquinasas (enzimas citoplasmáticas Raf/MEK /ERK) que resultará na formação do regulador de transcrição, AP-1 (OH-HORA et al., 2003). Na via de sinalização da PKC, o DAG em combinação com Ca⁺² ativa o PKC e este formará um complexo com as moléculas BCL, CARMA e MALT que recrutará e ativará o complexo quinase serina/treonina quinase I κ B (IKK) que é responsável pela ubiquitinação de I κ B e conseqüentemente, a ativação do fator de transcrição NF- κ B (SAIJO et al., 2002).



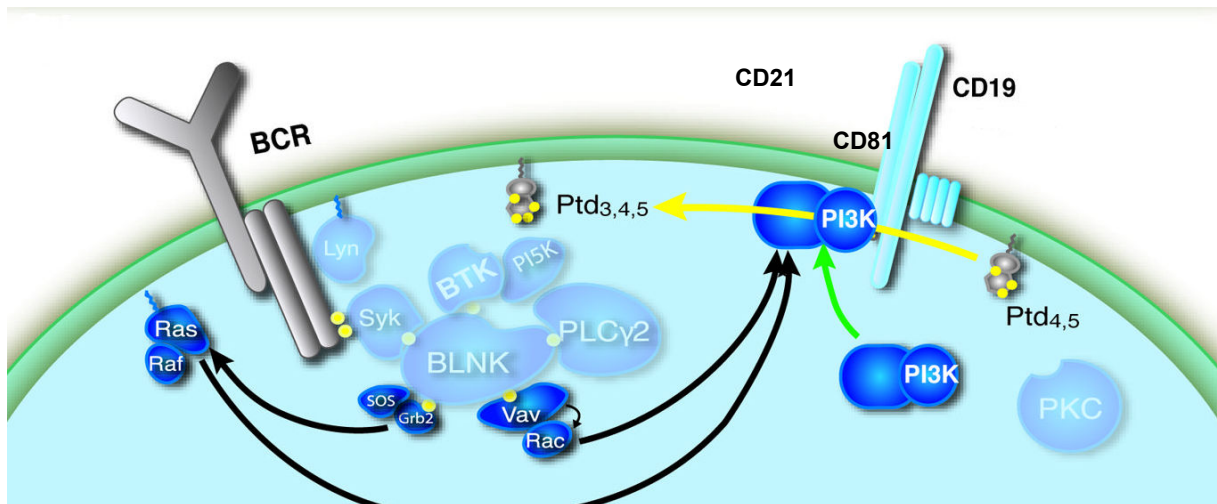
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

MONROE, 2006 modificado.

Figura 3. Sinalização da célula B. A ligação do antígeno ao BCR induz a fosforilação dos resíduos de tirosina presentes nos ITAMs da Igα e Igβ por proteínas quinases da família Src possibilitando o recrutamento e ativação de Syk. O Syk recruta para o complexo de sinalização o BLNK (SLP65) que fosforilado liga-se às moléculas Btk e PLCγ2. A ativação de PLCγ2 cliva o fosfolípido de membrana PtdIns(4,5)P₂ em inositol trifosfato (InsP₃) e diacilglicerol (DAG). O InsP₃ eleva os níveis de Ca⁺² intracitoplasmático ativando o fator de transcrição N-FAT. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) com auxílio do Ca⁺² e a proteína quinase MAPK (MAPK) resultando na ativação de fatores de transcrição NF-κB e AP-1, respectivamente.

Outra importante cascata de sinalização é a via PI-3K, no entanto esta via é mediada por uma glicoproteína transmembrana integral CD19 que faz parte de um complexo proteico trimolecular CD81:CD19:CD21 que são moléculas co-receptoras amplificadoras do sinal BCR. Este complexo fornece assistência no recrutamento de moléculas sinalizadoras Lyn, Syk e Btk que são tirosina quinase, BLNK, Vav, PLCγ2 e PI3K, as quais desencadeiam a mobilização de cálcio intracelular, ativação de proteína quinase C (PKC), MAPK e de fatores de transcrição (BONNILLA; HANS; OETTGEN, 2010).

Antígenos que possuem o fragmento C3d do complemento ligado em sua superfície tornam-se susceptíveis a proteína CD21 (CR2) já que é um receptor com habilidade de reconhecer este fragmento. Após este reconhecimento o antígeno faz ligação cruzada com o complexo CD81:CD19:CD21, agrega-se ao receptor de antígeno da célula B (BCR) e induz a fosforilação da cauda citoplasmática da proteína CD19 (RICKERT, 2005). Esta fosforilação é induzida pela tirosina quinase Lyn que proporciona locais de ligação para a PI-3K e posteriormente a sua ativação por diversas vias paralelas (Figura 4). O PI-3K ativado gera como produto final o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) a partir da fosforilação do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂).



SCHARENBERG; HUMPHRIES; RAWLINGS, 2007, modificado

Figura 4. Via de sinalização de PI-3K. A ativação das moléculas Grb2 e Vav pela molécula adaptadora BLNK promove ativação das moléculas Ras e Rac, respectivamente e estas irão ativar PI-3K que produzirá PIP3 a partir de PIP2 e recrutará mais moléculas PI-3K para a cauda citoplasmática do complexo CD19.

2.1.3.3 VIA RECETOR SEMELHANTE AO TOLL (TLR)

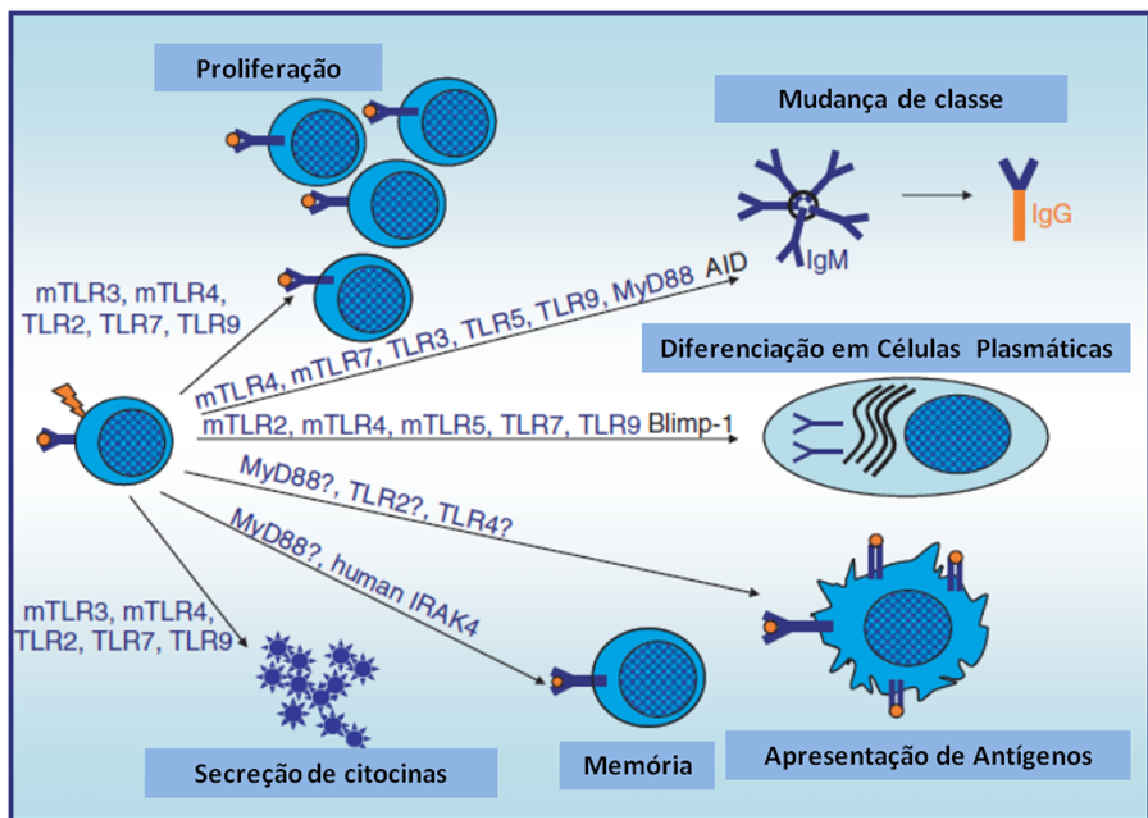
Os receptores TLR são pertencentes à classe dos receptores que reconhecem padrões. Estão envolvidos na imunidade inata com o reconhecimento de padrões moleculares associados ao perigo (DAMP), que são moléculas capazes de sinalizar infecção ou injúria ao organismo ou o reconhecimento de produtos microbianos específicos denominados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP) como exemplo, as lipoproteínas triaciladas (TLR2/TLR1), peptidoglicanos (TLR2), RNA de fita dupla (TLR3), lipopolissacarídeos (TLR4), flagelinas (TLR5), lipoproteínas diaciladas (TLR2/TLR6), RNA de fita simples (TLR7) e DNA CpG (TLR9) (GERONDAKIS; GRUMONT; BANERJEE, 2007; PICCININI; MIDWOOD, 2010).

Este receptor foi primeiramente descrito em *Drosophila melanogaster* com a função de estabelecer a correta polaridade dorso-ventral e o desenvolvimento embrionário. Posteriormente, Charles Janeway e Ruslan Medzhitov identificaram a presença de receptores homólogos ao Toll no genoma humano e denominaram de receptores semelhantes ao Toll (TLR) (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997; CAMPOPIANO, 2010). Até agora, 13 diferentes TLRs foram identificados em mamíferos, sendo 9 destes receptores considerados funcionais e capazes de coordenar as sinalizações da resposta imune inata e adaptativa pela sua expressão em diversos tipos celulares, incluindo monócitos, células fagocíticas, células dendríticas, células T e células B (BOEGLIN et al, 2011; MARRON; YU; CUNNINGHAM-RUNDLES, 2012).

A expressão de TLR nas células B é influenciada por diversos fatores como o “status” de ativação celular, espécie animal e população de células B. Foi observada que as células B humanas virgens expressam baixos níveis de TLRs e apresentam pobre resposta para todos os seus agonistas, sendo necessária a sinalização do BCR ou do CD40 para aumentar a regulação do receptor TLR e possibilitar a ativação celular (BOOTH et al., 2011). Já as células B humanas ativadas e as de memória, passam a expressar níveis significantes de TLR1, TLR6, TLR9 e TLR10 e baixos níveis de TLR2 enquanto as células plasmáticas humanas expressam inúmeros TLRs, incluindo TLR3 e TLR4, importantes para secreção de anticorpos quando estimulados (RUPRECHT; LANZAVECCHIA, 2006; BROWNE, 2012).

Analisando as células B murinas, foi visto que elas expressam constitutivamente TLR2, TLR4 e TLR9, os quais parecem ser essenciais para fisiologia da célula e a maioria das populações de células B murinas (células B1, B foliculares, B da zona marginal e da placa de Payer) expressam com distinta intensidade TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7 e TLR9, porém não expressam TLR8 e TLR10 (RUPRECHT; LANZAVECCHIA, 2006; BROWNE, 2012).

Estes receptores presentes nas células B, após o reconhecimento de seus DAMPs e PAMPs, em experimentos *in vitro*, tornam-se ativados e emitem sinais intracelulares, podendo resultar no aumento de marcadores de ativação, proliferação, secreção de citocinas, diferenciação em células de memória e células plasmáticas, mudança de classe e secreção de anticorpos, como demonstrado na Figura 5 (BEKEREDJIAN-DING; JEGO, 2009; DEFRANCO; ROOKHUIZEN; HOU, 2012).



BEKEREDJIAN-DING; JEGO, 2009, modificado

Figura 5. Papel do receptor TLR na função da célula B. As setas indicam os efeitos comprovado do TLR sobre as células B. TLR murino (mTLR), TLR humano (hTLR), TLR murino e humano (TLR). Marcados com interrogação (?) indicam que as funções não são endereçadas as células B, mas pode ser postuladas baseadas em outro sistema celular ou de estudos de casos clínicos.

2.1.3.4 SINALIZAÇÃO VIA RECEPTOR TLR

O TLR é uma glicoproteína de membrana integral do tipo I constituído por uma região extracelular rica de repetidas leucinas, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático TIR (receptor Toll/IL-1) podendo estar localizados na membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11) ou na membrana endossomal (TLR3, TLR7 e TLR9). Podem apresentar-se na forma de heterodímeros (TLR2/TLR1, TLR2/TLR6, TLR4/MD2) ou de homodímeros (TLR3/TLR3) e sua sinalização inicia com o recrutamento

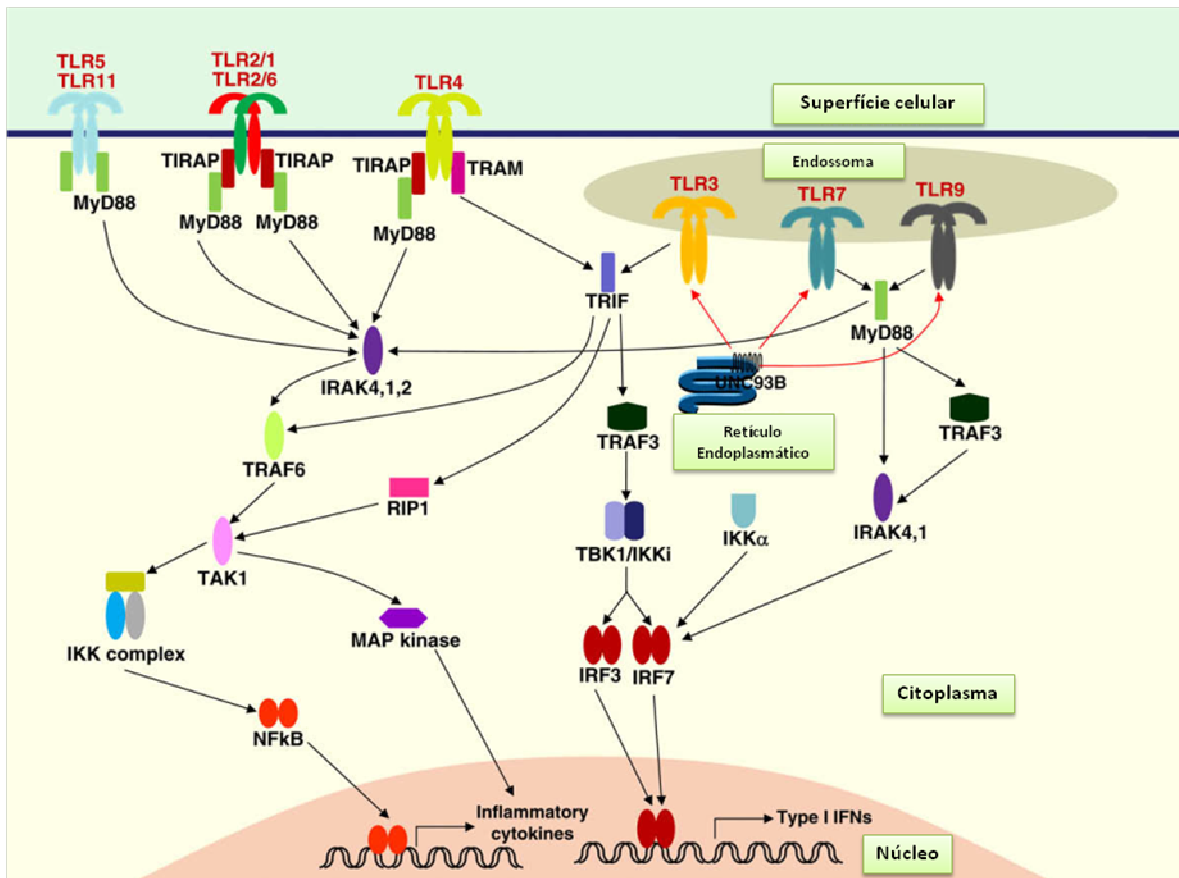
de proteínas adaptadoras contendo o domínio TIR (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM) para o domínio TIR citoplasmático de um TLR ativado por seu correspondente PAMP (CONNOLLY; O'NEILL, 2012).

O recrutamento das proteínas adaptadoras dão início aos eventos de sinalização que culminará na ativação de fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1 e IRF) e a indução da transcrição de citocinas inflamatórias, interferon do tipo I (IFN-I) e quimiocinas (KAGAN; MEDZHITOV, 2006). No entanto, dependendo do receptor TLR estimulado a via de sinalização pode ser dependente de MyD88 ou dependente de TRIF (Figura 6).

Na via de sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88, que incluem todos os receptores TLR com exceção do TLR3, o MyD88 é recrutado diretamente pelo domínio TIR (TLR7, TLR9 e TLR11) ou por intermédio do TIRAP (TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6) que funciona como um ligante entre o domínio TIR do TLR e MyD88. Posteriormente, IRAK 4, IRAK 1 e IRAK 2 são recrutados e ativados por MyD88 tornando-se capazes de ativar TRAF-6 e esta ativar TAK1 que tem por função ativar NF- κ B e AP-1 através do complexo IKK e MAP quinase (MAPK), respectivamente. Os receptores TLR7 e TLR9 também induzem a transcrição de IFN-I pela via dependente de MyD88, no entanto a sequência de sinalização se dá pelo recrutamento e ativação de TRAF3, IRAK 4 e IRAK1 que por conseguinte ativará o fator de transcrição IRF 7 (KAWAI; AKIRA, 2010).

Na via de sinalização dependente de TRIF, representado pelos receptores TLR3 e TLR4, a molécula TRIF pode ser recrutada diretamente ao domínio TIR (TLR3) ou recrutada através da molécula TRAM (TLR4) e ativar NF- κ B por duas vias independentes onde o TRIF ativado interage com TRAF6 ou com RIP1 e ambos irão interagir e ativar TAK1 e este ativar NF- κ B através do complexo IKK. Além da ativação de NF- κ B, a via de sinalização dependente de TRIF também leva a ativação de IRF3 e a transcrição de IFN-I através da ativação de TBK1/IKKi pela molécula adaptadora TRIF (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009).

A ativação desses fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1, ERK, NFAT, IRF-7 e IFN-I) possibilita sua migração do citoplasma para o núcleo. Estes fatores de transcrição no núcleo são capazes de alterar os padrões de expressão gênica induzindo a ativação, proliferação e a diferenciação das células B de acordo com a natureza antigênica.



KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009, modificado

Figura 6. Sinalização via receptor TLR. TLR2 (TLR2 em associação com TLR1 ou TLR6), TLR4, TLR5 e TLR11 estão localizados na superfície da célula para reconhecimento do ligante. TLR3, TLR7 e TLR9 estão localizados no endossoma, os quais são transportados para o endossoma via proteína transportadora UNC-93B, localizada no retículo endoplasmático, para o reconhecimento do ligante no lúmen do endossoma. Todos os TLRs, exceto TLR3, recruta MyD88, enquanto TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 recrutam a molécula adicional TIRAP, que se liga ao domínio TIR com MyD88. TLR3 e TLR4 recruta TRIF. TLR4 requer a molécula adaptadora TRAM, que se liga ao domínio TIR de TLR4 com TRIF. O estímulo com o ligante de TLR1, TLR2, TLR5, TLR6 e TLR11 iniciam a via dependente de MyD88 entretanto, o ligante de TLR3 inicia a via dependente de TRIF. TLR4 ativa ambos, via dependente de MyD88 e a via dependente de TRIF. Na via dependente de MyD88, MyD88 recruta a família de proteínas IRAK e TRAF6. Por sua vez, TRAF6 ativa TAK1. O TAK1 ativado, ativa o complexo IKK, que ativa a subunidade NF-κB. O TAK1 ativado também ativa a via MAPK. Na via dependente de TRIF, TRIF interage com RIP1 e TRAF6. TRAF6 e RIP1 ativados ativa NF-κB e MAPKs. TRIF também interage com TRAF3 e ativa TBK1/IKKi, que ativa IRF3 e IRF7. O TLR7 e TLR9 estimulados por seus ligantes ativam NF-κB e MAPKs pela via dependente de MyD88. Para induzir IFN-1, MyD88 associado com a família de proteínas IRAK1 e IKKα ativa IRF7. IRAK1 também interage com TRAF3 e ativa IRF7. A subunidade de NF-κB e IRFs ativados são translocados para o núcleo. NF-κB e MAPKs iniciam a transcrição de genes de citocinas inflamatórias e IRFs inicia a transcrição para IFN-1.

2.1.4 RESPOSTA DA CÉLULA B PARA ANTÍGENOS

2.1.4.1 RESPOSTA ANTÍGENO TIMO-DEPENDENTE

Durante uma resposta primária timo dependente (TD) as células B virgens que recirculam pelos órgãos linfoides secundários (nódulos linfoides, baço, tecido linfoide associado à mucosa), se localizam em folículos primários na região cortical desses órgãos pela expressão da molécula quimioatrente CXCR5 em sua superfície ao encontrar seu antígeno cognato de natureza proteica ou glicoproteica necessitam da participação das células T CD4⁺ auxiliares para a produção de anticorpos (BONILLA; HANS; OETTGEN, 2010). Esses antígenos ao ligar-se ao receptor BCR da célula B promove uma série de mudanças na expressão gênica que conduz o aumento da expressão de CXCR7. A expressão dessa molécula quimioatrente (CXCR7) promove o deslocamento das células B para a borda da zona de linfócitos T do baço ou para os cordões medulares dos linfonodos, para facilitar a sua interação com o linfócito T CD4⁺ auxiliar cognato (GOODNOW, 2010). Após esta interação, as células B e T começam a proliferar e algumas dessas células migram para a região extrafolicular e outras para o folículo primário. Na região extrafolicular há a formação do foco primário, fase inicial da resposta TD, onde as células B (blastos) proliferam e se diferenciam em plasmoblastos os quais darão origem as células plasmáticas de vida curta que são produtoras dos anticorpos de baixa afinidade contra os antígenos TD (CHAN, et al. 2009). Nos centros germinativos gerados a partir de um folículo primário contendo células B (centroblastos), linfócitos TCD4⁺ auxiliares e células dendríticas foliculares, as células B sofrem hipermutação somática no gene da região variável da imunoglobulina aumentando a sua afinidade e no gene da cadeia pesada possibilitando a mudança do seu isotipo (IgG, IgA ou IgE), direcionada por citocinas. Elas se diferenciam em células plasmáticas de vida longa, produtoras de anticorpos de alta afinidade e células B de memória (CERRUTI; PUGA; COLS, 2012; RANKIN et al., 2011).

2.1.4.2 RESPOSTA ANTÍGENOS TIMO-INDEPENDENTE

Na resposta timo independente (TI) em que incluem os polissacarídeos e os lipopolissacarídeos bacterianos o recrutamento dos linfócitos T auxiliares não é necessário. A resposta TI pode ser dividida em tipo 1 (TI-1) e 2 (TI-2) dependendo do estímulo realizado sobre as células B da zona marginal e as célula B1. Essas células respondem similarmente as células da resposta imune inata, devido suas características de desenvolvimento e função (GRANT et al.,2012; MARTIN; OLIVER; KEARNEY, 2001).

A resposta de anticorpos para antígenos TI-2 é representado por macromoléculas como os polissacarídeos, polímeros sintéticos e conjugados haptenos que são possuidores de estruturas repetidas e organizadas. Esses patógenos são capturados pelas células dendríticas e transportados ao baço para serem apresentadas as células B da zona marginal (BALÁZS et al., 2002). As moléculas antigênicas interagindo com múltiplos receptores de Ig de membrana (Igm) das células B da zona marginal através de ligações cruzadas induzem a emissão do primeiro sinal que ativará as células B não policlonais. No entanto, é necessário um segundo sinal para que as células B migrem para a região da polpa branca entre a zona T e B diferenciando em plasmoblastos e sofrendo expansão exponencial de células produtoras de anticorpos (IgM) no foco extrafolicular, etapa esta dependente de estímulos do receptor TLR ou CD21. Neste tipo de resposta não é normal à formação de centros germinativos, no entanto

a alta densidade de células B específicas para antígenos TI-2 podem gerar um centro germinativo não produtivo e com um curto tempo de vida. (GRANT et al., 2012; BONILLA; HANS; OETTGEN, 2010; ACHTMAN et al., 2009; VOS et al., 2000).

Já o lipopolissacarídeo (LPS), considerado mitógeno de células B e o principal componente da parede celular das bactérias gram negativas, é um antígeno TI do tipo 1 (TI-1). Esta molécula antigênica possibilita a ativação policlonal das células B maduras e imaturas, a partir de sua ligação ao receptor TLR4 ou BCR que irão proliferar e produzir anticorpos (IgM) não específicos (BONILLA; HANS; OETTGEN, 2010). No entanto, se esta ligação ocorrer sinergicamente aos receptores BCR e TLR4, as células B ativadas são capazes de produzir anticorpos específicos IgG (QUINTANA et al., 2008).

2.2 DOENÇAS AUTOIMUNES

O termo autoimunidade refere-se ao estado patogênico em que células imunes respondem contra células e tecidos próprios. Este fato é decorrente de uma falha no processo regulatório do organismo caracterizado pela incapacidade de inibir a ativação e a expansão de células autorreativas na periferia, conduzindo a um amplo espectro de múltiplas e complexas doenças autoimunes (CIPRIANI et al.; 2012). No entanto, Bettelli et al., 2003 constatou que nem sempre a autoimunidade leva a uma doença autoimune. Este fato foi demonstrado com a utilização do autoantígeno do sistema nervoso central, a glicoproteína mielina oligodendrócito (GMO) em camundongos transgênicos (TCR específico para GMO) onde mais de 90% das células T dos animais eram autorreativas, mas menos de 4% dos animais desenvolveram espontaneamente a encefalomielite autoimune experimental.

A patogênese das autoimunidades não é completamente entendida, mas parece que fatores genéticos, ambientais (agentes infecciosos, luz ultravioleta, produtos químicos), comportamentais (tabagismo e dieta), hormonais (estrogênio) e epigenéticos (metilação de DNA, modificação da histona, pequenas transcrições de RNA não codificado) podem estar envolvidos para o início e a progressão das doenças autoimunes (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012; LU, 2013). Esses fatores internos e externos geram um conjunto de distúrbios que podem estar direcionados as células T ou as células B. Quando os distúrbios estão direcionados sobre os linfócitos B, pode ocorrer à permanência de células autorreativas no organismo, produtoras de autoanticorpos que irão se ligar a antígenos teciduais ou formar complexos imunes. Esses autoanticorpos são responsáveis pela patologia de diversas doenças autoimunes como, artrite reumatoide, esclerose múltipla, diabetes mellitus tipo 1 e lúpus eritematoso sistêmico (LES) (PILLAI; MATTOO; CARIAPA, 2011).

2.2./1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O LES é uma doença autoimune sistêmica crônica com distribuição mundial que acomete pessoas de todas as idades, grupos étnicos e ambos os sexos; entretanto 90% das pessoas com LES são mulheres em idade fértil. Esta doença foi reconhecida na idade média pelo médico Rogerius que utilizou a terminologia Lúpus para o eritema malar clássico e em 1872 foi reconhecido sua natureza sistêmica por Moric Kaposi (COJOCARU et al., 2011).

O LES tem como patologia desordens inflamatórias microvasculares multissistêmica pela geração de inúmeros autoanticorpos formadores de imuno-complexos (ICs) que promovem a destruição inflamatória de diversos órgãos (pele, elementos sanguíneos, articulações, rins, serosa, sistema nervoso central e outros tecidos) e a manifestação clínica da doença através de erupções cutâneas, artrite e glomerulonefrite (PUTTERMAN et al., 2012). Alguns desses

autoanticorpos (antinuclear, anti-Rho, anti-La e anti-fosfolipídeos) podem ser utilizados para diagnósticos da doença, já que alguns surgem anos antes das evidências da desregulação imune e outros se tornam evidentes apenas próximo ao surgimento das manifestações clínicas, podendo elevar seus níveis com o curso da doença (anti-Sm, anti-RNA, anti-DNA). Por serem produzidas por células B autorreativas, as células B passaram a ser o papel central do LES mesmo com o envolvimento de outros tipos celulares e de diversas vias celulares (ARBUCKLE et al., 2003).

Algumas categorias de defeitos definidas nos camundongos parecem estar envolvidas nas anormalidades de células B. A maioria das investigações tem focado sobre o aumento da sinalização do BCR como via para a autoimunidade através da redução da expressão das moléculas reguladoras da sinalização (FcγRIIb e SHIP-1) ou pelo aumento da expressão de moléculas que potencializam a sinalização (CD19). A forte redução da sinalização de BCR, também pode causar essas anomalias. Isto tem sido visto na doença agamaglobulinemia ligado-X (XLA) que possui defeito da molécula Btk, um mediador da via de sinalização de BCR, resultando na redução da sinalização das células B e permitindo que células B imaturas, transicionais e virgens autorreativas consigam fugir da seleção negativa (ANOLIK, 2007; YURASOV et al., 2005).

Outro receptor, que pode intensificar o LES é o receptor TLR7 e TLR9, através da ligação cruzada com o BCR específico para fita simples de RNA (ssRNA) e DNA-CpG, respectivamente. Além disso, essas células B autorreativas podem aumentar sua longevidade pela alta expressão de BAFF, um fator de ativação de células, expresso na superfície de inúmeras células ou secretadas na forma de homodímero e que se ligam as células B através de três receptores (BAFF-R, TACI e BCMA). A expressão de BAFF é induzida por citocinas pró-inflamatórias produzidas pela célula B, IFN-γ e antagonista de TLR, como LPS (NASHI; WANG; DIAMOND, 2010).

A citocina IL-10, produzidas pelas células B, também tem apresentado influências sobre a patogênese do LES. Yian et al. (2002) mostrou que ela beneficia o paciente contra o LES, por inibir a produção de citocinas Th1 e conseqüentemente reduz os danos teciduais, porém a função da IL-10 sobre o LES permanece controversa. Trabalhos vêm mostrando que esta citocina suprime doenças autoimunes mediadas pela resposta Th2 como, colite ulcerativa e doenças como a esquistossomose, que gera patologia autoimune (HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000) e que, a utilização de antagonista de IL-10, em pacientes com LES, ameniza os sintomas da doença, sendo sugerida sua utilização em casos de LES refratária (LLORENTE et al.; 2000). Em relação ao estrogênio sobre a progressão do LES, este importante hormônio feminino estimula e promove a expansão das células B da zona marginal, população que produz muito mais autoanticorpos do que as outras populações, célula B folicular e célula B1 (GRIMALDI et al., 2005).

Para o melhor entendimento da fisiopatologia do LES, causada por defeitos genéticos ou por fatores ambientais, e para os estudos sobre efeitos terapêuticos das drogas para o tratamento dessa doença, tem se utilizado modelo animais para LES que podem ser espontâneos (NZB/NZW F1, MRL/lpr) ou induzidos por pristane (CALVANI et al., 2005).

Ko et al. (2007) utilizou a planta *Sophorae radix*, possuidora de efeito imunossupressor, no modelo de camundongo NZB/NZW F1 para avaliação de seus efeitos sobre LES. Os autores observaram que ela reduziu significativamente os níveis de proteinúria, a glomerulonefrite grave e a deposição glomerular de IgG em relação aos animais não tratados. Em relação ao peso dos animais e a análise das células sanguíneas não houve alteração entre os grupos, com exceção dos linfócitos que se apresentou mais elevado no grupo tratado com *Sophorae radix*.

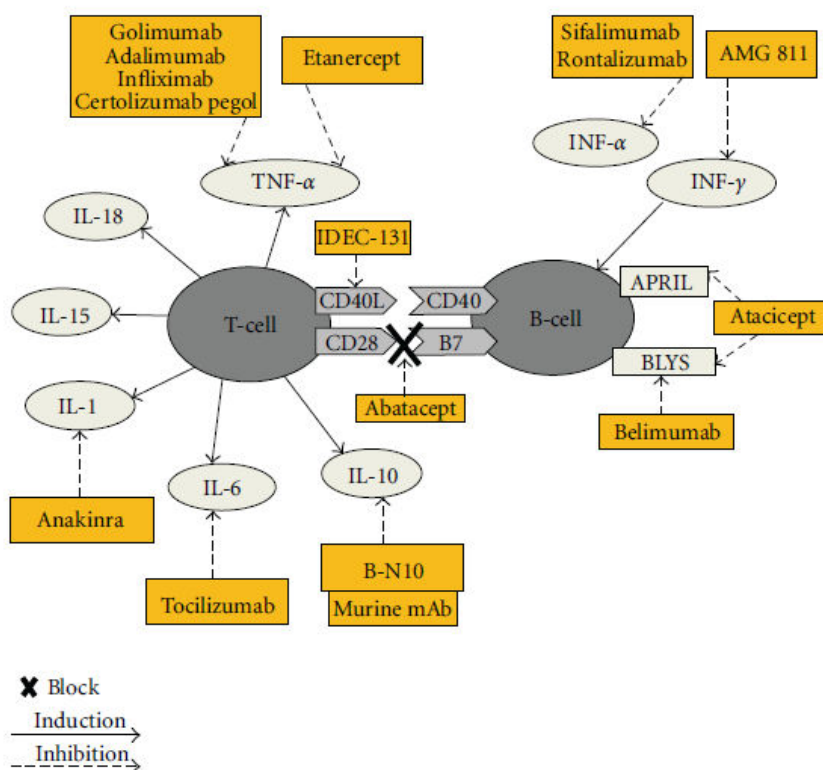
Minhas et al. (2012) utilizou duas doses (1000mg/Kg e 500mg/Kg) de *Withania somnifera*, que tem ação imunomoduladora em artrite, para avaliar seus efeitos no modelo LES induzidos em camundongo por pristane. Os animais que receberam *Withania somnifera*

apresentaram redução dos lipogranulomas que são característicos deste modelo, ausência de proteinúria, redução de citocinas (IL-6, TNF- α) e de óxido nítrico e ROS no fluido peritoneal e no soro, porém não reduziu os autoanticorpos formados nos rins que foram induzidos pelo modelo LES.

O pristane (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) é um óleo hidrocarboneto presente em algumas plantas, organismos marinhos, constituinte de óleos minerais e medicinais, reveste alimentos e produtos domésticos. A inoculação de pristane em dose única por via intraperitoneal em camundongos BALB/c fêmeas causa um processo inflamatório crônico e uma desordem imune com aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias: interferon tipo I α e β , IL-6, IL-12 e TNF- α . Este processo inflamatório gera células plasmáticas tumorais (plasmocitoma) conhecidas como lipogranuloma que é formado por macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células plasmáticas. Além disso, outras características observadas neste modelo é a hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, glomerulonefrite, artrite e a produção de autoanticorpos anti-Sm, anti-RNP, anti-dsDNA, anti-ssDNA, anti-cromatina, anti- P ribossomal e anti-Su (REEVES et al., 2009; MIZUTANI et al., 2005).

Atualmente as opções de tratamento para LES são o uso de corticosteroides, hidroxiquina e outros medicamentos imunossupressores como: azatioprina, micofenolato e ciclofosfamida; entretanto, estudos clínicos e experimentais têm indicado que estas drogas possuem influências no desenvolvimento de processos patológicos e que quadros de glomerulonefrite, anomalias neurológicas e pneumonite intersticial necessitam de tratamento mais agressivo com estes medicamentos (DORIA et al., 2006).

Com o avanço do conhecimento sobre a patogênese do LES pode-se realizar estudos para a elaboração de terapias direcionadas a alvos específicos. Estas terapias podem estar diretamente direcionadas as células B como é o caso do rituximabe (anti-CD20 monoclonal quimérico murino/humano) e do ocrelizumabe (anti-CD20 monoclonal humanizado) que possuem a função de depleção das células B, do epratuzumabe (anti-CD22 completamente humanizado) que regula a ativação e a interação das células B com as células T sem sua depleção e do abetimus que é um tolerogênico dos linfócitos B (FURTADO; ISENBERG, 2013). Outras terapias como mostrada na figura 7 estão direcionadas em bloquear BlyS (belimumabe, atacicepte), bloquear moléculas coestimulatórias (abatacepte, IDEC-131, efalizumabe, ripamicina) e inibir citocinas (TNF- α , INF α/γ , IL-1, IL-6, IL-10). No entanto, é preciso novos estudos em busca de agentes biológicos mais efetivos que não afetem o sistema de defesa do organismo contra patógenos por agirem de maneira indiscriminada sobre as células B (NIKOLOVA et al., 2010; POSTAL; COSTALLAT; APPENZELLER, 2012).



POSTAL; COSTALLAT; APPENZELLER, 2012

Figura 7. Potenciais alvos e relevantes drogas na terapia de LES

2.3 PRODUTOS NATURAIS

Por milhares de anos, os produtos naturais têm desempenhado um papel promissor no tratamento e prevenção de doenças humanas. O farmacologista Freidrich Sertumer foi quem isolou o primeiro composto puro ativo nomeado morfina da planta ópio, dando início a era das pesquisas de novos compostos que poderiam ser purificados das plantas e estudados para avaliação do seu potencial bioativo. Na década de 70, as investigações dos produtos naturais como fonte de novas terapêuticas atingiram seu auge na indústria farmacêutica ocidental, já que as plantas possuem uma grande diversidade de moléculas com potencial medicinal que podem resultar em novos produtos bioativos. Em 1990, aproximadamente 80% das drogas que revolucionaram a medicina eram produtos naturais ou seus análogos, e estavam correlacionados na terapêutica antimicrobiana, anti-parasitária, anti-malarial, controle dos lipídeos, imunossupressores de transplantes de órgãos, anti-cancerígena (KOEHN; CARTER, 2005; LI; VEDERAS, 2009).

Alguns produtos naturais apresentam efeitos imunomodulatórios sobre os linfócitos B e têm sido demonstrados por Sharma et al (2007) que observou que resveratrol e curcumina suprimem a proliferação de células B e a produção de IgG1 e IgG2 em células esplênicas de camundongos Balb/c, assim como, citocinas pró-inflamatórias. Decoté-Ricardo et al. (2009) demonstrou que a curcumina, um polifenol extraído da *Curcuma longa*, inibe a resposta proliferativa de células B esplênicas purificadas de camundongos Balb/c quando os receptores TLR4 e TLR9 eram estimulados e a secreção de IgM inibida apenas pelo estímulo do receptor TLR4. Neste mesmo trabalho a curcumina foi capaz de inibir a fosforilação de ERK e p38

pelos estímulos dos receptores TLR e BCR e a inibição da translocação de NFκB para o núcleo ocorreu pela inibição da fosforilação de IκB. Rocha et al. (2010) sugeriu que a waraifeína, purificado do *Cissampelos sympodialis*, seja um potente inibidor da resposta das células B *in vitro* e *in vivo*, já que a waraifeína inibiu a proliferação e a secreção de Ig pelas células B purificadas de BALB/c pelos estímulos de TLR e de BCR, reduziu os níveis Ca^{2+} intracelular, reduziu a fosforilação de ERK e a translocação de NFκB para o núcleo e em experimentos *in vivo* foi capaz de reduzir a produção de Ig pela resposta timo independente tipo 2. Paiva et al. (2011), utilizando o hormônio esteroide oiabaina, observaram em um tratamento de curto período, que este hormônio promovia a depleção de linfócitos B maduros na medula óssea, baço e no sangue periférico, no entanto, em seus experimentos *in vitro*, a oiabaina não apresentou efeito sobre as células B da medula óssea.

2.3.1 PIPERINA

A piperina (Figura 8) é um alcaloide extraído dos frutos secos das plantas *Piper longum* (pimenta longa) e *Piper nigrum* (pimenta preta), plantas pertencentes à família *Piperaceae*. Essas plantas são oriundas da Índia e seus frutos são utilizados como especiarias, até os dias atuais, no mundo todo. A sua extração e purificação é realizada por métodos simples, constituindo 5-9% dos frutos secos, além disso, é uma planta de fácil aquisição. A piperina, responsável pelo sabor picante da pimenta, foi descrita pela primeira vez como medicamento por Hipócrates e apresentam diversos efeitos benéficos, como: hepatoprotetor, antioxidante, anticancerígeno, antimicrobiano, antiplaquetário, antilipêmico, analgésico, antiparasitário, antidepressivo, antiobesidade, cardioprotetor, vasodilatador coronário, aumenta a biodisponibilidade, antiobesidade, antifúngico, contraceptivo, antiinflamatório, imunomodulador (KOLEVA et al., 2012; KUMAR et al., 2011).

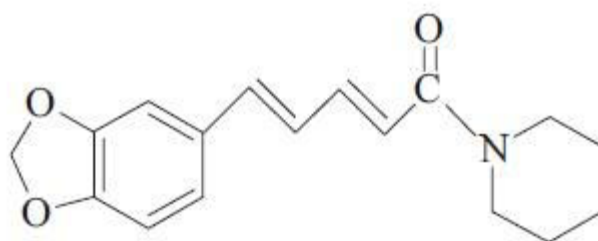


Figura 8. Fórmula química da piperina.

A função citoprotetora da piperina tem sido demonstrada através da inibição de diferentes isoformas do citocromo P450 (CYP450) e outras enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos como, UDP-glicorunil transferase e aril hidrocarbono hidroxilase hepática (ATAL 1985; BADMAEV; MAJEED; PRAKASH,1999). Reen; Wiebel; Singh (1997) para avaliar este efeito citoprotetor, eles utilizaram a aflatoxina B1, uma substância genotóxica, sobre as células V79MZr2B1 (célula de hamster modificada para expressão CYP4502B1) e observaram que 60μM de piperina foi eficiente no combate da citotoxicidade e da formação do micronúcleo promovido pela aflatoxina B1, sugerindo que este alcaloide seja um potente inibidor da atividade CYP4502B1, oferecendo um potente efeito quimiopreventivo contra atividade pro-carcinogênica. Esse mesmo grupo, em trabalho anterior, utilizando células H4IIEC3 (hepatócitos de rato) constatou a eficiência da piperina (100μM) na redução da toxicidade causada pela aflatoxina B1(SINGH; REEN; WIEBEL, 1994).

Experimentos *in vivo*, também demonstraram o efeito benéfico da piperina contra a genotoxicidade de pró-carcinógenos. A administração de benzo(a)pireno ou a ciclofosfamida

em camundongos suíços, que também são substâncias genotóxicas, associado com a administração oral da piperina (5 dias consecutivos), em diferentes doses (20mg/Kg-75mg/Kg), reduziu a formação dos micronúcleos nas células da medula óssea, dos pulmões e do fígado (SELVENDIRAN et al.; 2005; SEHGAL et al.; 2011).

Além disso, o efeito inibitório da piperina sobre a glucuronidação, fase II do metabolismo de substâncias no organismo, que aumenta a hidrossolubilidade das moléculas facilitando a sua excreção, ou sobre a glicoproteína P, que causa o efluxo de várias classes de medicamentos das células, pode possibilitar o aumento da biodisponibilidade das drogas e assim, elevação de seus níveis plasmáticos, como exemplo: curcumina (SHOBA et al., 1998), teofilina, fenitoína, propranolol (BANO et al., 1987), rifampicina (ZUTSHI et al., 1985), fexofenedina (JIN et al., 2010), resveratrol (JOHNSON et al., 2011). No trabalho do Prakash; Srinivasan (2010) foi visto também, que a piperina aumentou o comprimento e o perímetro das microvilosidades do intestino delgado resultando no aumento da superfície de absorção.

Já sobre as células tumorais, a piperina apresenta efeitos citostático e citotóxico. Estes efeitos foram demonstrados *in vitro*, pela sua indução de ROS e conseqüentemente a apoptose das células cancerígenas retais HRT-18 (YAFFE et al., 2012), por sua inibição de todos os aspectos da angiogênese que são importantes para a progressão do câncer como, proliferação, migração e formação de túbulos, vistos em células da veia umbilical humana através da inibição da cascata de sinalização (PI3K)/Akt (DOUCETTE et al., 2013). Em estudos *in vivo*, a função anticancerígena da piperina foi observada pela possível inibição da ativação ou translocação nuclear de fatores como NF-kB p65, NF-kB p50, NF-kB c-Rel, c-Fos, ATF-2 e CREB, que levou a inibição na metástase das células de melanoma B16F-10 nos pulmões de camundongos C57BL/6 (PRADEEP; KUTTAN, 2002 e 2004). Sunilla; Kuttan (2004) verificaram que a piperina (1,14mg/animal) inibia o crescimento do tumor sólido induzido por células de linfoma ascítico de Dalton (DLA) e do tumor ascítico promovido por células do tumor ascítico de Ehrlich, em camundongos BALB/c.

A capacidade da piperina em inibir fatores de transcrição (NF-KB, c/EBP e AP-1) lhe proporciona também, atividades antiinflamatórias que vem sendo demonstrados em diversos trabalhos. Em cultura de células, ela reduziu a produção de prostaglandina, maior metabólito de COX-2, pela inibição da atividade transcricional de NF-kB, c/EBP e AP-1 em células RAW 264,7 estimulados com PMA (KIM, et al., 2012). Pradeep; Kuttan, 2003 em experimentos *in vitro* com macrófagos e com L929 estimulados, comprovaram que os níveis de nitrito e de TNF- α , foram reduzidos a níveis normais. Este efeito antiinflamatório, também foi observado em seus experimentos *in vivo*, com camundongos tratados com LPS ou Con-A. Em adição, a redução de TNF- α , decorrente da não degradação de Ikb α pela piperina no trabalho de Kumar et al. (2007), alterou a capacidade de adesão de neutrófilos a células endotelial mononuclear, pela não expressão de moléculas de adesão celular (VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina) induzidas por esta citocina pró-inflamatória.

No entanto, a piperina é capaz de reduzir a citocina TNF- α , por outra via de sinalização. Isto foi demonstrado no experimento de pancreatite, onde a piperina inibiu a MAPK resultando na inibição das células acinares, de citocinas (IL6, IL1 β e TNF- α) e da produção de enzimas digestivas (BAE, 2011). Além disso, no modelo de artrite com células de paciente com artrite reumatoide, foi visto que a piperina inibe a translocação de AP-1 para o núcleo, acarretando a inibição de IL-6, MMP13 e PGE₂ (BANG et al., 2009).

A propriedade antiinflamatória da piperina também foi vista em modelos de inflamação. No modelo experimental de choque séptico em camundongos C57BL/6, observou que a piperina atenuava o choque endotóxico através da redução de interferon tipo 1. Esta redução é o resultado da ação inibitória da piperina sobre da expressão dos genes IRF-1 e IRF-7, da translocação nuclear de IRF-3 e em parte pelo seu envolvimento na via NF-kB (BAE et al.; 2010). No modelo experimental de artrite em ratos, induzido pelo adjuvante indometacina, a

piperina reduziu a níveis normais o volume da pata, as enzimas lisossomais, as glicoproteínas e o peso corpóreo. Na análise histopatológica, este alcaloide atenuou a hiperplasia sinovial e a infiltração de células mononucleares (MURUNIKKARA et al., 2012) e no modelo experimental de asma, o tratamento da piperina sobre a doença inflamatória foi através da redução das citocinas Th2 (IL-4 e IL-5), da infiltração de eosinófilos, do timo e das quimiocinas regulatória de ativação (KIM; LEE, 2009).

Já os efeitos da piperina sobre a resposta imune, têm sido demonstrados em outros trabalhos. Este alcaloide, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, impede os efeitos deletérios do cádmio. Ela promove o aumento da viabilidade, o efeito anti-oxidativo, anti-apoptótico e anti-necrótico das células tímicas e esplênicas. Além disso, a piperina normaliza a proporção de células CD4 e CD8, a proliferação celular dos esplênocitos e tímocitos e a produção de citocinas (IFN- γ e IL-12) (PATHAK; KHANDELWAL, 2006, 2008, 2009).

Os efeitos modulatórios da piperina, também foram vistos sobre a maturação celular. Bae et al. (2012) utilizaram células dendríticas oriundas da medula óssea estimuladas com LPS. Observaram que diferentes doses de piperina (1-10 μ M) inibiam a maturação dessas células dendríticas pela redução, dose dependente, de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD86 e MHC) e diminuição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12), através da inibição da ativação de ERK e JNK, sugerindo que a piperina poderia fornecer proteção contra doenças autoimunes como, artrites, alergias e diabetes.

A capacidade modulatória da piperina sobre a proliferação celular foi analisada sobre as células mononucleares periféricas humanas, por Chuchawankul; Khorona; Poovorawan (2012). Eles utilizaram diferentes doses de piperina (0,1-100 μ g/mL) sobre estas células mononucleares estimuladas com fitohemaglutinina (PHA), que induz as células T a se diferenciarem e proliferarem; e analisaram as citocinas IL-2 e IFN- γ , que são importantes para o crescimento dessas células estimuladas por PHA. Como resultado, eles constataram que doses de 50-100 μ g/mL de piperina inibia a produção de IL-2, no entanto, as doses 1-25 μ g/mL de piperina estimulava a produção dessa citocina. Já na análise da produção de IFN- γ , a dose de 25-100 μ g/mL de piperina foi capaz de inibir a produção de IFN- γ . A partir de seus resultados eles especularam que a inibição da proliferação das células mononucleares, pela piperina, seria decorrente de sua ação inibitória sobre as citocinas IL-2 e IFN- γ e que a piperina poderia ser uma alternativa quimioterápica para doenças de autoimunidade, de imunodeficiência, de reações de hipersensibilidade e para transplantes.

Dogra; Khanna; Shanker (2004), para avaliar o efeito imunotoxicológico da piperina, utilizou três diferentes doses de piperina (1,12mg/Kg, 2,25mg/Kg e 4,5 mg/Kg) por via oral, durante cinco dias consecutivos em camundongos suíços. Como resultados, foi observado que todas as doses não apresentaram sinais de hepatotoxicidade, a dose de 4,5mg/Kg reduziu o peso do baço, dos nódulos linfáticos e do timo, enquanto as duas menores doses promoveram aumento no peso desses órgãos. As doses 2,25mg/Kg e 4,5mg/Kg de piperina geraram uma leucocitose seguida de uma neutrofilia, reduziram a resposta dos linfócitos B, o número de células formadoras de anticorpos primários (IgM) no baço e os níveis primários de anticorpos no soro.

Neste mesmo ano, Sunilla; Kuttan (2004) utilizando a dose de 1,14mg/animal de piperina em camundongos BALB/c, durante cinco dias consecutivos, mas pela via intraperitoneal, observaram que a piperina pode estimular o sistema hematopoiético com o aumento do número de células da medula óssea, do número de células α -esterase positiva, dos títulos de anticorpos séricos e do número de células formadoras de anticorpos primários (IgM).

Analisando estudos da piperina sobre o sistema imune, constatamos que diferentes doses e vias podem afetar seus efeitos modulatórios e que, não existem trabalhos, até o momento, que avaliaram a ação modulatória da piperina diretamente sobre os linfócitos B purificados. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da piperina em modular a resposta das

células B de camundongos BALB/c, tanto em células B purificada quanto em um modelo de autoimunidade, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), como também seu efeito sobre as respostas a antígenos timo-dependente e timo-independente.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 PURIFICAÇÃO DA PIPERINA

A piperina foi isolada, pelo professor Marco Edilson Freire de Lima, do Departamento de química da UFRRJ, a partir do pó dos frutos secos da *Piper nigrum* Linn. A metodologia utilizada foi uma adaptação da metodologia descrita originalmente por Ikan, 1991. A amida, em sua forma pura (PF: 125-126%), foi obtida com rendimento em torno de 7% (RIBEIRO, 2004). Além da comparação do ponto de fusão, o produto natural foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN, ^1H , ^{13}C , IV e EM), apresentando dados espectrométricos compatíveis com os descritos na literatura (ARAUJO-JUNIOR et al., 1997; SIDDIQUI et al., 1997). A piperina isolada foi dissolvida em DMSO (Sigma-Aldrich) no momento do uso.

3.2 ANIMAIS

Camundongos BALB/c foram obtidos e mantidos do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os animais foram criados e mantidos de acordo com as políticas institucionais de cuidado e uso de animais. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Bioética sobre Pesquisa Animal da UFRRJ, processo nº 23011803/2011-83.

3.3 ENSAIO *IN VITRO*

3.3.1 LINHAGEM CELULAR

Linhagem de linfoma de célula B de BALB/c (célula A20) (KIM et al., 1979), foi gentilmente cedido por John C. Cambier do Departamento de Imunologia, University of Colorado Denver School of Medicine and National Jewish Health, USA. A célula foi cultivada em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion Biotechnology, Brazil), 40µg/mL de gentamicina (Gibco, invitrogen corporation), 1% de L-glutamina (Gibco, invitrogen corporation) e 20mM de HEPES (Sigma-Aldrich). As células tiveram crescimento em suspensão de cultura a uma temperatura de 37°C em um ambiente com 5% CO₂.

3.3.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA DA PIPERINA PARA CÉLULA A20 E CÉLULAS ESPLÊNICAS EM CULTURA

As células A20 (2×10^5 células) e as células esplênicas (5×10^5) foram cultivadas em placa de 96 poços. Diferentes concentrações de piperina (150µM, 50µM, 15µM, 3µM e 1µM), em triplicada, foram adicionadas as células A20 e incubadas por 24h, 48h ou 72h a 37°C em 5% CO₂. As células esplênicas foram incubadas com concentrações de piperina de 15µM, 3µM e 1µM, em triplicada, por 24h a 37°C em 5% CO₂. Após esses períodos, 50µL de XTT (1,2mg/mL) foi adicionado em cada poço e incubados por mais 2 horas. O teste de XTT é um ensaio colorimétrico que detecta a atividade metabólica celular. As placas foram lidas

por leitor de placa de ELISA (Bio-Rad, Model 680) em filtro de 450nm. Triton X-100 (1 μ L/poço) foi usado como controle positivo de morte. A porcentagem de células viáveis foi determinada em relação ao controle não tratado (100%).

3.3.3 PURIFICAÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS B

Os linfócitos foram obtidos do baço e a depleção das células T foi realizado pelo tratamento de uma mistura de sobrenadantes de cultura de anticorpos anti-célula T (anti-Thy-1, anti-CD4 e anti-CD8), obtidos do hibridoma T24, e com complemento de coelho (Cedarlane, Inc.) como previamente descrito por Bento et al. (1996). Suspensão enriquecida de células B foi aplicada a um gradiente de Percoll (Pharmacia, Sweden) 1.086, 1.081, 1.074 e 1.062g/mL como previamente descrito (RABIN, et al.; 1985). As células B purificadas foram cultivadas em placa de cultura de 96 poços em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL, NY,USA) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco-BRL), 2mM de L-glutamina (Gibco, invitrogen corporation), 20mM de HEPES (Sigma-Aldrich) e 40 μ g/mL de gentamicina (Sigma). As culturas em triplicada foram incubadas com diferentes doses de piperina e com ativadores de células B a uma temperatura de 37°C em um ambiente com 5% CO₂.

3.3.4 PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS B

O ensaio de proliferação foi realizado a partir da incorporação de timidina (3H-metil-timidina) em culturas de células B (2x10⁵ células/ poço) incubadas por 72h na ausência ou presença de estímulo de 10 μ g/mL de LPS (como ligante de TLR4) ou de 10 μ g/mL de anticorpo α -IgM (como ligante de BCR), tratados com diferentes doses de piperina (15 μ M, 3 μ M and 1 μ M). Depois da adição da timidina as células foram incubadas por 18h e congeladas até serem analisadas. A contagem de cintilação líquida foi utilizada para mensurar a incorporação específica da timidina e a média aritmética das culturas, em triplicada, expressou o resultado de proliferação (BRUNSWICK et al., 1988).

3.3.5 NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINA NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS

As culturas de célula B (5x10⁴ células/poço) na ausência ou presença de estímulo de 10 μ g/mL de LPS (como ligante de TLR4) e tratadas com diferentes concentrações de piperina (15 μ M, 3 μ M e 1 μ M), em triplicada, foram incubadas por 7 dias a uma temperatura de 37°C em um ambiente com 5% CO₂. Os “poll” dos sobrenadantes foram estocados a -20°C até serem mensurados por ELISA sanduíche pelo leitor de Elisa (Bio-rad, Model 680), 405nm, para definir os níveis de IgM (BENTO et al., 1996).

3.3.6 MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS B

Culturas de células B (1x10⁶ células/poço), tratadas com diferentes concentrações de piperina (15 μ M e 3 μ M), estimuladas ou não com 10 μ g/mL de LPS (como ligante de TLR4) ou com 10 μ g/mL de anticorpo anti-IgM (como ligante BCR) foram incubadas por 72h, a uma temperatura de 37°C em ambiente com 5% CO₂. Após esse período as culturas foram lavadas uma vez com PBS SFB a 1% (Soro fetal bovino, Cripion Biotechnology, Brasil) e bloqueado com solução de bloqueio (PBS + 1% de soro de camundongo + 2% SFB) por 15 minutos a 4°C. As células B foram marcadas com anti-B220 conjugado com FITC (1:500) e anti-CD86

conjugado com PE (1:500) por 30 minutos a 4°C. Para cada amostra, 10.000 eventos foram coletados pelo BD FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados usando o Pro CellQuest software. O gate das células B220⁺ foi selecionado para análise de CD86.

3.4 LUPUS ERITREMATOSO SISTÊMICO INDUZIDO POR PRISTANE

3.4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Fêmeas BALB/c com 12 semanas de idade foram divididas em grupos de 6 animais. 1º grupo (controle negativo): 39% de DMSO por via oral (VO), através de gavagem, e 0,5mL de solução salina por via intraperitoneal (IP); 2º grupo (controle positivo): 0,5mL (0,5mM) /animal de pristane (sigma) por IP, dose única; 3º grupo (tratamento convencional): 0,5mL (0,5mM) /animal de pristane (sigma) por IP, dose única e 5mg/Kg de prednisona por VO; 4º grupo (experimental): 0,5mL (0,5mM) /animal de pristane (sigma) por IP, dose única e 2,25mg/Kg de piperina por VO; 5º grupo (experimental): 0,5mL (0,5mM) /animal de pristane (sigma) por IP, dose única e 4,5mg/Kg de piperina por via oral. A prednisona e a piperina foram administrados por cinco dias consecutivos, semanalmente, durante seis meses.

3.4.2 ANÁLISE DE PROTEÍNA NA URINA

A urina foi coletada diretamente do aparelho genital das fêmeas BALB/c no sexto mês de experimento, no momento da eutanásia com câmara de CO₂, e congeladas a -20°C até o momento da análise. A quantificação de proteína na urina foi realizada pelo kit microprote pirogalol com os sobrenadantes das amostras de urina centrifugadas 3000rpm por 10 minutos para remoção de debris celulares.

3.4.3 ANÁLISE DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

No sexto mês de experimento os animais foram anestesiados com isoflurano para punção intracardiaca. As amostras de sangue com EDTA, dentro de 12 horas, foram submetidas à avaliação dos parâmetros hematológicos pelo aparelho coulter e os esfregaços sanguíneos utilizados para a contagem diferencial dos leucócitos por microscópio óptico com objetiva 40x. A contagem diferencial é o valor absoluto da porcentagem de 100 células em relação ao número total de leucócitos.

3.4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados em câmara saturada de CO₂ e necropsiados. Os rins das fêmeas BALB/c foram removidos e fixados com formalina tamponado a 10%. Posteriormente esse material foi processado pelos métodos usuais, que consiste em: desidratação em série crescente de etanol (70°GL até 100°GL), diafinização em xilol, impregnação e inclusão em Histosec-Paraffin para obtenção de cortes histológicos de 3µm, que foram corados com hematoxilina-eosina no Laboratório de Citologia e Embriologia, pela Dra. Aparecida Alves do Nascimento e examinadas pela Dra Vivan Nogueira.

3.4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes histológicos dos rins passaram primeiramente pelo processo de desparafinização pela passagem em dois banhos de xilol durante cinco minutos, cada e

hidratação pelas passagens sucessivas por alcoóis de grau decrescentes (absoluto, 95%, 80% e 70%), 3 minutos cada. Em seguida, os cortes lavados em água corrente e em água destilada foram submetidos à reativação gênica em tampão citrato 0,01M pH 6,0 por 40 minutos a 95°C. Após os cortes serem lavados em tampão de lavagem (PBS pH 7,2 + 0,1% tween) três vezes, por três minutos cada, eles foram bloqueados para peroxidase endógena pela solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol por 15 minutos e para ligações de sítios inespecíficos com 1% de soro de albumina bovina (BSA) durante 30 minutos em câmara úmida e em temperatura ambiente. A solução de bloqueio dos cortes foi removida pelo tampão de lavagem (3 vezes por 3 minutos). Os cortes foram incubados, em câmara úmida, com anticorpo anti camundongo IgG peroxidase (sigma), na diluição 1:200 em soro albumina 1%, com intuito de identificar a deposição de autoanticorpos IgG nos glomérulos renais. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS três vezes e a revelação pela peroxidase foi obtida através da incubação em solução de DAB (50mg de DAB em 250 mL de PBS e 500µL de H₂O₂ 30%). O tempo de revelação foi entre 30 e 60 segundos onde os corte foram lavados para interromper a reação. Os cortes depois de revelados foram contracolorados com a hematoxilina de Harris por 20 segundos a temperatura ambiente, lavados em água corrente e submetidos ao processo de desidratação pela passagem sucessiva por álcool de grau crescente (álcool 70%, 80%, 95% e 100%) e xilol. O material desidratado seco foi montado em Entellan (Merck).

3.5 ENSAIO IN VIVO

3.5.1 RESPOSTA TIMO INDEPENDENTE

Camundongos BALB/c, fêmeas, 6-8 semanas de idade foram divididos em 6 grupos (5 animais por grupo). Os animais foram tratados com piperina (2,25mg/Kg ou 4,5mg/Kg) por via intraperitoneal por 5 dias consecutivos (DOGRA; KHANNA; SHANKER, 2004). Alguns grupos receberam TNP-Ficoll (50µg/ animal) por via endovenosa no 5° dia, uma hora após a inoculação de piperina para estimular a resposta timo-independente (ROCHA; et al, 2010). Como controle negativo foi utilizado 4% DMSO (Sigma-Aldrich) por via intraperitoneal por 5 dias consecutivos e como controle positivo foi utilizado somente TNP-Ficoll (50µg/animal) por via endovenosa no 5° dia. Amostras de sangue dos camundongos foram coletadas no 7° e 14° dia depois do tratamento, pela veia da cauda, e o plasma estocado a -20°C. O plasma foi diluído serialmente e adicionado nas microplacas de cloreto de polivinil de fundo chato (Falcon Microstest III microplates) previamente sensibilizadas com TNP-Ficoll (50ug/mL). Anticorpo secundário isotipo específico ligado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) foi utilizado pra determinar a ligação de anticorpos anti TNP-Ficoll (ROCHA et al., 2010). As placas foram lidas no filtro de 405nm em leitor de ELISA (Bio-Rad, Model 680) após 1 hora de incubação no escuro com o substrato fosfatase (Sigma-Aldrich).

3.5.2 RESPOSTA TIMO-DEPENDENTE

Camundongos BALB/c fêmeas com idade em torno 6-8 semanas foram divididas e tratadas com piperina (2,25mg/Kg ou 4,5mg/Kg). Alguns grupos receberam a hemácia de carneiro (SRBC) (2,5x10⁸ células/animal) por via intraperitoneal, no 5° dia, uma hora depois da inoculação da piperina, para estimular a resposta timo-dependente (SUNILA; KUTTAN, 2004). Como controle negativo foi utilizado 4% de DMSO (Sigma-Aldrich) por via intraperitoneal, por cinco dias consecutivos e como controle positivo foi usado somente antígeno SRBC (2,5x10⁸ células/animal) por via intraperitoneal no 5° dia. O sangue desses animais foi coletado pela veia da cauda no 14° e 21° dias após o tratamento e os plasmas

estocados a -20°C até o uso. Os plasmas foram diluídos 1:8 e adicionados em placa de ELISA (Costar 3590, Corning Incorporated) previamente sensibilizadas com SRBC (5ug/mL) de acordo com Biella et al., 2008. Anticorpo secundário isotipo específico associado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) foi usado para determinar a ligação de anticorpo anti-SRBC. As placas foram lidas no filtro de 405nm (Bio-Rad, Model 680) depois de uma hora incubadas no escuro com o substrato fosfatase (Sigma-Aldrich).

3.5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICO

No final do experimento, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂. O baço, rim e o fígado dos animais foram removidos e fixados com formalina a 10% tamponado. Posteriormente, esses materiais foram processados pelos métodos usuais, que consiste em: desidratação em série crescente de etanol (70°GL até 100°GL), diafinização em xilol, impregnação e inclusão em Histosec-Paraffin para obtenção de cortes histológicos de 3µm. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e examinadas.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Resultados foram expressos com média ± SD. Análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA para determinar diferença significativa entre os grupos, seguido pelo teste Student's Newman-Keul's (Prism Graph Pad 5 software). Nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA PIPERINA SOBRE A LINHAGEM DE CÉLULA A20 E CÉLULAS ESPLÊNICAS.

A função mitocondrial das células A20 foi avaliada pelo método de XTT depois de cultivadas com diferentes doses de piperina (1 μ M -150 μ M) por 24 (Figura 9A), 48 (Figura 9B) e 72 horas (Figura 9C). Pode-se observar que a maior dose de piperina (150 μ M) teve efeito tóxico sobre a célula A20 na primeira 24h (Figura 9A) de cultivo e essa toxicidade foi tempo dependente. A porcentagem de células viáveis nesta dose foi inversamente proporcional ao tempo de exposição da cultura: 44,64% (24h), 29,88% (48h) e 20,76% (72h). A dose de 50 μ M apresentou toxicidade para as células A20, apenas no cultivo de 48h (Figura 9B). As demais doses (15 μ M, 3 μ M e 1 μ M) não afetaram a função mitocondrial celular nos três diferentes tempos de cultivo (24h, 48h e 72h). O IC₅₀ obtido por 72 horas foi de 118 μ M \pm 9,56. A função mitocondrial das células esplênicas, também foi avaliada pelo método XTT depois de cultivados com 15 μ M, 3 μ M e 1 μ M de piperina, durante 24h. Nenhuma das doses apresentou toxicidade sobre as células esplênicas (Figura 9D).

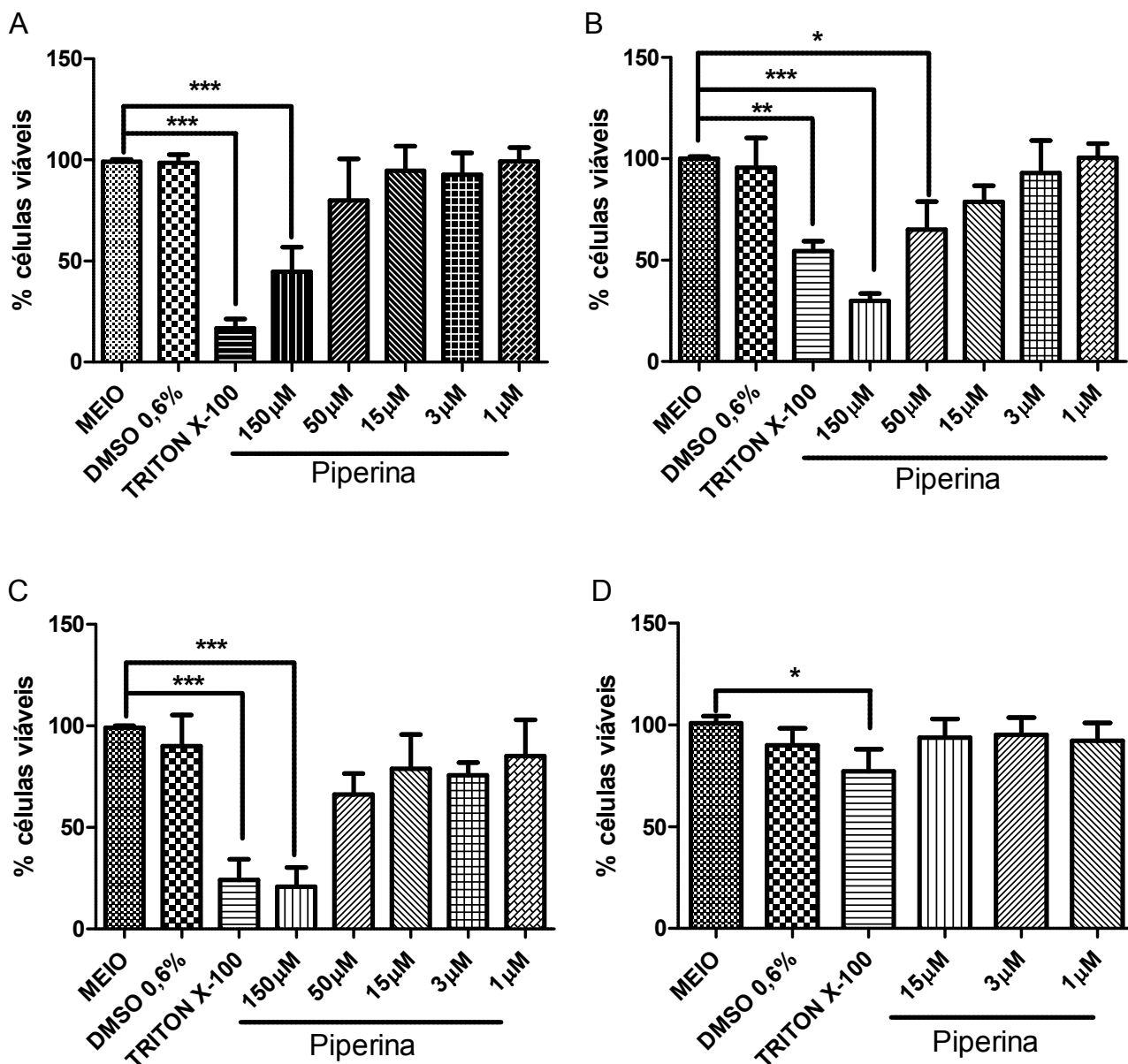


Figura 9. Efeito da piperina sobre a viabilidade das células A20 e dos esplenócitos totais por XTT. As células A20 foram incubadas com diferentes doses de piperina (150µM, 50µM, 15µM, 3µM e 1µM), durante 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de incubação, e as células esplênicas foram incubadas com as doses de 15µM, 3µM e 1µM de piperina, durante 24h (D) de incubação. As barras representam a média \pm desvio padrão de n=4, *P<0.05%.

4.2 EFEITO DA PIPERINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DOS LINFÓCITOS B ESTIMULADOS VIA RECEPTOR TLR E BCR.

A avaliação do efeito de diferentes doses de piperina (15 μ M, 3 μ M e 1 μ M) sobre a resposta proliferativa das células B esplênicas com ou sem estímulo de LPS (Figura 10A) e α -IgM (Figura 10B) por 72 horas, foi avaliada pela incorporação de timidina tritiada ao DNA celular. As doses de 3 μ M e 1 μ M de piperina não apresentaram diferença significativa sobre a proliferação celular sob estímulos, já a dose de 15 μ M de piperina foi capaz de inibir em aproximadamente 50,43% e 92,47% a proliferação das células B estimuladas com LPS (Figura 10A) e α -IgM (Figura 10B), respectivamente. Este efeito só foi visualizado em células estimuladas, já que a interação apenas da piperina (15 μ M, 3 μ M e 1 μ M) com as células B não modificou a sua resposta proliferativa (Figura 10A e 10B).

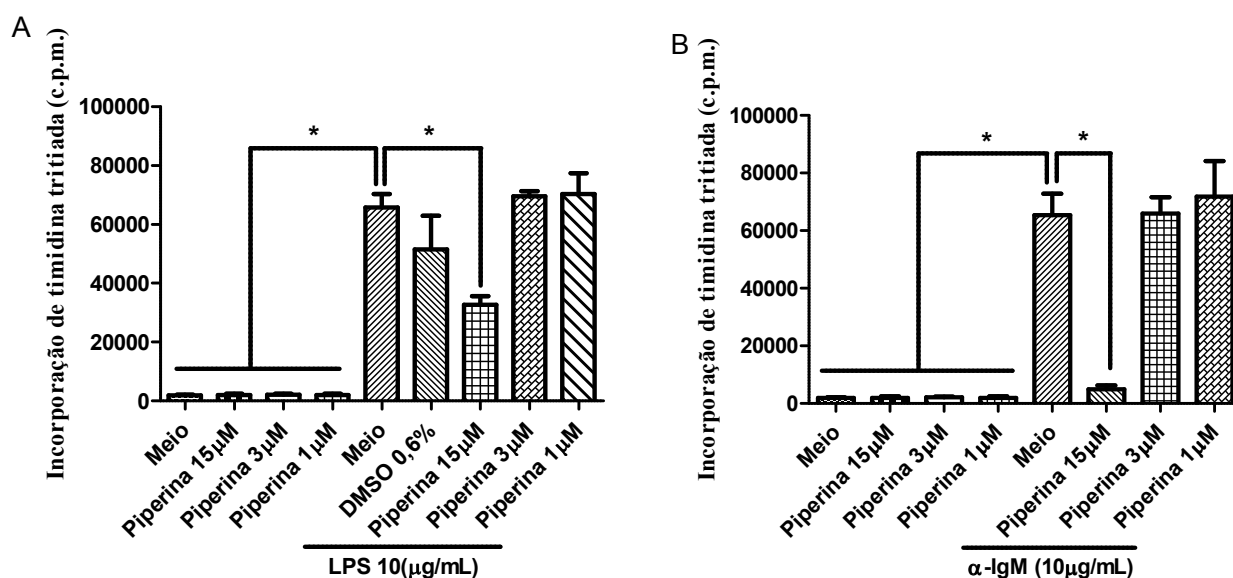


Figura 10. Efeito da piperina sobre a proliferação das células B policlonais ativadas. Piperina inibe a proliferação de células B policlonal ativadas. As células B foram incubadas por 72h com diferentes doses de piperina na presença de LPS (10 μ g/mL) (A) ou anticorpo IgM cabra anti-camundongo (10 μ g/mL) (B). Gráfico representativo de três experimentos independente. *P<0.05%.

4.3 EFEITO DA PIPERINA SOBRE A CAPACIDADE DOS LINFÓCITOS B ESPLÊNICOS EM SECRETAR ANTICORPOS IgM QUANDO ESTIMULADOS PELA VIA TLR4.

A produção de anticorpos no sobrenadante de culturas de célula B estimuladas ou não com LPS durante 7 dias foi avaliado por ELISA. As doses de 15 μ M de piperina inibiu a secreção de anticorpos IgM pelas células B estimuladas com LPS (10 μ g/mL), enquanto as demais doses (3 μ M e 1 μ M), não afetaram os níveis de imunoglobulina no sobrenadante (Figura 11). Este efeito só foi visualizado em células estimuladas, já que a interação apenas da piperina (15 μ M, 3 μ M e 1 μ M) com as células B não modificou a sua secreção de anticorpos IgM (Figura 11).

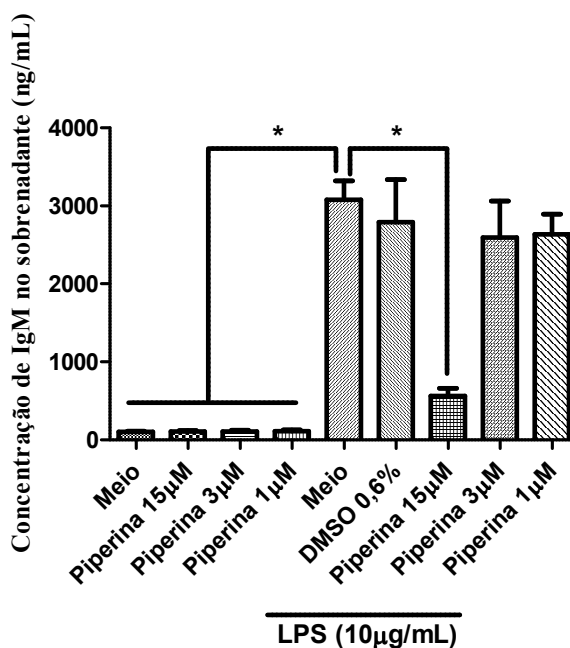


Figura 11. Efeito da piperina sobre a capacidade dos linfócitos B esplênicos em secretar IgM. Piperina inibe a produção de IgM induzida pelas células B policlonais ativadas. As células B foram incubadas por 7 dias com diferentes doses de piperina na presença de LPS(10 μ g/mL). A secreção de IgM foi mensurado no pool dos sobrenadantes por ELISA. As barras representam a média \pm desvio padrão de n=3. *P<0.05%.

4.4 EFEITO DA PIPERINA SOBRE A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD86 EM LINFÓCITOS B ESPLÊNICO.

A ativação das células B foi analisado por citometria de fluxo a partir de células estimuladas com LPS e α -IgM, incubadas por 48h com diferentes concentrações de piperina (15 μ M e 3 μ M) e posteriormente, marcados com anticorpo anti-B220⁺ e anti-CD86⁺. A piperina nas concentrações de 15 μ M e 3 μ M inibiu 27,58% e 21,90% a expressão de CD86⁺ sobre as células B estimuladas com LPS e 27,57% e 39,45% nas células B estimuladas com α -IgM, respectivamente (Figura 12).

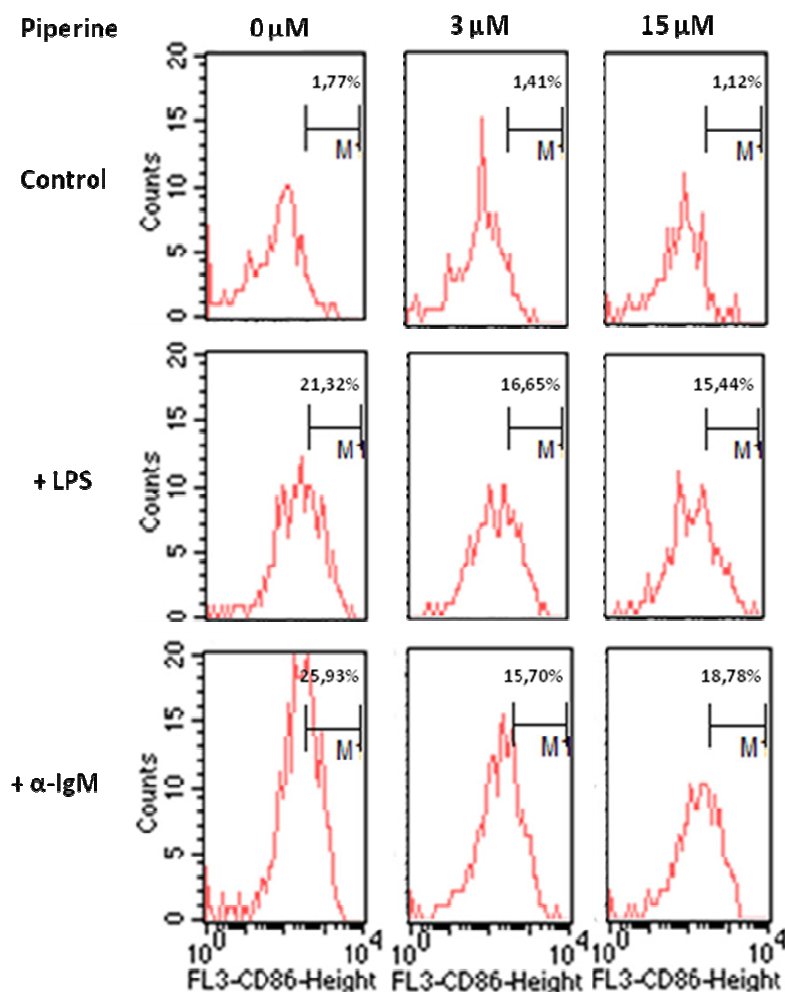


Figura 12. Efeito da piperina sobre a expressão da molécula co-estimulatória CD86 em células B esplênicas. Piperina diminui a expressão de CD86 das células B esplênicas. As células B estimuladas com LPS ou anticorpo IgM cabra anti-camundongo foram incubadas com piperina (15 μ M e 3 μ M) por 48horas. As células B foram marcadas com anticorpo anti-B220 e anti-CD86 e analisados por FACS. Dados mostrados são representativos de três experimentos independentes.

4.5 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE

Esta avaliação foi realizada pela diferença do peso dos animais no início e final do experimento. O grupo pristane foi o único que apresentou aumento estatisticamente significativo no ganho de peso em relação aos grupos controle (veículo, piperina 2,25mg/Kg, piperina 4,5mg/Kg) (Figura 13). Os grupos tratamentos (prednisona + pristane; piperina 2,25mg/Kg + pristane; piperina 4,5mg/Kg + pristane) foram capazes de reduzir este ganho de peso, porém não foi estatisticamente significativo (Figura 13).

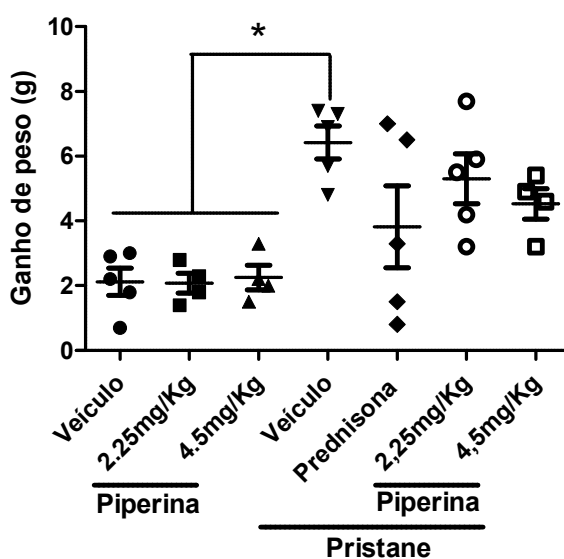


Figura 13. Efeito da piperina sobre o ganho de peso no modelo LES induzido por pristane. A piperina (2,25mg/Kg e 4,5mg/Kg) não reduziu o ganho de peso promovido pelo modelo LES. As diferenças entre o peso de cada camundongo no início e final do experimento medido por balança foram analisadas estatisticamente. As barras representam média ± desvio padrão, n=6. *** P<0,05.

4.6 AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR DAS PATAS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE

A avaliação do edema na região do metatarso dos animais foi medida por paquímetro no sexto mês de experimento. Observou-se que não houve diferença no edema das articulações das patas dos animais dos grupos controle (veículo, piperina 2,25mg/Kg e piperina 4,5mg/Kg), grupo pristane e grupos tratamentos (prednisona + pristane, piperina 2,25mg/Kg + pristane, piperina 4,5mg/Kg + pristane) (Figura 14).

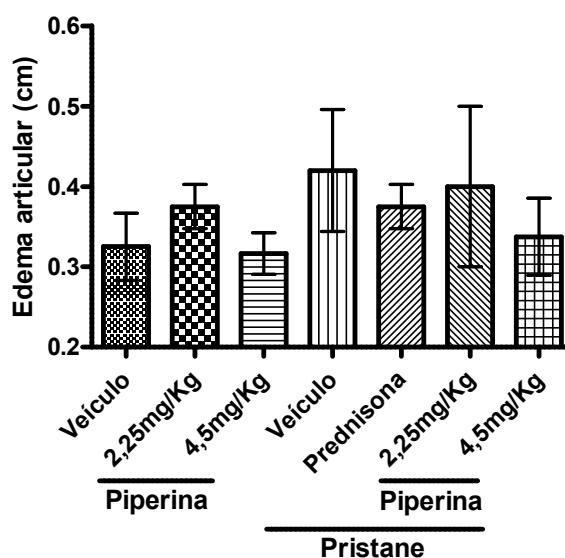


Figura 14. Efeito da piperina sobre o edema articular das patas no modelo LES induzido por pristane. Não houve diferença no edema articular das patas, entre os grupos, no sexto mês de experimento. A região do metatarso de todos os animais foi medida com paquímetro e analisados estatisticamente. As barras representam média ± desvio padrão, n=6. *** P<0,05.

4.7 AVALIAÇÃO VISUAL DAS PATAS MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE

Na análise visual das patas pode-se observar que os grupos controle (Figura 15A) e prednisona + pristane (Figura 15B) não apresentaram edema na articulação das patas em todo o período de experimento. O grupo piperina 4,5mg/Kg + pristane (Figura 15E) foi o primeiro grupo a desenvolver edema nas articulações que normalmente eram unilaterais, a partir do quarto meses de experimento. Nos grupos pristane (Figura 15C) e piperina 2,25mg/Kg + pristane (Figura 15D) estes edemas começaram a surgir três semanas após, no quarto meses e três semanas de experimento. Apesar de ter existido diferença no aparecimento do edema entre os grupos, não houve diferença em sua gravidade.

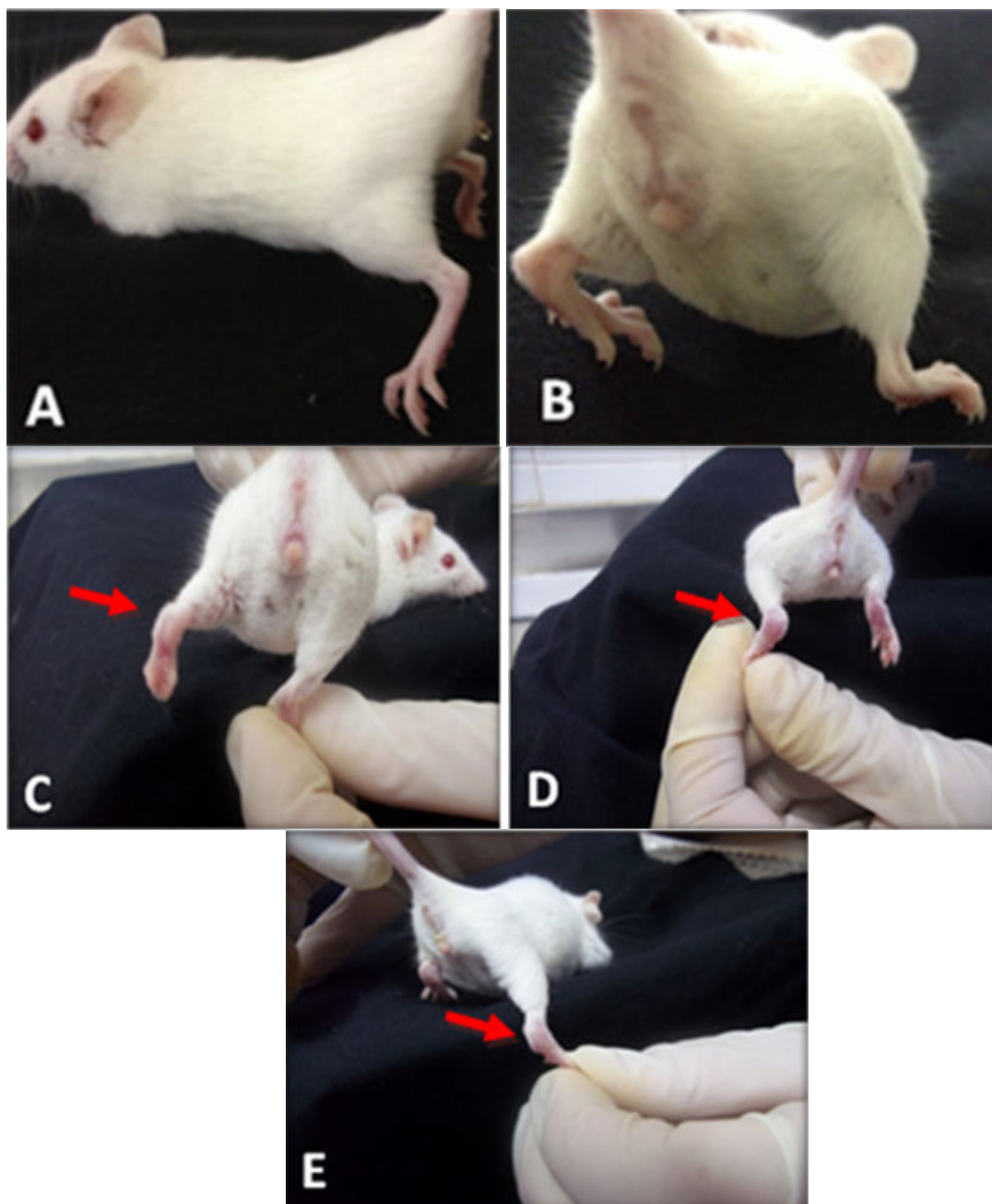


Figura 15. Efeito da piperina sobre o edema na articulação da região do metatarso no modelo LES induzido por pristane. O tratamento com piperina não reduziu o edema nas articulações da região do metatarso das fêmeas BALB/c característico do modelo LES induzido por pristane. Grupo controle (A), grupo prednisona + pristane (B), grupo pristane (C), grupo piperina 2,25mg/Kg + pristane (D) e grupo piperina 4,5mg/Kg + pristane (E).

4.8 AVALIAÇÃO DOS LIPOGRANULOMAS PERITONEAL NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.

No sexto mês de experimento, os animais eutanasiados foram submetidos à necropsia para a observação da formação de granulomas na região peritoneal, que é característico do modelo LES induzido por pristane. Nesta avaliação pode-se ver que o a região peritoneal dos animais do grupo tratado somente com piperina 4,5mg/Kg (Figura 16A) tinham ausência desses lipogranulomas. Os grupos tratados com pristane (Figura 16B), pristane + prednisona (Figura 16C), piperina 2,25mg/Kg + pristane (Figura 16D) e piperina 4,5mg/Kg + pristane (Figura 16E) esses lipogranulomas eram evidentes e distribuídos por toda a cavidade peritoneal podendo estar aderidos ao diafragma, fígado, rim e mesentério, no entanto no grupo prednisona + pristane (Figura 16C) e no grupo piperina 4,5mg/Kg + pristane (Figura 16E) os lipogranulomas apresentaram-se em tamanhos menores em relação ao grupo pristane (Figura 16B).

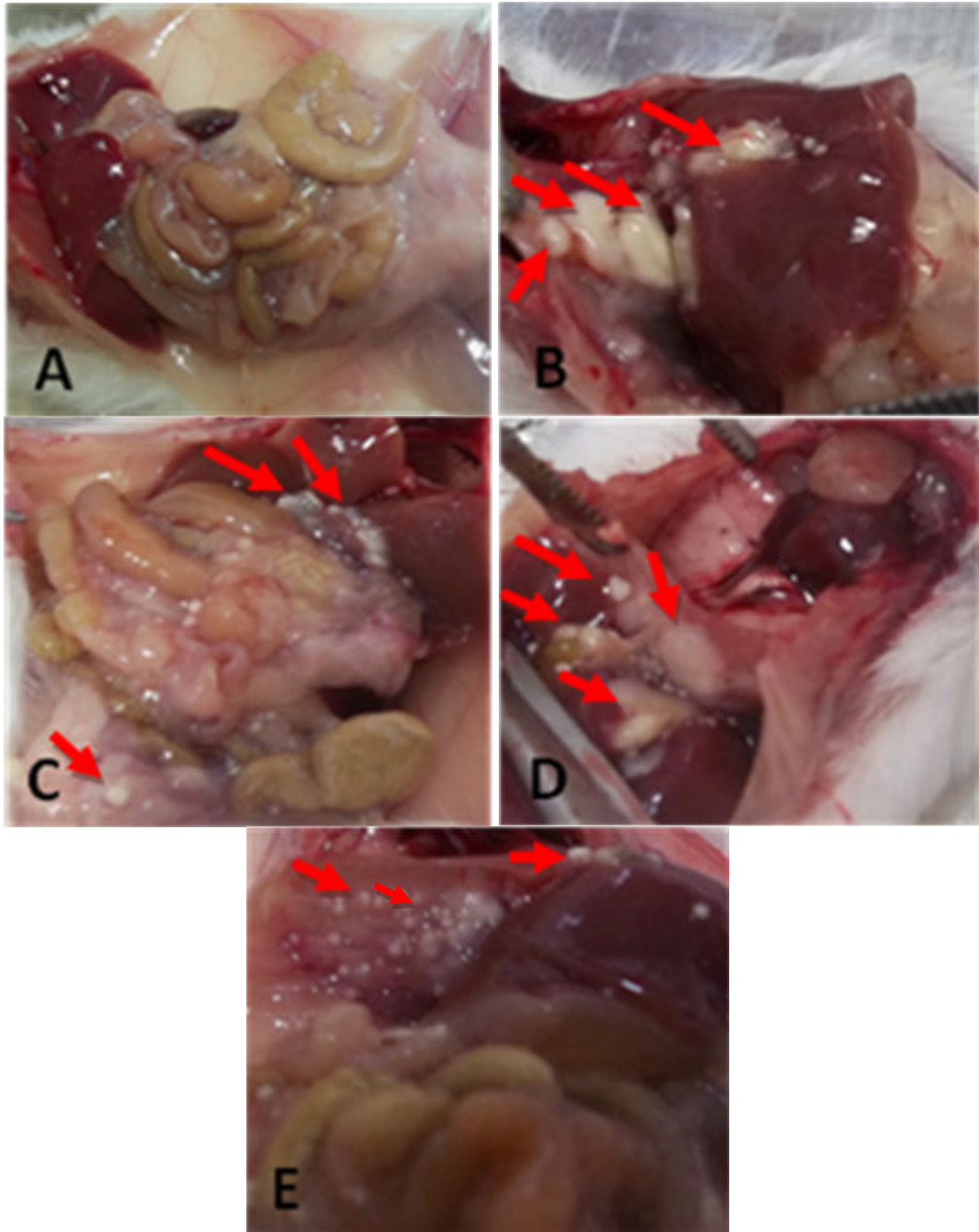


Figura 16. Efeito da piperina sobre os lipogranuloma da cavidade peritoneal no modelo de LES induzido por pristane. O tratamento com piperina na dose de 4,5mg/Kg e prednisona 5mg/Kg reduziram a formação de lipogranulomas, na cavidade peritoneal das fêmeas BALB/c, induzidos pela inoculação de pristane no modelo LES. Piperina 4,5mg/Kg (A), pristane (B), prednisona 5mg/Kg + pristane (C), piperina 2,25mg/Kg + pristane (D), piperina 4,5mg/Kg + pristane (E).

4.9 AVALIAÇÃO NO TAMANHO E PESO DO BAÇO NO MODELO lês INDUZIDO POR PRISTANE

No sexto mês de experimento, os animais eutanasiados, foram submetidos à necropsia e seus baços foram medidos por régua e pesados em balança analítica. Os grupos controle (veículo, piperina 2,25mg/Kg e piperina 4,5mg/Kg) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre eles no tamanho (Figura 17A) e peso (Figura 17B) do baço. O grupo pristane apresentou um aumento estatisticamente significativo em relação aos grupos controle tanto no tamanho (Figura 17A) quanto no peso (Figura 17B) do baço que foi revertido, com o uso de prednisona (grupo prednisona + pristane), aos valores referentes aos grupos controle em relação ao tamanho (Figura 17A) e peso (Figura 17B) do baço. Os dois grupos de tratamento com piperina (piperina 2,25mg/Kg + pristane, piperina 4,5mg/Kg + pristane) não foram capazes de reverter esses valores, não apresentando diferença estatística significativa em relação ao grupo pristane no tamanho (Figura 17A) e peso (Figura 17B) do baço.

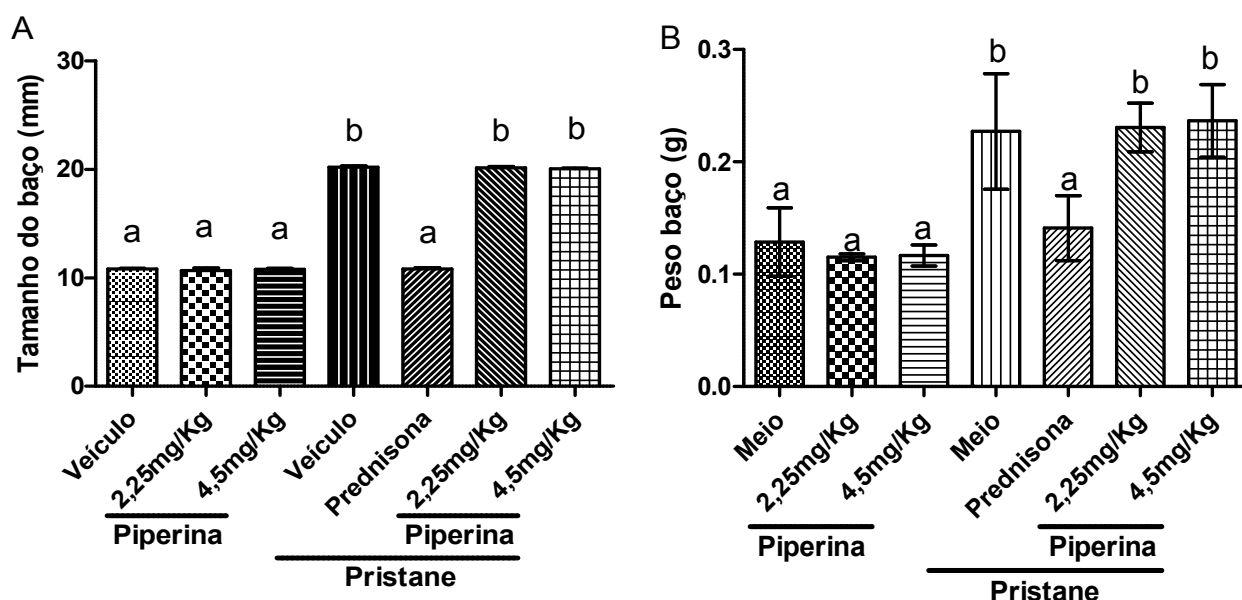
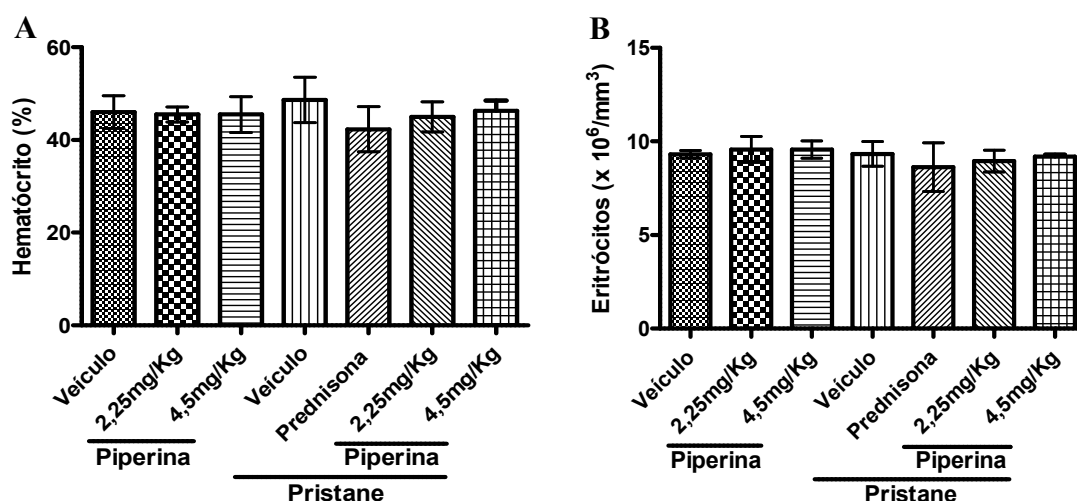
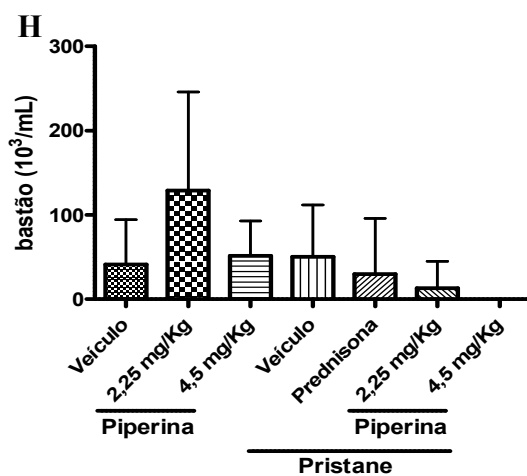
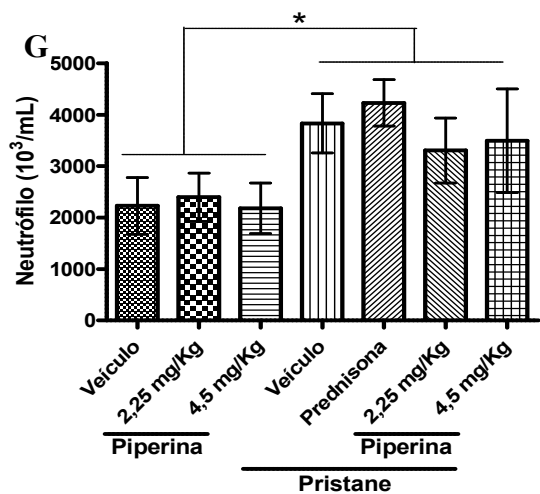
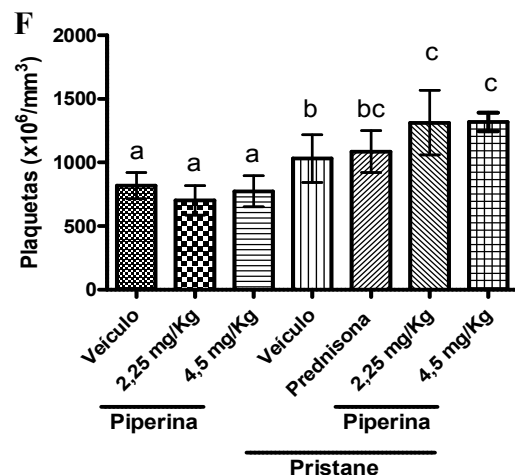
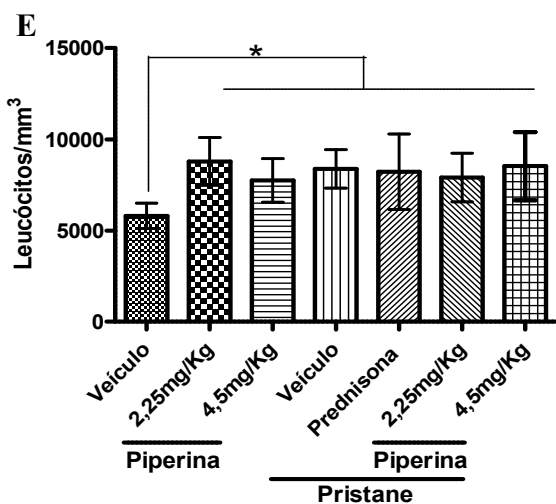
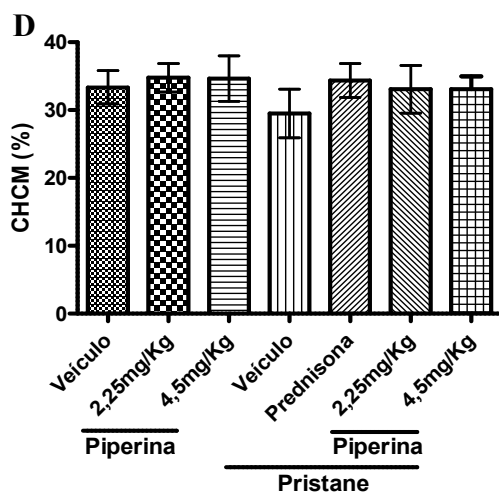
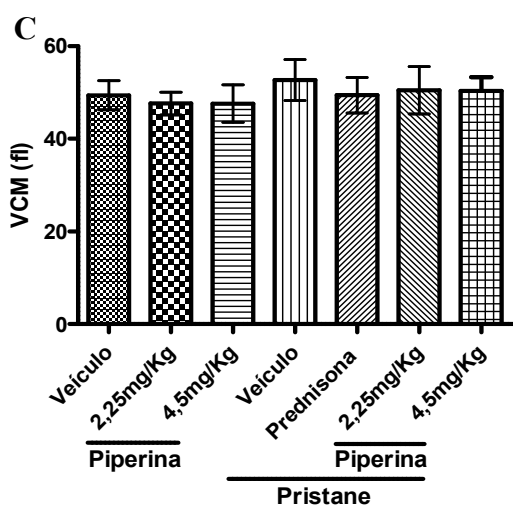


Figura 17. Efeito da piperina sobre o tamanho e peso do baço no modelo LES induzido por pristane. A piperina não reduziu o tamanho e peso do baço das fêmeas BALB/c do modelo LES induzido por pristane. Os tamanhos dos baços foram medidos por régua e seus pesos avaliados por balança analítica para posterior análise estatística. Tamanho dos baços (A) e peso dos baços (B). As barras representam média \pm desvio padrão, n=6. Letras diferentes P<0,05.

4.10 ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.

A análise das populações de células sanguíneas, obtidas a partir da punção intracardíaca dos animais, após seis meses de experimento, não apresentaram dados significativos na série vermelha: hematócrito (Figura 18A), eritrócitos (Figura 18B), Volume Corpuscular Médio (VCM) (Figura 18C) e Concentração de Hemoglobina Celular Média (CHCM) (Figura 18D), como também nos números de bastões (Figura 18H) e nos números de eosinófilos (Figura 18I). Nos leucócitos (Figura 18E), observou-se um aumento significativo de todos os grupos em relação ao grupo veículo. Analisando os níveis plaquetários (Figura 18F) dos animais, vimos que não há diferença significativa entre os grupos controle (veículo, piperina 2,25mg/Kg e piperina 4,5mg/Kg), no entanto no grupo pristane ocorreu aumento no número de plaquetas que não foi revertido pelo tratamento com prednisona e nos tratamentos piperina 2,25mg/Kg + pristane e piperina 4,5mg/Kg + pristane esse aumento foi mais significativo. Na avaliação dos neutrófilos (Figura 18G) os grupos controle (veículo, piperina 2,25mg/Kg e piperina 4,5mg/Kg) não apresentaram valores significantes entre eles, mas os demais grupos (pristane, prednisona + pristane, piperina 2,25mg/Kg + pristane, piperina 4,5mg/Kg + pristane) tiveram aumento significativo no número de neutrófilos em relação aos grupos controle. Vimos também que o tratamento com prednisona fez elevar o número de monócitos na circulação sanguínea (Figura 18J) em relação ao grupo pristane. Este aumento foi reduzido nos grupos piperina 2,25mg/Kg + pristane e piperina 4,5mg/Kg + pristane, porém continuaram elevados em relação ao grupo pristane (Figura 18J). Na avaliação dos linfócitos (Figura 18L) o tratamento com prednisona reduziu os números de linfócitos em relação ao grupo pristane, no entanto esta redução não foi estatisticamente significativa. No grupo piperina 2,25mg/Kg + pristane e piperina 4,5mg/mL + pristane não houve diferença significativa nos níveis de linfócitos em relação o grupo pristane (Figura 18L).





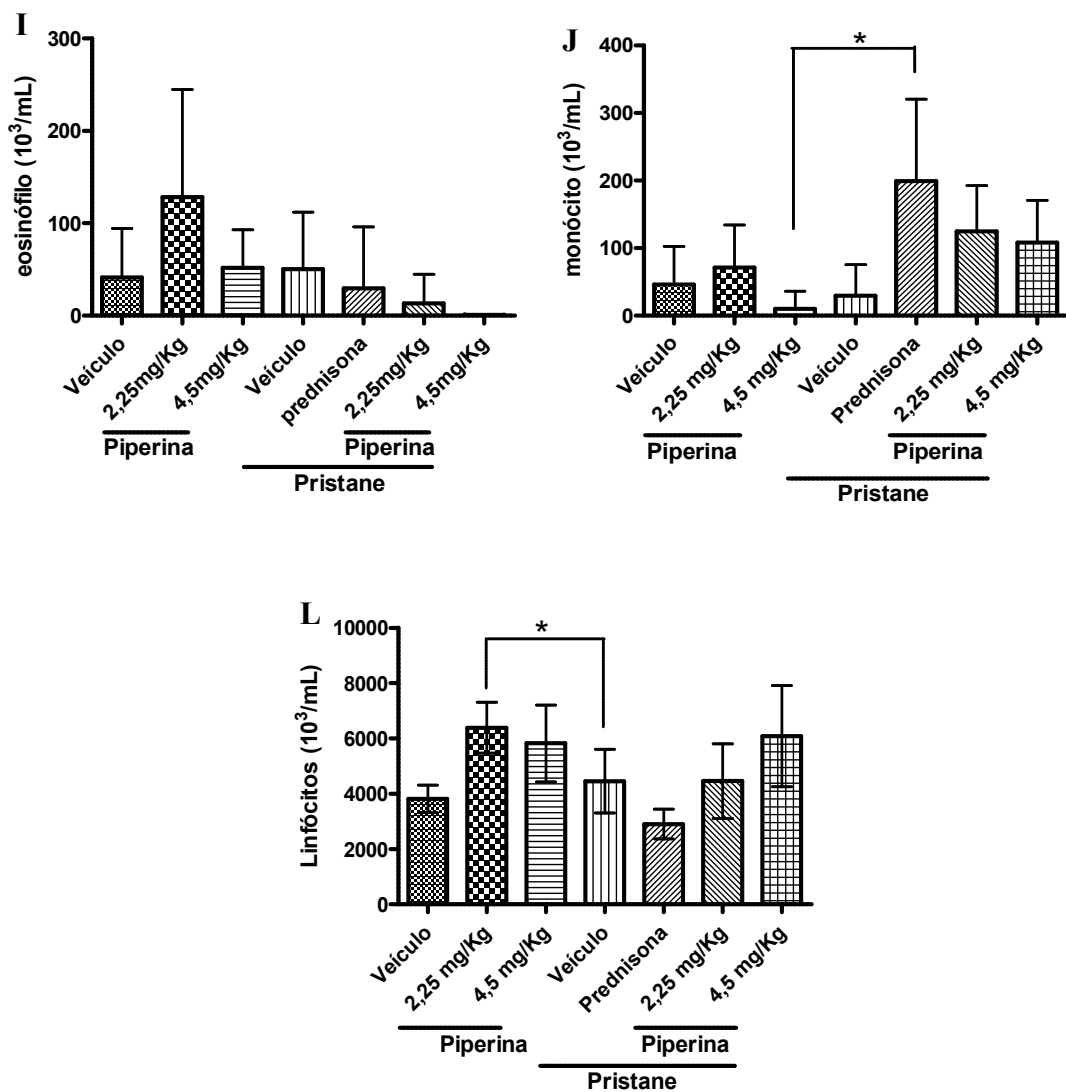


Figura 18. Efeito da piperina sobre as células sanguíneas no modelo LES induzido por pristane. Amostras de sangue foram obtidas de fêmeas BALB/c com seis meses de experimento. A população de células sanguíneas foi mensurada por analisador hematológico: (A) Hematócrito, (B) Eritrócitos, (C) VCM, (D) CHCM, (E) Leucócitos, (F) Plaquetas, (G) Neutrófilos, (H) Bastão, (I) Eosinófilo, (J) Monócitos e (L) Linfócitos. Valores são representados pela média \pm desvio, $n=6$, *** $P<0,05$.

4.11 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNURIA NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.

No sexto mês de experimento as amostras de urina foram coletadas no momento da eutanásia e analisadas pelo kit micropote. Observamos que as fêmeas BALB/c que foram induzidas a desenvolverem o LES por pristane, apresentaram aumento nos níveis de proteína na urina (Figura 19) e o tratamento prednisona + pristane e piperina 2,25mg/Kg + pristane conseguiram reduzir a proteinúria, no entanto não foram significativos. Apenas o grupo piperina 4,5mg/Kg + pristane foi capaz de reduzir significativamente o aumento dos níveis de proteína ocorrido no grupo pristane (Figura 19).

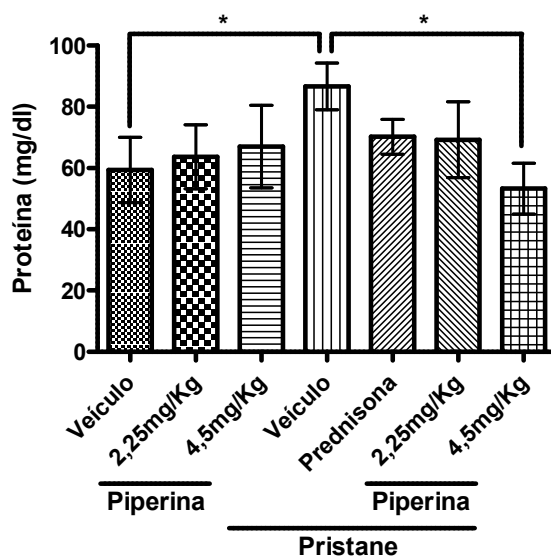


Figura 19. Efeito da piperina sobre a proteinúria no modelo de LES induzido por pristane. Amostras de urina das fêmeas BALB/c foram coletadas no sexto mês de experimento para avaliar as concentrações de proteína presentes na urina. Valores são representados pela média \pm desvio, $n=6$, *** $P<0,05$.

4.12 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS RINS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.

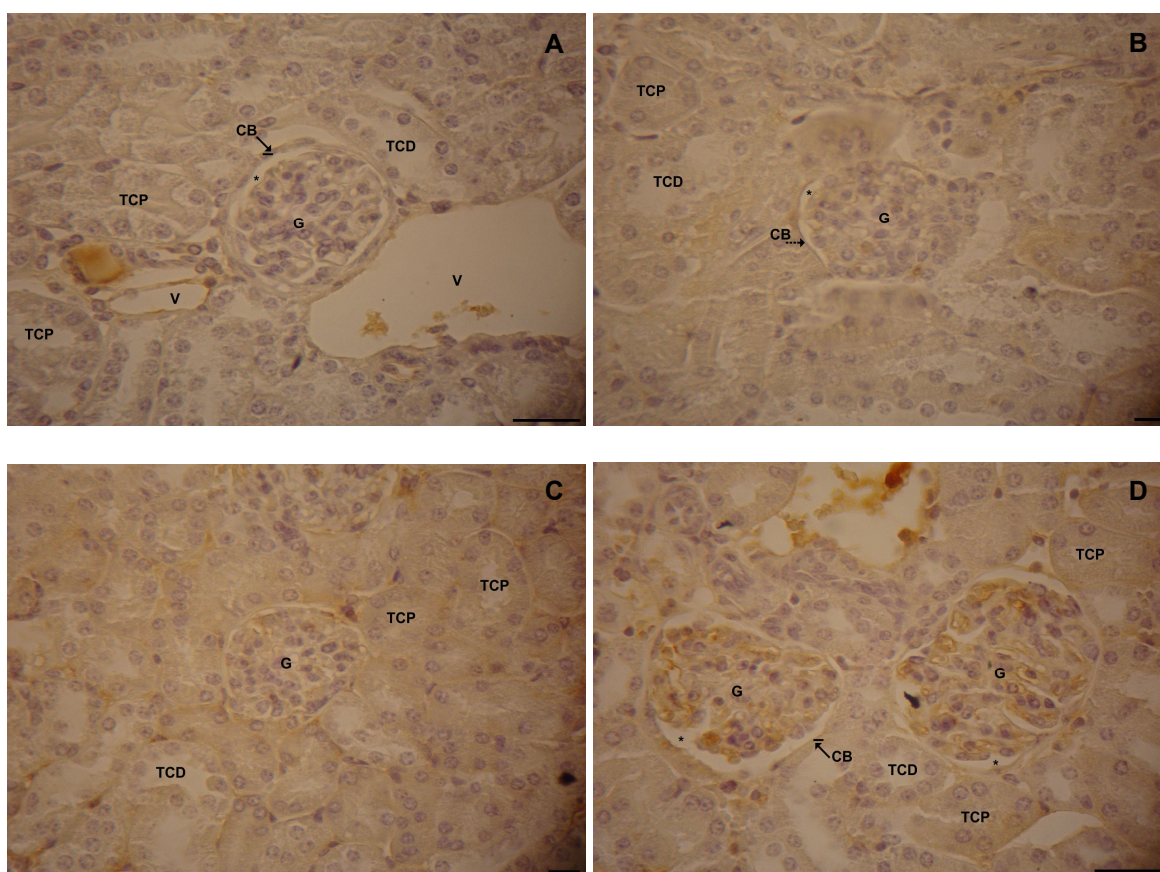
No modelo experimental de LES induzido por pristane no período de seis meses, não foi observado alterações histopatológicas nos grupos: Veículo (1), piperina 2,25mg/Kg (2), piperina 4,5mg/Kg (3), prednisona + pristane (5), piperina 2,25mg/Kg + pristane (6) e piperina 4,5mg/Kg + pristane (7). Somente o grupo pristane (4) apresentou raros glóbulos de proteína em túbulos e rara hiper celularidade na periferia dos glomérulos (Tabela 1).

Lesões Histopatológicas observadas	Grupos						
	1	2	3	4	5	6	7
Glóbulos de proteínas em túbulos	-	-	-	+	-	-	-
Hiper celularidade na periferia de glomérulos	-	-	-	+	-	-	-

Tabela 1. Lesões histopatológicas observadas no modelo LES induzido por pristane. Controle (1), piperina 2,25mg/Kg (2), piperina 4,5mg/Kg (3), pristane (4), prednisona + pristane (5), piperina 2,25mg/Kg + pristane (6), piperina 4,5mg/Kg + pristane (7). Ausência de lesão (-); raras (+).

4.13 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS RINS NO MODELO LES INDUZIDO POR PRISTANE.

Os rins dos camundongos, com seis meses de experimento, foram marcados com o anticorpos IgG peroxidase para a identificação de imunocomplexos nos glomérulos renais. Pode-se observar que os animais que receberam apenas o veículo (Figura 20A), a piperina 2,25mg/Kg (Figura 20B) e a piperina 4,5mg/Kg (Figura 20C) não apresentaram deposição de imunocomplexos nos rins, que foi visto no grupo pristane (Figura 20D). A presença destes imunocomplexos foi reduzida no tratamento convencional (grupo prednisona + pristane) (Figura 20G), no entanto os grupos tratamentos piperina 2,25mg/Kg + pristane (Figura 20E) e piperina 4,5mg/Kg + pristane (Figura 20F) não foram capazes de reduzir a deposição dos imunocomplexos induzidos por pristane.



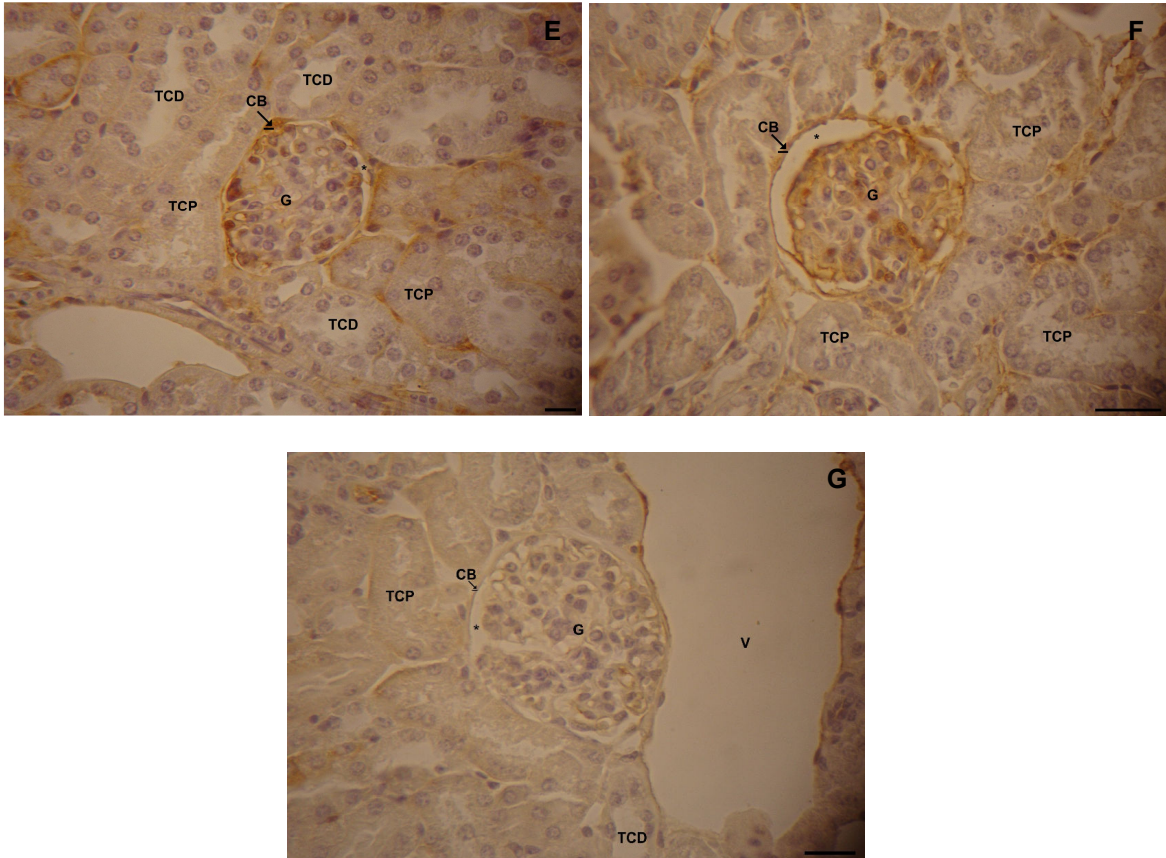


Figura 20. Efeito da piperina sobre à deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais no modelo LES induzido por pristane. Os cortes foram marcados com anticorpos IgG de camundongo, contracorados com hematoxilina de Harris e analisados por microscopia óptica x20 (B,C,E) e x40 (A,D,F e G). Grupo controle (A), grupo piperina 2,25mg/Kg (B), piperina 4,5mg/Kg (C), grupo pristane (D), grupo piperina 2,25mg/Kg + pristane (E), grupo piperina 4,5mg/Kg + pristane (F), grupo prednisona + pristane. Cápsula de Bowman (CB), glomérulo (G), túbulo contorcido proximal (TCP), túbulo contorcido distal (TCD), Veia (V).

4.14 EFEITO DA PIPERINA SOBRE A RESPOSTA TIMO-INDEPENDENTE

A resposta timo-independente foi avaliada pela titulação sérica de anticorpos IgM anti TNP-Ficoll do 7º e 14º dias após a inoculação do antígeno (TNP-Ficoll) por ELISA. Os animais que receberam apenas o antígeno responderam com produção de IgM no 7º (Figura 22A) e 14º (Figura 22B) dias de forma decrescente. Os animais tratados com piperina (2,25mg/Kg e 4,5 mg/Kg) e imunizados com o antígenos mantiveram os títulos de anticorpos IgM no 7º (Figura 22A) e 14º (Figura 22B) igual ao grupo TNP-Ficoll.

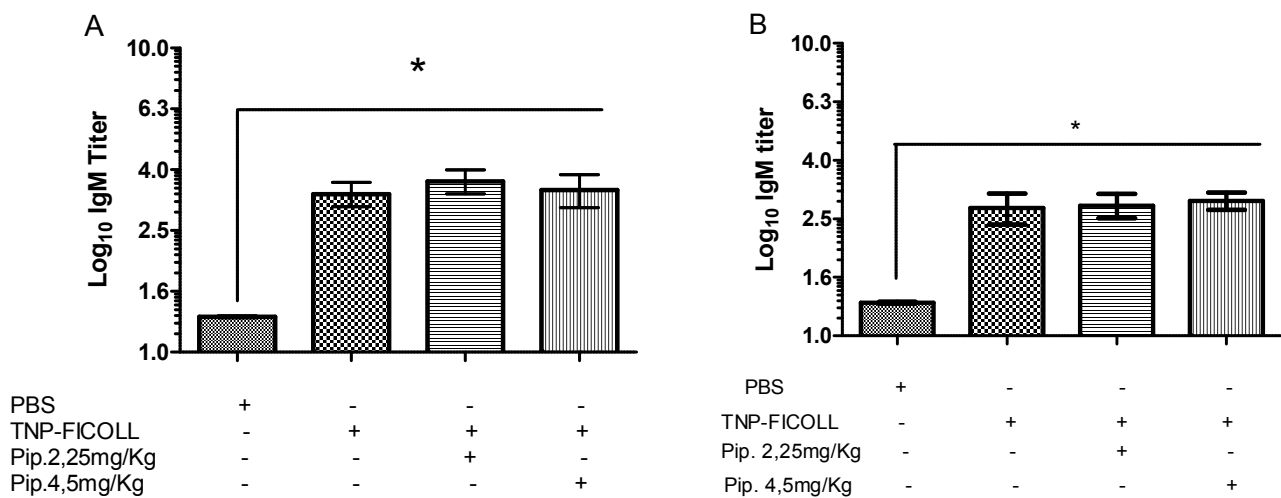


Figura 21. Efeito da piperina sobre a resposta Timo-independente. Tratamento in vivo com piperina não modula a produção de IgM depois da imunização com antígeno polissacarídeo. Camundongos foram tratados com piperina (2,25mg/Kg ou 4,5mg/Kg) por cinco dias consecutivos e no 5º dia, uma hora depois do tratamento com a piperina eles foram imunizados com TNP-Ficoll. Os plasmas dos animais foram obtidos no 7º(A) e 14º(B) dias depois da inoculação do TNP-Ficoll e os títulos do anti-TNP-Ficoll foram determinados por ELISA. Este gráfico representa a análise de três experimentos. A barra representa média ± desvio padrão, n=17. *** P<0,05.

4.15 EFEITO DA PIPERINA SOBRE A RESPOSTA TIMO-DEPENDENTE

A resposta timo-dependente foi avaliada pela densidade óptica de anticorpos IgG anti hemácia de carneiro (SRBC) do 14° e 21° dias após a inoculação do antígeno SRBC por ELISA. Os animais que receberam apenas o antígeno responderam com produção de IgG anti SRBC no 14° (Figura 23A) e 21° (Figura 23B) dias de forma crescente. Os animais tratados com piperina (2,25mg/Kg e 4,5 mg/Kg) e imunizados com o antígenos SRBC não tiveram diferença significativa na produção de anticorpos IgG no 14° (Figura 23A) e 21° (Figura 23B) dias em relação ao grupo imunizado apenas com o antígeno SRBC.

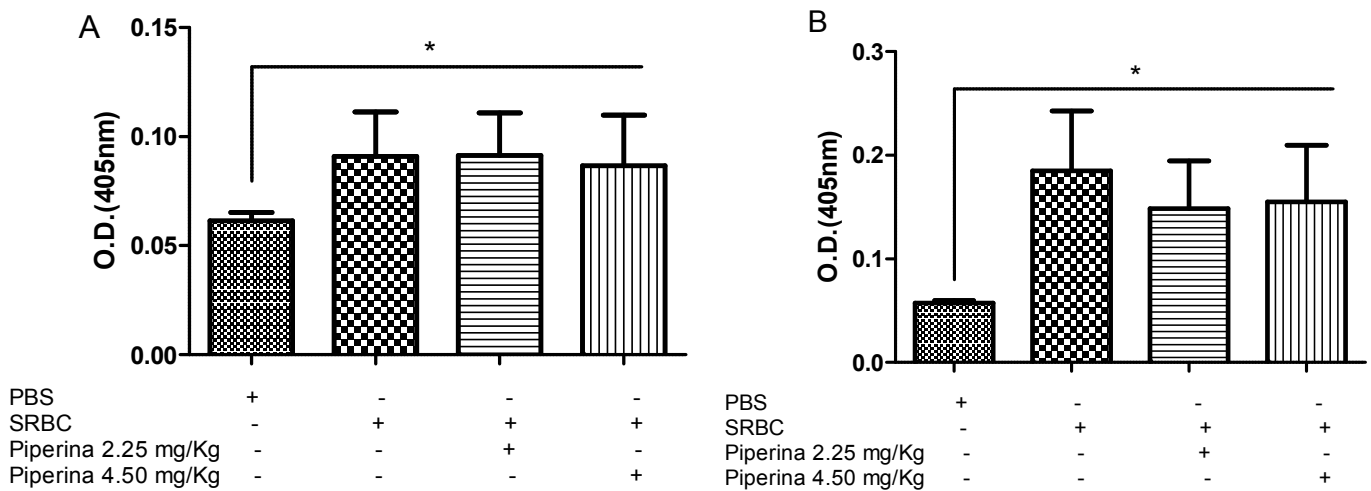


Figura 22 Efeito da piperina sobre a resposta timo-dependente. O tratamento in vivo com piperina não modula a produção de IgG após a imunização com antígenos proteicos. Camundongos foram tratados com piperina (2,25mg/Kg or 4,5mg/Kg) por 5 dias consecutivos, uma hora depois do tratamento com piperina eles foram imunizados com hemácias de carneiro (SRBC). Os plasmas dos animais foram obtidos nos 14°(A) e 21°(B) dias após a inoculação do antígeno SRBC e diluídos 1:8 para determinar a densidade óptica dos anticorpos anti-SRBC por ELISA. Este gráfico é análise representativa de dois experimentos independentes, n=6. As barras representam média ± desvio padrão. *** P<0,05.

5. DISCUSSÃO

A piperina é um composto extraído dos frutos secos da pimenta longa (*Piper longum*) e pimenta preta (*Piper nigrum*) e apresenta diversos efeitos benéficos à saúde como: anticancerígena, antioxidante, antiinflamatório, antimicrobiano, antidepressivo, antiplaquetário, dentre outros (SRINIVASAN, 2007). Neste trabalho, primeiramente avaliamos o efeito imunomodulatório da piperina sobre células B esplênicas purificadas através da proliferação celular, secreção de anticorpos IgM, expressão da molécula co-estimulatória CD86.

Os receptores BCR e TLRs, presentes na membrana dos linfócitos B, dão início a uma cascata de sinalização intracelular após o reconhecimento de moléculas antigênicas que levam a ativação, proliferação e produção de imunoglobulinas pela célula B (BEKEREDJIAN-DING; JEGO, 2009). Alguns compostos naturais têm sido utilizados para avaliar o efeito proliferativo e secretório de anticorpos pelas células B esplênicas estimuladas.

Decoté-Ricardo et al., 2009 em estudos *in vitro*, com culturas de células B esplênicas, estimuladas com diferentes antígenos: LPS (ligante de TLR4), Pam₃Cys (ligante de TLR2) e CpG (ligante de TLR9) observaram que a curcumina promove inibição dose dependente na proliferação dessas células estimuladas pelo receptor TLR4 e TLR9, e diminui os níveis de IgM no sobrenadante das culturas de célula B. Em outro trabalho foi realizado similar estudo, porém com o composto alcaloide warafteína, que inibiu a proliferação das células B estimuladas por LPS (ligante de TLR4), Pam₃Cys (ligante de TLR2), CpG (ligante de TLR9), anti-IgM (ligante de BCR) e por PMA + A23187. A warafteína, também foi capaz de inibir a produção de IgM no sobrenadante das culturas de célula B estimuladas por LPS e Pam₃Cys (ROCHA et al., 2010).

Este trabalho teve como intuito analisar primeiramente, o efeito da piperina sobre a proliferação das células B esplênicas purificada, com diferentes concentrações que não apresentaram citotoxicidade tanto nas células A20, quanto nas células esplênicas pelo método de XTT. Constatamos pelos nossos resultados, que a maior concentração de piperina utilizada foi capaz de reduzir a proliferação das células B, quando estimuladas por ambos receptores: BCR (anti-IgM) e TLR4 (LPS). No entanto, parece que a piperina apresenta uma ação mais efetiva sobre o receptor BCR, já que seu efeito sobre este receptor foi capaz de inibir 92,47% a proliferação das células B, enquanto que pela via do receptor TLR4 a redução da proliferação foi apenas 50,43%. Vimos também, que a piperina não apresenta nenhuma ação imunomodulatória sobre a proliferação das células B na ausência de estímulos. Este dado sugere que a piperina inibe a proliferação de células B purificada de camundongos, *in vitro*.

Entretanto, nosso resultado foi contraditório ao trabalho de Pathak; Khandelwal (2007) que estudaram a propriedade citoprotetora e imunomodulatória da piperina sobre esplenócitos, *in vitro*. Neste estudo, eles observaram que as concentrações 1 µg/ml, 10 µg/ml e 50 µg/ml de piperina não tinham influência sobre a proliferação de células esplênicas estimuladas com mitógenos (ConA e LPS). Isto pode ter ocorrido por se tratar de uma cultura heterogênea, a qual apresenta outros tipos celulares que podem interferir nos resultados, já que até o momento não havia sido testado o efeito da piperina sobre as células B purificadas.

A partir do nosso resultado sobre a ação da piperina na proliferação das células B, avaliamos o efeito deste alcaloide sobre a secreção de imunoglobulinas (IgM) por estas células estimuladas via receptor TLR4 (LPS). Tivemos como resultado, o efeito inibitório na secreção de IgM, em torno de 81,72%, com a utilização da piperina em sua maior concentração. Também vimos neste experimento, que a piperina não apresenta efeito imunomodulatório sobre a secreção de IgM pelas células B na ausência de estímulo. Este resultado sugere que a dose de piperina que inibe a proliferação é capaz de inibir a secreção de anticorpos IgM pelas células B, *in vitro*.

Posteriormente, nós avaliamos o efeito da piperina sobre a ativação das células B esplênicas purificadas, através da expressão da molécula co-estimulatória CD86 em população celular B220⁺. A ativação induzindo a expressão de CD86 (B7-2) sobre as células B, medeia sinais regulatórios pela via de sinalização da célula T auxiliar através da interação com CD28 e com o antígeno associado a linfócito citotóxico (CTLA-4). *In vitro* e *in vivo* descobertas sugerem que ligações com CD86 também gerem sinais intracelulares dentro da célula B, que positivamente regula a atividade da célula B (SUVAS et al., 2002; PODOJIL; SANDERS, 2003). Em nosso experimento, utilizando duas diferentes doses de piperina sobre células B esplênicas estimuladas com LPS (ligante de TLR4) ou anticorpo α -IgM (ligante de BCR), observamos que ambas as doses de piperina foram capazes de reduzir a expressão de CD86 sobre a população de células B220⁺, via receptor BCR e TLR4. Este resultado sugere que a piperina pode ser capaz de afetar a ativação das células B, devido à inibição da expressão da molécula CD86.

A regulação de CD86 e de outras moléculas co-estimulatórias pela piperina foram vista anteriormente, sobre células dendríticas. Bae et al., (2012) utilizaram células dendríticas imaturas, oriundas da medula óssea, pré tratadas com três diferentes doses de piperina e estimuladas com LPS (ligante de TLR4). Eles também observaram que a piperina foi capaz de diminuir a expressão de CD86, assim como de outras moléculas co-estimulatórias (CD40 e MHC-II) sobre as células dendríticas e esta inibição foi dose dependente.

A partir de nossos resultados *in vitro*, onde a piperina foi capaz de atuar sobre os linfócitos B reduzindo sua ativação, proliferação e secreção de anticorpos, resolvemos avaliar seus efeitos em um modelo de autoimunidade, Lupus Eritematoso Sistêmico (LES). Doença onde foco principal é a presença de células B autoreativas no organismo, produtoras de inúmeros autoanticorpos que promovem a destruição inflamatória de diversos órgãos e a manifestação clínica da doença através de erupções cutâneas, artrite e glomerulonefrite pela a formação de imunocomplexos (PUTTERMAN et al., 2012).

O modelo de LES, utilizado neste trabalho, tem como característica a formação de lipogranulomas no peritônio. Essas massas são constituídas por células plasmáticas tumorais (plasmocitoma), resultantes da reação inflamatória crônica induzida pelo hidrocarboneto pristane. Têm-se estabelecido que a citocina IL-6 é responsável pela sua formação a partir da hiperplasia das células B (REEVES et al., 2009, DEDERA et al., 1996). Em nossos experimentos, comprovamos a formação desses lipogranulomas, na região peritoneal, pelo nosso controle positivo. Os lipogranulomas apresentavam-se distribuídos por toda a cavidade peritoneal, podendo estar aderidos nos rins, fígado, baço e mesentério, no entanto, a sua presença era mais evidente na região do diafragma. No grupo tratado com piperina, vimos que esses lipogranulomas continuavam presentes na cavidade peritoneal, porém menores em tamanho. A redução no tamanho dessas massas pode estar relacionada com a função anticancerígena da piperina e a sua capacidade em reduzir IL-6, demonstrado em outros trabalhos.

Outra característica deste modelo é a formação de imunocomplexos e sua deposição nos rins e articulações levando a uma severa proteinúria e artrite, respectivamente (SATO et al.; 1995). Em relação à artrite, nós somente analisamos o edema da articulação, que provavelmente é decorrente de um processo inflamatório local oriundo da deposição de imunocomplexos. Os animais que receberam o tratamento com a maior concentração de piperina associado ao pristane desenvolveram precocemente o edema articular unilateral. Os demais grupos, que receberam o pristane como antígeno, vieram a desenvolver o edema articular três semanas depois, entretanto, não houve diferença significativa, entre os grupos em relação ao tamanho do edema.

Para avaliar a glomerulonefrite desenvolvida por este modelo de LES, nós dosamos os níveis de proteína na urina, a presença de lesões nos rins e a deposição de imunocomplexos

nos glomérulos renais no sexto mês de experimento. Satoh; Reeves, (1994) e Satoh et al. (1995) mostraram que uma única dose de pristane por via intraperitoneal em camundongos BALB/c produz altos níveis de autoanticorpos específicos para lúpus em um curto tempo e que o desenvolvimento da proteinúria e da glomerulonefrite ocorrem a partir de 4 e 6 meses após a inoculação do pristane, respectivamente.

Vimos que o nível de proteinúria dos animais, no sexto mês de experimento, estava elevado no grupo controle positivo e que a maior dose de piperina foi capaz de reduzir este nível. No entanto, pela histopatologia foram visualizados apenas raros glóbulos de proteínas em túbulos e rara hiperplasia na periferia de glomérulos, no grupo controle positivo, que não é sugestivo de lesão renal. Já na avaliação da deposição dos imunocomplexos nos glomérulos renais, as duas doses de piperina não foram capazes de reduzir esta deposição induzida pelo antígeno pristane.

Também avaliamos os parâmetros hematológicos dos animais no modelo LES. Vimos que a piperina não afeta a série vermelha (eritrócitos, hematócrito, VCM, CHCM) dos camundongos, mas na série branca, as duas doses de piperina mantiveram a leucocitose seguida de uma neutrofilia estimulada pelo pristane. Este aumento no número de neutrófilo sérico pode ser decorrente das alterações específicas de citocinas do LES (aumento de IL-8 e IL-17) que recrutam neutrófilos maduros para os locais de inflamação onde estão depositados os imunocomplexos ou devido à morte de neutrófilos precocemente (GARCIA-ROMO et al., 2011). Além disso, Cardoso et al. (2009) utilizando as mesmas doses de piperina em frangos de corte, também observou que este alcaloide promove apenas, sobre os parâmetros hematológicos, uma leucocitose devido ao aumento dos heterófilos, que são referente aos neutrófilos dos mamíferos. Outro parâmetro analisado por este mesmo grupo e repetidos em nosso trabalho, é a não interferência da piperina sobre o peso corpóreo dos animais.

Outro parâmetro hematológico, analisando neste trabalho, foi o número de plaquetas. Constatamos que as duas concentrações de piperina elevaram significativamente o número de plaquetas dos animais. Este resultado sugere que a elevação da plaqueta pela piperina pode intensificar a doença autoimune, já que foi visto em outros trabalhos que a plaqueta ativada amplifica a resposta inflamatória em modelo murino de artrite reumatoide e é um importante contribuidor para a patogênese de LES (BOILARD et al., 2010; DUFFAU et al., 2010).

Devido os dados obtidos *in vivo*, onde a piperina foi efetiva apenas na redução da proteinúria, não sendo capaz de eliminar ou pelo menos atenuar outros sintomas, que são característicos do modelo LES, como: os lipogranulomas, o edema articular decorrente da artrite e a deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais, nós resolvemos utilizar dois modelos *in vivo*, resposta timo-dependente e timo-independente, para constatar a veracidade do modelo do LES, já que nos experimentos *in vitro* a piperina apresentou efeito inibitório sobre os linfócitos B.

O efeito imunomodulatório da piperina *in vivo*, já foi visto em dois diferentes trabalhos, mas os resultados contraditórios entre eles podem ser, devido a diferente via de administração e concentração de piperina utilizada. Dogra; Khanna; Shanker (2004) avaliou a resposta da piperina sobre camundongos suíço usando doses orais de 1,12mg/Kg, 2,25mg/Kg e 4,5mg/Kg de piperina durante cinco dias consecutivos, concentrações iguais a 1/8, 1/4 e 1/2 das doses usadas em humanos (PIYACHATURAWAT; GLINSUKON; TOSKULKAO, 1983). Em seus resultados obtidos, Dogra; Khanna; Shanker (2004) observaram que a maior dose de piperina utilizada, tem consistente efeito imunossupressivo, já que reduziu o peso e a população de células do baço, o número de células formadoras de anticorpos do baço, a titulação dos anticorpos séricos e a resposta mitogênica das células B estimuladas por LPS.

Outro trabalho sobre a atividade imunomodulatória da piperina foi realizado por Sunila; Kuttan, 2004. Eles descreveram que a administração intraperitoneal de piperina (1,14mg/dose/animal) por cinco dias consecutivos promoveu aumento no número de células

na medula óssea e no número de células α -esterase positivas, elevou os títulos de anticorpos com níveis máximos no 18º dia após a imunização e os números de células formadoras de placa com níveis máximo no 5º dia após a imunização.

Neste trabalho, nós avaliamos *in vivo* o efeito da piperina na produção de imunoglobulina induzida por antígenos timo-independente (TNP-Ficoll) e timo-dependente (SRBC). As doses utilizadas neste experimento não mostraram efeito tóxico no baço, fígado e rins (dado não mostrado), e estas concentrações já foram utilizadas em outro estudo *in vivo* (DOGRA; KHANNA; SHANKER, 2004). No experimento com o antígeno TNP-Ficoll, que gera uma resposta timo-independente do tipo 2, nós evidenciamos que as duas doses utilizadas de piperina não afetaram a titulação de IgM sérico no 7º e 14º dias após a imunização com TNP-Ficoll. Essas mesmas doses de piperina, também foram testadas para antígenos SRBC, que neste caso resulta na resposta timo-dependente. Nós constatamos, que os níveis séricos de IgG não foi alterada pela piperina no 14º e 21º dias após a imunização com SRBC. A partir desses resultados podemos sugerir que a piperina *in vivo* não modula a produção de anticorpos na resposta antígeno timo-dependente e timo-independente.

6. CONCLUSÕES

Com resultados obtidos nesse estudo podemos concluir que:

- As concentrações de piperina menores ou igual a 15 μ M não possuem citotoxicidade sobre as células A20 e as células esplênicas;
- A piperina inibe a proliferação dos linfócitos B esplênicos estimulados via receptor BCR e TLR4;
- A piperina inibe a secreção de IgM pelos linfócitos B estimulados via receptor TLR4;
- A piperina interfere na ativação das células B pela inibição da molécula co-estimulatória CD86;
- A piperina reduz a proteinúria dos animais do modelo LES;
- A piperina promove uma trombocitopenia no modelo LES;
- A piperina não interfere na formação e deposição dos imunocomplexos nos glomérulos renais, no desenvolvimento dos lipogranulomas e do edema articular no modelo LES;
- A piperina não interfere na secreção de IgM, na resposta timo-independente;
- A piperina não interfere na secreção de IgG na resposta timo-dependente.

A partir desses nossos resultados, podemos concluir que a piperina, alcaloide extraído dos frutos secos da *Piper nigrum* e *Piper longum*, tem efeito inibitório sobre os linfócitos B *in vitro*, pois inibe a proliferação e secreção de IgM pelas células B como também, interfere em sua ativação devido a sua inibição sobre a expressão da molécula CD86. Entretanto, a piperina não apresenta efeito modulatório *in vivo*, demonstrado no modelo de autoimunidade (LES), na resposta a antígenos timo-independente e a antígenos timo-dependente, que pode ser explicado por ser um sistema mais complexo, onde há ação de diversas células, citocinas e, além disso, a metabolização da piperina no fígado e sua excreção. Todos esses fatores podem afetar a ação da piperina sobre os linfócitos B.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. **In natural products**. In: IKAN, R. A laboratory guide. 2. ed. New York: Academic, 1991. p.233-238.

ACHTMAN, A.H.; PKEN, U.E.H.; BERNERT, C.; LIPP, M. CCR7-deficient mice develop atypically persistent germinal centers in response to thymus-independent type 2 antigens. **Journal of Leukocyte Biology**, v.85, n.3, p.409-417, 2009.

ALLMAN, D.; LINDSLEY, R.C.; DEMUTH, W.; RUDD, K.; SHINTON, S.A.; HARDY, R.R. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. **Journal of immunology**, v.167, n.12, p.6834-6840, 2001.

ALLMAN, D.; PILLAI, S. Peripheral B cell subsets. **Current opinion in immunology**, v.20, n.2, p.149-157, 2008.

ALMQVIST, N.; MÅRTENSSON, I.L. The pre-B cell receptor; selecting for or against autoreactivity. **Scandinavian journal of immunology**, v.76, n.3, p.256-262, 2012.

AMUR, S.; PAREKH, A.; MUMMANENI, P. Sex differences and genomics in autoimmune diseases. **Journal of autoimmunity**, v.38, p.J254-J265, 2012.

ANOLIK, J.H. B Cell Biology and Dysfunction in SLE. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v.65, n.3, p.182-186, 2007.

ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; CUNHA, E.V.L. DA; CHAVES, M.C.; GRAY, A.I. piperdardina, a piperidine alkaloid from *piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.44, p.559-561, 1997.

ARBUCKLE, M.R.; MCCLAIN, M.T.; RUBERTONE, M.V.; SCOFIELD, R.H.; DENNIS, G.J.; JAMES, J.A.; HARLEY, J.B. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. **The new england journal of medicine**, v.349, p.1526-1533, 2003.

ATAL, C.K.; DUBEY, R.K.; SINGH, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.232, n.1, p.258-262, 1985.

BADMAEV, V.; MAJEED, M.; PRAKASH, L. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme Q10 following oral supplementation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, n.2, p.109-113, 2000.

BAE, G-S.; JONG-JIN KIM, J-J.; PARK, K-C.; KOO, B.S.; JO, I-J.; CHOI, S.B.; LEE, C.H.; JUNG, W-S.; CHO, J-H.; HONG, S-H.; SONG, H-J; SHIN, Y.K.; PARK, S-J. Piperine Inhibits Lipopolysaccharide-induced Maturation of Bone-marrow-derived Dendritic Cells Through Inhibition of ERK and JNK Activation. **Phytotherapy research**, v.26, p1893-1897, 2012.

BAE, G-S.; KIM, M-S.; JEONG, J.; LEE, H-Y.; PARK, K-C.; KOO, B.S.; KIM, B-J.; KIM, T-H.; LEE, S.H.; HWANG, S-Y.; SHIN, Y.K.; SONG, H-J.; PARK, S-J. Piperine ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the activation of mitogen activated protein kinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.410, p.382-388, 2011.

BAE, G-S.; KIM, M-S.; JUNG, W-S.; SEO, S-W.; YUN, S-W.; SUNG GYU KIM, S.G.; PARK, R-K.; KIM, E-C.; SONG, H-J.; PARK, S-J. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. **European Journal of Pharmacology**, v.642, p.154-162, 2010.

BALÁZS, M.; MARTIN, F.; ZHOU, T.; KEARNEY, J.F. Blood Dendritic Cells Interact with Splenic Marginal Zone B Cells to Initiate T-Independent Immune Responses. **Immunity**, v.17, p.341–352, 2002.

BANG, J.S.; OH DA, H.; CHOI, H.M.; SUR, B.J.; LIM, S.J.; KIM, J.Y.; YANG, H.I.; YOO, M.C.; HAHM, D.H.; KIM, K.S. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. **Arthritis research & therapy**, v.11, n.2, p.R49, 2009.

BANO, G.; AMLA, V.; RAINA, R.K.; ZUTSHI, U.; CHOPRA, C.L. The effect of piperine on pharmacokinetics of phenytoin in healthy volunteers. **Planta Medica**, v.53, n.6, p.568–569, 1987

BANO, G.; RAINA, R.K.; ZUTSHI, U.; BEDI, K.L.; JOHRI, R.K.; SHARMA, S.C. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **European journal of clinical pharmacology**, v.41, n.6, p.615-617, 1991.

BAUMGARTH, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p.34-46, 2011.

BEKEREDJIAN-DING, I.; JEGO, G. Toll-like receptors – sentries in the B-cell response. **Immunology**, v.128, p.311–323, 2009.

BENTO, C.A.; MELO, M.B.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PEÇANHA, L.M. Glycoinositol phospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production in vitro. **Journal of immunology**, v.157, p.4996-5001, 1996.

BETTELLI, E.; NICHOLSON, L.B.; KUCHROO, V.K. IL-10, a key effector regulatory cytokine in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of autoimmunity**, v.20, n.4, p.265-267, 2003.

BIELLA, C. DE A.; SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A.; DIAS-BARUFFI, M.; PEREIRA-CROTT, L.S. Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical screening of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aqueous extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.6, p.569-577, 2008.

BOEGLIN, E.; SMULSKI, C.R.; BRUN, S.; MILOSEVIC, S.; SCHNEIDER, P.; FOURNEL, S. Toll-like receptor agonists synergize with CD40L to induce either proliferation or plasma cell differentiation of mouse B cells. **Plos one**, v.6, n.10, p.e25542, 2011.

BOILARD, E.; NIGROVIC, P.A.; LARABEE, K.; WATTS, G.F.M.;¹ COBLYN, J.; WEINBLATT, M.E.; MASSAROTTI, E.M.; REMOLD-O'DONNELL, E.; FARNDAL, R.W.; WARE, J.; LEE, D.M. Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production. **Science**, v.327, n.5965, p.580-583, 2010.

BONILLA, F.A.; HANS, C.; OETTGEN, H.C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, s.2, p. S33-S40, 2010.

BOOTH, J.; WILSON, H.; JIMBO, S.; MUTWIRI, G. Modulation of B cell responses by Toll-like receptors. **Cell and Tissue Research**, v.343, p.131-140, 2011.

BROWNE, E.P. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. **Immunology**, v.136, p.370-379, 2012.

BRUNSWICK, M.; FINKLELMAN, F.D.; HIGHET, P.F.; IMMAN, J.K.; DINTZIS, H.M.; MOND, J.J. Picogram quantities of anti-Ig antibodies couples to dextran induce B cell proliferation. **Journal of immunology**, v.140, p.3364-3372, 1988.

CALVANI, N.; CARICCHIO, R.; TUCCI, M.; SOBEL, E.S.; SILVESTRIS, F.; TARTAGLIA, P.; RICHARDS, H.B. Induction of apoptosis by the hydrocarbon oil pristane: implications for pristane-induced lupus. **Journal of immunology**, v.175, n.7, p.4777-4782, 2005.

CAMPOPIANO, J.C. **Influência da ativação de macrófagos via receptor do tipo Toll (TLRs) na produção de fatores moduladores da sobrevivência de linfócitos T**. 2010. 39p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CARDOSO, V.S.; DE LIMA, C.A.R.; DE LIMA, M.E.F.; DORNELES, L.E.G.; FILHO, W.L.T.; LISBOA, R.S.; JUNIOR, D.S.G.; DIREITO, G.M.; DANELLI, M.G.G.M. Administração oral de piperina em frangos de corte. **Ciência rural**, v.39, n.5, p.1521-1256, 2009.

CAREY, J.B.; MOFFATT-BLUE, C.S.; WATSON, L.C.; GAVIN, A.L.; FEENEY, A.J. Repertoire-based selection into the marginal zone compartment during B cell development. **The journal of experimental medicine**, v.205, n.9, p.2043-2052, 2008.

CARRASCO, Y.R.; BATISTA, F.D. B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands. **Current Opinion in Immunology**, v.18, n.3, p.286-91, 2006.

CERUTTI, A.; PUGA, I.; COLS, M. New helping friends for B cells. **European Journal of Immunology**, v.42, p.1956-1968, 2012.

CHAN, T.D.; GATTO, D.; WOOD, K.; CAMIDGE, T.; BASTEN, A.; BRINK, R. Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. **Journal of immunology**, v.183, n.5, p.3139-3149, 2009.

CHUCHAWANKUL, S.; KHORANA, N.; POOVORAWAN, Y. Piperine inhibits cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. **Genetics and molecular research**, v.11, n.1, p.617-27, 2012.

CHUNG, J.B.; BAUMEISTER, M.A.; MONROE, J.G. Cutting edge: differential sequestration of plasma membrane-associated B cell antigen receptor in mature and immature B cells into glycosphingolipid-enriched domains. **Journal of immunology**, v.166, n.2, p.736-740, 2001.

CHUNG, J.B.; SATER, R.A.; FIELDS, M.L.; ERIKSON, J.; MONROE, J.G. CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. **International immunology**, v.14, n.2, p.157-166, 2002.

CHUNG, J.B.; SILVERMAN, M.; MONROE, J.G. Transitional B cells: step by step towards immune competence. **Trends in Immunology**, v.24, n.6, p.342-348, 2003.

CIPRIANI, P.; CARUBBI, F.; LIAKOULI, V.; MARRELLI, A.; PERRICONE, C.; PERRICONE, R.; ALESSE, E.; GIACOMELLI, R. Stem cells in autoimmune diseases: Implications for pathogenesis and future trends in therapy. **Autoimmunity reviews**, xxx, 2012.

CLATZA, A.; BONIFAZ, L.C.; VIGNALI, D.A.A.; MORENO, J. CD40-Induced Aggregation of MHC Class II and CD80 on the Cell Surface Leads to an Early Enhancement in Antigen Presentation. **Journal of immunology**, v.171, p.6478-6487, 2003.

COJOCARU, M.; COJOCARU, I.M.; SILOSI, I.; VRABIE, C.D. Manifestations of systemic lupus erythematosus. **Maedica**, v.6, n.4, p.330-336, 2011.

CONNOLLY, D.J.; O'NEILL, L.A. New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. **Current opinion in immunology**, v.12, n.4, p.510-518, 2012.

DAL PORTO, J.M.; GAULD, S.B.; MERRELL, K.T.; MILLS, D.; PUGH-BERNARD, A.E.; CAMBIER, J. B cell antigen receptor signaling 101. **Molecular Immunology**, v.41, n.6-7, p. 599-613, 2004.

DECOTÉ-RICARDO, D.; CHAGAS, K.K.; ROCHA, J.D.; REDNER, P.; LOPES, U.G.; CAMBIER, J.C.; BARROS, BARROS DE ARRUDA L., PEÇANHA, L.M. Modulation of in vitro murine B-lymphocyte response by curcumin. **Phytomedicine**, v.16, n.10, p.982-988, 2009.

DEDERA, D.A.; URASHIMA, M.; CHAUHAN, D.; LEBRUN, D.P.; BRONSON, R.T.; ANDERSON, K.C. Interleukin-6 is required for pristane-induced plasma cell hyperplasia in mice. **British journal of haematology**, v.94, n.1, p.53-61, 1996.

DEFRANCO, A.L.; ROOKHUIZEN, D.C.; HOU, B. Contribution of Toll-like receptor signaling to germinal center antibody responses. **Immunological review**, v.247, n.1, p.64-72, 2012.

DE PAIVA, L.; COSTA, K.M.; DO CANTO, F.B.; CABRAL, V.R.; FUCS, R.; NOBREGA, A.; RUMJANEK, V. Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. **Immunobiology**, v. 216, p. 1038-1043, 2011.

DOGRA, R.K.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v.196, n.3, p.229-236, 2004.

DORIA, A.; IACCARINO, L.; GHIRARDELLO, A.; ZAMPIERI, S.; ARIENTI, S.; SARZI-PUTTINI, P.; ATZENI, F.; PICCOLI, A.; TODESCO, S. Long-Term Prognosis and Causes of Death in Systemic Lupus Erythematosus. **The American Journal of Medicine**, v.119, p.700-706, 2006.

DORSHKIND, K.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. **Nature Reviews Immunology**, v.7, p.213-219, 2007.

DOUCETTE, C.D.; HILCHIE, A.L.; LIWSKI, R.; HOSKIN, D.W. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, n.1, p.231-239, 2013.

DUFFAU, P.; SENESCHAL, J.; NICCO, C.; RICHEZ, C.; LAZARO, E.; DOUCHET, I.; BORDES, C.; VIALARD, J-F.; GOULVESTRE, C.; PELLEGRIN, J-L.; WEIL, B.; MOREAU, J-F.; BATTEUX, F.; BLANCO, P. Platelet CD154 Potentiates Interferon- α Secretion by Plasmacytoid Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, v.2, p.47ra63, 2010.

FLAISHON, L.; HERSHKOVIZ, R.; LANTNER, F.; LIDER, O.; ALON, R.; LEVO, Y.; FLAVELL, R.A.; SHACHAR, I. Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. **The journal of experimental medicine**, v.192, n.9, p.1381-1388, 2000.

FURTADO, J.; ISENBERG, D.A. B cell elimination in systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v.146, p.90-103, 2013.

GAO, J.; MA, X.; GU, W.; FU, M.; AN, J.; XING, Y.; GAO, T.; LI, W.; LIU, Y. Novel functions of murine B1 cells: Active phagocytic and microbicidal abilities. **European Journal of Immunology**, v.42, p.982-992, 2012.

GARCIA-ROMO, G.S.; CAIELLI, S.; VEGA, B.; CONNOLLY, J.; ALLANTAZ, F.; XU, Z.; PUNARO, M.; BAISCH, J.; GUIDUCCI, C.; COFFMAN, R.L.; BARRAT, F.J.; BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V. Netting Neutrophils are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, v.3, n.73, p.73rs20, 2011.

GERONDAKIS, S.; GRUMONT, R.J.; BANERJEE, A. Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. **Immunology and cell biology**, v.85, n.6, p.471-475, 2007.

GOODNOW, C.C.; VINUESA, C.G.; RANDALL, K.L.; MACKAY, F.; BRINK, R. Control systems and decision making for antibody production. **Nature immunology**, v.11, n.8, p.681-688, 2010.

GRANT, C.F.J.; LEFEVRE, E.A.; CARR, B.V.; PRENTICE, H.; GUBBINS, S.; POLLARD, A.J.; CHARREYRE, C.; CHARLESTON, B. Assessment of T-dependent and T-independent immune responses in cattle using a B cell ELISPOT assay. **Veterinary Research**, v. 43, n.68, p.1-9, 2012.

GRIMALDI, C.M.; HILL, L.; XU, X.; PEEVA, E.; DIAMOND, B. Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. **Molecular immunology**, v.42, n.7, p.811-820, 2005.

HASTINGS, W.D.; GURDAK, S.M.; TUMANG, J.R.; ROTHSTEIN, T.L. CD5+/Mac-1-peritoneal B cells: a novel B cell subset that exhibits characteristics of B-1 cells. **Immunology Letters**, v.105, n.1, p.90-96, 2006.

HAYASHI, E.A.; GRANATO, A.; PAIVA, L.S.; BERTHO, A.L.; BELLIO, M.; NOBREGA, A. TLR4 promotes B cell maturation: independence and cooperation with B lymphocyte-activating factor. **Journal of Immunology**, v.184, n.9, p.4662-72, 2010.

HOFFMANN, K.F.; CHEEVER, A.W.; WYNN, T.A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **The journal of immunology**, v.164, n.12, p.6406-6416, 2000.

JIN, M.J.; HAN, H.K. Effect of piperine, a major component of black pepper, on the intestinal absorption of fexofenadine and its implication on food-drug interaction. **Journal of Food Science**, v.75, n.3, p.H93-6, 2010.

JOHNSON, J.J.; NIHAL, M.; SIDDIQUI, I.A.; SCARLETT, C.O.; BAILEY, H.H.; MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. **Molecular nutrition & food research**, v.55, n.8, p.1169-1176, 2011.

KAGAN, J.C.; MEDZHITOV, R. Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. **Cell**, v.125, p.943-955, 2006.

KANAYAMA, N.; CASCALHO, M.; OHMORI, H. Analysis of Marginal Zone B Cell Development in the Mouse with Limited B Cell Diversity: Role of the Antigen Receptor Signals in the Recruitment of B Cells to the Marginal Zone. **The Journal of Immunology**, v.174, n.3, 2005.

KANTOR, A. B.; STALL, A.M.; ADAMS, S.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.A. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. **Proceedings of the national academy of sciences**, v.89, p.3320-3324, 1992.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v.11, p.373-384, 2010.

KESSEL, A.; HAJ, T.; PERI, R.; SNIR, A.; MELAMED, D.; SABO, E.; TOUBI, E. Human CD19(+)/CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. **Autoimmunity reviews**, v.11, n.9, p.670-677, 2012.

KIM, H.G.; HAN, E.H.; JANG, W-S.; CHOI, J.H.; KHANAL, T.; PARK, B.H.;TRAN, T.P.; CHUNG, Y.C.; JEONG, H.G. Piperine inhibits PMA-induced cyclooxygenase-2 expression through downregulating NF- κ B, C/EBP and AP-1 signaling pathways in murine macrophages. **Food and chemical toxicology**, v.50, p.2342-2348, 2012.

KIM, K.J.; KANELLOPOULOS-LANGEVEN, C.; MERWIN, R.M.; SACHS, D.H.; ASOFSKY, R. Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. **Journal of immunology**, v.122, n.2, p.549-554, 1979.

KIM, S.H.; LEE, Y.C. Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.61, n.3, p.353-359, 2009.

KO, E.; LEE, Y.; PARK, N.; CHO, C.; YIM, Y-N.; KIM, J.; KIM, Y.S.; KIM, D.; SHIN, M-K.; HONG, M-C.; BAE, H. *Sophorae radix* reduces autoimmune response in NZB/w F1 systemic lupus erythematosus mouse model. **Lupus**, v.16, p.335-341, 2007.

KO, E.; LEE, Y.; PARK, N.; CHO, C.; YIM, Y-N.; KIM, J.;KIM, Y.S.; KIM, D.; SHIN, M-K.; HONG, M-C.; BAE, H. *Sophorae radix* reduces autoimmune response in NZB/w F1 systemic lupus erythematosus mouse model. **Lupus**, v.16, p.335-341, 2007.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. Rediscovering natural products as a source of new drugs. **Discovery medicine**, v.5, n.26, p.159-164, 2005.

KOLEVA, I.I.; BEEK, T.A.V.; SOFFERS, A.E.M.F.; DUSEMUND, B.; RIETJENS, I.M.C.M. Alkaloids in the human food chain – Natural occurrence and possible adverse effects. **Molecular nutrition & food research**, n.56, p.30-52, 2012.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and biophysical research communications**, v.388, p.621-625, 2009.

KUMAR, S.; KAMBOJ, J.; SUMAN, SHARMA, S. Overview for Various Aspects of the Health Benefits of *Piper Longum* Linn. Fruit. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v.4, p. 134-140, 2011.

KUMAR, S.; SINGHAL, V.; ROSHAN, R.; SHARMA, A.; REMBHOTKAR, G.W.; GHOSH, B. Piperine inhibits TNF- α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF- κ B and I κ B kinase activation. **European Journal of Pharmacology**, v.575, p.177-186, 2007.

KUROSAKI, T. Regulation of BCR signaling. **Molecular Immunology**, v.48, p.1287-1291, 2011.

LI, J.W.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v.325, n.5937, p.161-165, 2009.

LIED, G.A.; LILLESTØL, K.; VALEUR, J.; BERSTAD, A. Intestinal B cell-activating factor: an indicator of non-IgE-mediated hypersensitivity reactions to food? **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.32, n.1, p.66-73, 2010.

LIN, M.M.; ZHU, M.; SCHARFF, M.D. Sequence dependent hypermutation of the immunoglobulin heavy chain in cultured B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, n.10, p.5284-5289,1997.

LLORENTE, L.; RICHAUD-PATIN, Y.; GARCÍA-PADILLA, C.; CLARET, E.; JAKEZ-OCAMPO, J.; CARDIEL, M.H.; ALCOCCER-VARELA, J.; GRANGEOT-KEROS, L.; ALARCÓN-SEGOVIA, D.; WIJDENES, J.; GALANAUD, P.; EMILIE, D. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. **Arthritis & rheumatims**, v.43, n.8, p.1790-1800, 2000.

LODER, F.; MUTSCHLER, B.; RAY, R.J.; PAIGE, C.J.; SIDERAS, P.; TORRES, R.; LAMERS, M.C.; CARSETTI, R. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. **The journal of experimental medicine**, v.190, n.1, p.75-89, 1999.

LU Q. The critical importance of epigenetics in autoimmunity. **Journal of immunity**, doi: 10.1016/j.jaut.2013.01.010, 2013

MARRON, T.U.; YU, J.E.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Toll-like receptor function in primary B cell defects. **Frontiers in Bioscience**, v.4, p.1853-1863, 2012.

MARSHALL-CLARKE, S.; TASKER, L.; PARKHOUSE, R.M. Immature B lymphocytes from adult bone marrow exhibit a selective defect in induced hyperexpression of major histocompatibility complex class II and fail to show B7.2 induction. **Immunology**, v.100, n.2, p.141–151, 2000.

MARTIN, F.; OLIVER, A.M.; KEARNEY, J.F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. **Immunity**, v.14, n.5, p.617-629, 2001.

MAURI, C. EHRENSTEIN, M.R. The ‘short’ history of regulatory B cells. **Trends in immunology**, v.29, n.1, p.34-40, 2008.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. A human homologue of the Drosophila toll protein signals activation of adaptative immunity. **Nature**, v.388, n.6640, p.394-397, 1997.

MERRELL, K.T.; BENSCHOP, R.J.; GAULD, S.B.; AVISZUS, K.; DECOTE-RICARDO, D.; WYSOCKI, L.J.; CAMBIER, J.C. Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. **Immunity**, v.25, n.6, p.953-62, 2006.

MINHAS, U.; MINZ, R.; DAS, P.; BHATNAGAR, A. Therapeutic effect of Withania somnifera on pristane-induced model of SLE. **Inflammopharmacology**, v.20, n.4, p.195-205, 2012.

MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E.; SMITH, R.N.; PREFFER, F.I.; BHAN, A.K. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. **The journal of experimental medicine**, v.186, n.10, p.1749-1756, 1997.

MIZUTANI, A.; SHAHEEN, V.M.; YOSHIDA, H.; AKAOGI, J.; KURODA, Y.; NACIONALES, D.C.; YAMASAKI, Y.; HIRAKATA, M.; ONO, N.; REEVES, W.H.; SATOH, M. Pristane-induced autoimmunity in germ-free mice, **Clinical immunology**, v.114, p.110-118, 2005.

MONROE, J.G. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. **Nature reviews immunology**, v.6, n.4, p.283-294, 2006.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K. B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. **Immunity**, v.36, n.1, p.13-21, 2012.

MURUNIKKARA, V.; PRAGASAM, S.J.; KODANDARAMAN, G.; SABINA, E.P.; RASOOL, M. Anti-inflammatory effect of piperine in adjuvant-induced arthritic rats--a biochemical approach. **Inflammation**, v.35, n.4, p.1348-1356, 2012.

NASHI, E.; WANG, Y.; DIAMOND, B. The role of B cells in lupus pathogenesis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.42, n.4, p.543-550, 2010.

NIKOLOVA, K.A.; MIHAYLOVA, N.M.; VOYNOVA, E.N.; TCHORBANOV, A.I.; VOLL, R.E.; VASSILEV, T.L. Selective silencing of autoreactive B lymphocytes-Following the Nature's way. **Autoimmunity review**, v.9, n.11, p.775-779, 2010.

OH-HORA, M.; JOHMURA, S.; HASHIMOTO, A.; HIKIDA, M.; KUROSAKI, T. Requirement for Ras Guanine Nucleotide Releasing Protein 3 in Coupling Phospholipase C- γ 2 to Ras in B Cell Receptor Signaling. **The journal of experimental medicine**, v.198, n.12, p.1841-1851, 2003.

PATHAK N, KHANDELWAL S. Immunomodulatory role of piperine in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.28, n.1, p.52-60, 2009.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Comparative efficacy of piperine, curcumin and picroliv against Cd immunotoxicity in mice. **Biometals**, v.21, n.6, p.649-661, 2008.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Cytoprotective and immunomodulating properties of piperine on murine splenocytes: an in vitro study. **European journal of pharmacology**, v.576, n.1-3, p.160-170, 2007.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Modulation of cadmium induced alterations in murine thymocytes by piperine: oxidative stress, apoptosis, phenotyping and blastogenesis. **Biochemical Pharmacology**, v.72, n.4, p.486-497, 2006.

PICCININI, A.M.; MIDWOOD, K.S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. **Inflammatory mediators**, doi: 672395. 10.1155/2010/672395, 2010.

PILLAI, S.; MATTOO, H.; CARIAPPA, A. B cells and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v.23, n.6, p.721-731, 2011.

PIYACHATURAWAT, P.; GLINSUKON, T.; TOSKULKAO, C. Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. **Toxicology Letters**, v.16, p.351-359, 1983.

PODOJIL, J.R.; SANDERS, V.M. Selective regulation of mature IgG1 transcription by CD86 and beta 2-adrenergic receptor stimulation. **Journal of immunology**, v.170, n.10, p.5143-5151, 2003.

POSTAL, M.; COSTALLAT, L.T.; APPENZELLER, S. Biological Therapy in Systemic Lupus Erythematosus. **International journal of rheumatology**, online, 2012.

PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of nitric oxide (NO) and TNF-alpha production. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v.25, n.3, p.337-346, 2003.

PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. **Clinical & experimental metastasis**, v.19, n.8, p.703-708, 2002.

PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. **International immunopharmacology**, v.4, p.1795-1803, 2004.

PRAKASH, U.N.; SRINIVASAN, K. Enhanced intestinal uptake of iron, zinc and calcium in rats fed pungent spice principles - Piperine, capsaicin and ginger (*Zingiber officinale*). **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, :pii: S0946-672X(12)00174-5. 10.1016/j.jtemb.2012.11.003, 2013.

PUTTERMAN, C.; CARICCHIO, R.; DAVIDSON, A.; PERLMAN, H. Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical and Developmental Immunology**, publicado online, 2012.

QUINTANA, F.J.; SOLOMON, A.; COHEN, I.R.; NUSSBAUM, G. Induction of IgG3 to LPS via Toll-like receptor 4 co-stimulation. **Plos One**, v.3, n.10, 2008.

RABIN, E.M.; OHARA, J.; PAUL, W.E. B cell stimulatory factor 1 activates resting B cells. **Proceedings of the National. Academy Sciences**, v.82, p.2935-2939, 1985.

RANKIN, A.L.; MACLEOD, H.; KEEGAN, S.; ANDREYEVA, T.; LOWE, L.; BLOOM, L.; COLLINS, M.; NICKERSON-NUTTER, C.; YOUNG, D.; GUAY, H. IL-21 Receptor is critical for the development of memory B cell responses. **Journal of Immunology**, v.186, p.667-674, 2011.

REEN, R.K.; WIEBEL, F.J.; SINGH, J. Piperine inhibits aflatoxin B1-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, n.3, p.165-173, 1997.

REEVES, W.H.; LEE, P.Y.; WEINSTEIN, J.S.; SATOH, M.; LU, L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. **Trends in immunology**, v.30, n.9, p.455-64, 2009.

RIBEIRO, T.S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J.O.; MENDONCA-PREVIATO, L.; HEISE, N.; DE LIMA, M.E.F. Toxic Effects of Natural Piperine and Its Derivatives on Epimastigotes and Amastigotes of *Trypanosoma Cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, n.13, p.3555-3558, 2004.

RICKERT, R.C. Regulation of B lymphocyte activation by complement C3 and the B cell coreceptor complex. **Current opinion in immunology**, v.17, p.237-243, 2005.

ROCHA, J.D.; DECOTÉ-RICARDO, D.; REDNER, P.; LOPES, U.G.; BARBOSA-FILHO, J.M.; PIUVEZAM, M.R.; ARRUDA, L.B.; PEÇANHA, L.M.T. Inhibitory effect of the alkaloid warifteine purified from *Cissampelos sympodialis* on B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Planta medica**, v.76, n.4, p.325-330, 2010.

RODRÍGUEZ-PINTO D. B cells as antigen presenting cells. **Cellular immunology**, v.238, n.2, p.67-75, 2005.

RUPRECHT, C.R.; LANZAVECCHIA, A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. **European journal of immunology**, v.36, p.810-816, 2006.

SAIJO, K.; MECKLENBRÄUKER, I.; SANTANA, A.; LEITGER, M.; SCHMEDT, C.; TARAKHOVSKY, A. Protein Kinase C β Controls Nuclear Factor κ B Activation in B Cells Through Selective Regulation of the I κ B Kinase α . **The journal of experimental medicine**, v.195, n.12, p.1647-1652, 2002.

SATOH, M.; KUMAR, A.; KANWAR, Y.S.; REEVES, W.H. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.10934-10938, 1995.

SATOH, M.; REEVES, W.H. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. **The journal of experimental medicine**, v.180, p.2341-2346, 1994.

SCHARENBERG, A.M.; HUMPHRIES, L.A.; RAWLINGS, D.J. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. **Nature Reviews Immunology**, v.7, n.10, p.778-789, 2007.

SCHATZ, D.G.; OETTINGER, M.A.; BALTIMORE, D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. **Cell**, v.59, p.1035-1048, 1989.

SCHIEMANN, B.; GOMMERMAN, J.L.; VORA, K.; CACHERO, T.G.; SHULGA-MORSKAYA, S.; DOBLES, M.; FREW, E.; SCOTT, M.L. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. **Science**, v.293, n.5537, p.2111-2114, 2001.

SCUPOLI, M.T.; PIZZOLO, G. Signaling Pathways Activated by the B-Cell Receptor in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Expert review of hematology**, v.5, n.3, p.341-348, 2012.

SEHGAL, A.; KUMAR, M.; JAIN, M.; DHAWAN, D.K. Combined effects of curcumin and piperine in ameliorating benzo(a)pyrene induced DNA damage. **Food and chemical toxicology**, v.49, n.11, p.3002-3006, 2011.

SELVENDIRAN, K.; PADMAVATHI, R.; MAGESH, V.; SAKTHISEKARAN, D. Preliminary study on inhibition of genotoxicity by piperine in mice. **Fitoterapia**, v.76, n.3-4, p.296-300, 2005.

SHARMA, S.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S.K.; AGREWALA, J.N. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. **Clinical experimental immunology**, v.147, n.1, p.155-163, 2007.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P.S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta medica**, v.64, n.4, p.353-359, 1998.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P.S.S.R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta medica**, v.64, n.4, p.353-357, 1998.

SIDDIQUI, B.S., BEGUM, S.; GULZAR, T.; FARHAT; NOOR, F. An amide from fruits of *piper nigrum*. **Phytochemistry**, v.45 n.8, p.1617-1619, 1997.

Signaling through surface IgM in tolerance-susceptible immature murine B lymphocytes. Developmentally regulated differences in transmembrane signaling in splenic B cells from adult and neonatal mice. **Journal of immunology**, v.146, n.5, p.1446-1454, 1991.

SINGH, J.; REEN, R.K.; WIEBEL, F.J. Piperine, a major ingredient of black and long peppers, protects against AFB1-induced cytotoxicity and micronuclei formation in H4IIEC3 rat hepatoma cells. **Cancer letters**, v.86, n.2, p.195-200, 1994.

SOLVASON, N.; KEARNEY, J.F. The human fetal omentum: a site of B cell generation. An important study showing that the potential to produce B-1a, B-1b and B-2 cells arises at different times during development. **The journal of experimental medicine**, n.175, p.397-404, 1992.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Clinical reviews in food science and nutrition**, v.47, p.735-748, 2007.

STODDART, A.; DYKSTRA, M.L.; BROWN, B.K.; SONG, W.; PIERCE, S.K.; BRODSKY, F.M. Lipid Rafts Unite Signaling Cascades with Clathrin to Regulate BCR Internalization. **Immunity**, v.17, p.451-462, 2002.

SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. **Journal ethnopharmacology**, v.90, n.2-3, p.339-346, 2004.

SUVAS, S.; SINGH, V.; SAHDEV, S.; VOHRA, H.; AGREWALA, J.N. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. **The journal of biological chemistry**, v.277, n.10, p.7766-7775, 2002.

VOS, Q.; LEES, A.; WU, Z.Q.; SNAPPER, C.M.; MOND, J.J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. **Immunological Review**, v.176, n.154-170, 2000.

WARDEMANN, H.; BOEHM, T.; DEAR, N.; CARSETTI, R. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. **Journal of experimental medicine**, v. 195, n.6, p.771-780, 2002.

YAFFE, P.B.; DOUCETTE, C.D.; WALSH, M.; HOSKIN, D.W. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v.94, n.1, 109-114, 2012.

YELLEN, A.J.; GLENN, W.; SUKHATME, V.P.; CAO, X.M.; MONROE, J.G. Signaling through surface IgM in tolerance-susceptible immature murine B lymphocytes. Developmentally regulated differences in transmembrane signaling in splenic B cells from adult and neonatal mice. **Journal of immunology**, v.145, n.5, p.1446-1454, 1991.

YOUINOU, P. B cell conducts the lymphocyte orchestra. **Journal of autoimmunity**, v.28, n.2-3, p.143-151, 2007.

YURASOV, S.; WARDEMANN, H.; HAMMERSEN, J.; TSUIJI, M.; MEFFRE, E.; PASCUAL, V.; NUSSENZWEIG, M.C. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. **The journal of experimental medicine**, v. 201, n.5, p.703-711, 2005.

ZOUALI, M.; YOLANDE RICHARD, Y. Marginal Zone B-Cells, a Gatekeeper of Innate Immunity. **Frontiers in immunology**, v.2, n.63, online, 2011.

ZUTSHI, R.K.; SINGH, R.; ZUTSHI, U.; JOHRI, R.K.; ATAL, C.K. Influence of piperine on rifampicin blood levels in patients of pulmonary tuberculosis. **Journal of the Association of Physicians of India**, v.33, n.3, p.223-224, 1985.

ZUTSHI, R.K.; SINGH, R.; ZUTSHI, U.; JOHRI, R.K.; ATAL, C.K. Influence of piperine on rifampicin blood levels in patients of pulmonary tuberculosis. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v.33, n.3, p.223-224, 1985.