UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFκB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS

Talita Sartori

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Ambrosio Fock

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFκB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS

Versão original

Talita Sartori

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrosio Fock

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Sartori, Talita
S249e Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFkB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS / Talita Sartori -- São Paulo, 2015.
95p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador : Fock, Ricardo Ambrosio

1. Imunologia 2 Nutrição I. T. II. Fock, Ricardo Ambrosio, orientador.

616.079 CDD

Talita Sartori

Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFκB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
Orientador/presidente

_____

1º. Examinador

_____

2º. Examinador

_____

São Paulo, _____de_____

"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma humana. "

Carl Jung

DEDICATÓRIA

À minha mãe Regina.

Ao meu pai Laércio.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrosio Fock: pela confiança,

pela oportunidade e pelos ensinamentos.

A você, professor, todo meu respeito e minha admiração.

AGRADECIMENTOS

À Diretoria da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

À Comissão de Pós-Graduação em Farmácia (CPG) da FCF-USP.

À Comissão Coordenadora do Programa (CCP) de Pós-Graduação em Análises Clínicas da FCF-USP.

À Secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP.

À Profa. Dra. Primavera Borelli do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, por seu exemplo de profissionalismo.

Ao Edson Makiyama, amigo e técnico do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, acima de tudo pela amizade, companheirismo, profissionalismo, e pela imensa ajuda e contribuição em todo este trabalho.

À Andressa Antunes, amiga e mestranda do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pela amizade, por toda ajuda técnica, pelas discussões cientificas e parceria no laboratório.

Ao Dr. Guilherme Galvão dos Santos, doutor pelo Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pela amizade, ajuda técnica e parceria no laboratório.

À Araceli Hastreiter, amiga e doutoranda do Laboratório de Hematologia Experimental da CFC-USP, pela amizade, pelo companheirismo, por diversas discussões científicas e conselhos.

Aos companheiros de pós-graduação do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP: Carolina Dias, Amanda Nogueira, Maristela Tsujita, Ed Wilson Santos, Graziela Batista, Jackeline Beltran, Dalila Oliveira.

Ao apoio financeiro CAPES e CNPS sem o qual este trabalho não poderia ter sido executado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da via clássica, dependente de NEMO.....21

Figura 2. Glutamina sintetase.....24

Figura 3. Glutaminase.....24

Figura 4. Via de biossíntese da taurina a partir dos aminoácidos metionina e cisteína.....29

Figura 5. MTT com 30 minutos de estímulo de LPS das células Raw 264.7 43

Figura 6. MTT com 24 horas de estímulo de LPS das células Raw 264.7….....45

Figura7. Viabilidade e morte celular avaliada por citometria de fluxo.....47

Figura 8. Ciclo celular.....49

Figura 9. Dosagem da citocina IL1α em células Raw 264.7 51

Figura 10. Dosagem da citocina IL1β em células Raw 264.7 53

Figura 11. Dosagem da citocina TNFα em células Raw 264.7..... 55

Figura 12. Dosagem da citocina IL6 em células Raw 264.7.....57

Figura 13. Dosagem da citocina IL10 em células Raw 264.7.....59

Figura 14A. Relação da expressão das proteínas de NFκB em células Raw 264.7 tratadas com glutamina.....60

Figura 14B. Relação da expressão das proteínas de NFκB em células Raw 264.7 tratadas com taurina.....61

Figura 14C. Relação da expressão das proteínas de NFκB em células Raw 264.7 tratadas com glutamina e taurina.....62

Figura 15A. Relação da expressão das proteínas do IKB-α em células Raw 264.7 tratadas com glutamina 63

Figura 15B. Relação da expressão das proteínas do IKB-α em células Raw 264.7 tratadas com taurina.....64

Figura 15C. Relação da expressão das proteínas do IKB- em células Raw 264.7 tratadas com glutamina e taurina.....65

Figura 16. Migração celular.....67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA Análise de variância

AP1 Ativador de proteína 1

APC Célula apresentadora de antígeno

BCG Bacilo Calmette-Guérin

DMEM Meio Dulbecco modificado

ELISA "*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"*

HLA-DR Antígenos leucocitários humanos

HOCl Ácido hipoclórico

H_2O_2 Peróxido de hidrogênio

IKBα "*Nuclear fator of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha"*

IKK Quinase IKB

IL Interleucina

IMDs Dietas imunomodulatórias

iNOS Óxido nítrico sintase

IRAK Quinase associada ao receptor de interleucina-1

IFN-γ Interferon -γ

LBP Proteína ligante de polissacarídeo

LPS Lipopolissacarídeo

MD2 Antígeno linfocítico 96

MTT Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-iol) -2,5-difeniltetrazólio

MyD88 "*Myeloid differentiation primary response gene 88"*

NFκB Fator de transcrição nuclear kappa B

NEMO "*NFκB essential modulator"*

NO Óxido nítrico

PAMP Padrões moleculares associados a patógenos

PBS Solução tampão fosfato salina

p-NFκB Fator de transcrição nuclear kappa B, porção fosforilada

SBF Soro bovino fetal

SDS Dodecil sulfato de sódio

STAT Sinal de transdução e ativação de transcrição

TauCl Taurina cloramina

TBST PBS suplementado com 0,1% Tween 20

TLR Receptores do tipo toll

TNF-α Fator de necrose tumoral alfa

TRAF-6 Fator associado ao receptor de TNF

TrisHCl Tris hidrocloridro

RESUMO

SARTORI, T. **Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NF-κB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS. 2015.** 95f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências, Universidade de São Paulo, 2015.

O sistema imunológico preserva a integridade do organismo perante o ambiente que ele está inserido. As reações imunológicas são essenciais para controle e eliminação da infecção, no entanto se os mecanismos contra regulatórios da resposta imunológica forem superados, a homeostasia pode falhar levando a um desequilíbrio no processo de reparo do organismo, podendo causar danos, insuficiência de órgão e até a morte. Muitos estudos têm demonstrado a interação entre o sistema imunológico e os aminoácidos. Visto que a glutamina é utilizada como substrato energético para enterócitos, além de fornecer nitrogênio para síntese de purinas e pirimidinas para proliferação celular e a taurina participa da hemostasia, estabilização de membranas, mobilização de cálcio, além de ser importante agente antioxidante, nos propusemos nesse trabalho investigar os efeitos da glutamina e taurina sobre aspectos relacionados a resposta imunológica de células da linhagem Raw 264.7. Para tanto foram avaliadas: viabilidade celular; a capacidade proliferativa e o ciclo celular; a capacidade de síntese de citocinas: IL-1 α, IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α e a expressão do fator de transcrição NFκB, bem como de seu inibidor IκBα. Foi possível observar aumento da viabilidade e proliferação celular para células tratadas com glutamina, entretanto não foi observado o mesmo efeito para taurina. Quando ambos aminoácidos foram associados, houve prevalência dos efeitos da glutamina. Observamos neste trabalho, que houve uma tendência da diminuição de expressão da relação de p-NFκB/NFκB quando se aumentou a concentração de glutamina. Paralelamente, o mesmo foi encontrado para relação p-IκB/IκB. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1α, Il-1β e TNF-α, uma vez que ao aumentarmos a concentração de glutamina bem como glutamina e taurina, observamos menor produção das mesmas. Complementarmente, encontramos resultados opostos para a citocina anti-inflamatória IL-10, a qual teve maior síntese em resposta ao aumento da concentração dos aminoácidos. Portanto concluímos que tanto a glutamina quanto a taurina possuem capacidade de modular aspectos da resposta imunológica de células Raw 264.7.

Palavras-chave: Terapia nutricional; glutamina, taurina, resposta imunológica

ABSTRACT

Sartori, T. **Effects of glutamine and taurine on the signaling pathway of NF-kB in RAW 264.7 cells stimulated with LPS**. 2015. 95F. Dissertação (MS) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, in 2015.

The immune system protect the body's integrity to the environment it is inserted. The immune responses are essential for control and elimination of infection, however if the mechanisms against regulatory immune response are overcome, homeostasis may fail leading to an imbalance in the repair of the body process and may cause damage, organ failure and even death. Many studies have demonstrated the interaction between the immune system and amino acids. Since glutamine is used as an energy substrate for the enterocytes and provides nitrogen to purine and pyrimidine synthesis to cell proliferation and taurine participates of hemostasis, stabilization of membranes, calcium mobilization, and besides being an important antioxidante, this work aimed to study the effects of glutamine and taurine in some aspects of the immune response of RAW 264.7 cell line. Therefore, we evaluated: cell viability; the proliferative capacity and the cell cycle phases; cytokine synthesis capacity: IL-1 α, IL-1β, IL-6, IL-10 and TNF-α, as well as the expression of the transcription factor NFkB and its inhibitor IκBα. It was possible to observe increased cell viability as well as proliferation in cells treated with glutamine, but was not observed the same effect in cells treated with taurine. When cells were treated with both amino acids, there was a prevalence of the effects of glutamine. We observed in this study, a trend of decreasing expression of p-NFκB/ NFκB relationship when cells were treated with higher concentration of glutamine. In parallel, the same was found for p-IκB / IκB relationship. These results corroborate wih the results about the production of pro-inflammatory cytokines IL-1α, IL-1β and TNF-α, since by increasing concentration of glutamine as well as glutamine and taurine, we observed reduced production of this cytokines. In addition, we found opposite results for the anti-inflammatory cytokine IL-10 which had higher production in response to increased concentration amino acids treatment. Therefore we conclude that both glutamine and taurine have the capacity to modulate some aspects in the immune response of RAW 264.7 cell.

Keywords: Nutritional therapy; glutamine, taurine, imune response

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....V

AGRADECIMENTOS.....VI

LISTA DE FIGURAS.....VII

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....VIII

RESUMO.....X

ABSTRACT.....XI

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 14

2. OBJETIVO GERAL: 16

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 16

3. REVISÃO DA LITERATURA 17

3.1 INFLAMAÇÃO E SISTEMA IMUNE 17

3.2 ATIVAÇÃO IMUNOLÓGICA E VIA DE SINALIZAÇÃO DO NFκB 19

4. GLUTAMINA 23

5. TAURINA 28

6. MATERIAL E MÉTODOS 32

6.1 CULTURA CELULAR 32

6.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT 33

6.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E MORTE CELULAR 34

6.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO 35

6.5 DOSAGEM DE CITOCINAS 36

6.6 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS IKBα TOTAL E FOSFORILAFO e NFκB TOTAL E FOSFORILADO. 37

6.6.1 SDS-PAGE E "WESTERN BLOTTING" 37

6.6.1.1. PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 37

6.6.1.2 PREPARO DE LISADO DE PROTEÍNAS PARA SDS-PAGE E "WESTERN BLOTTING" 38

6.6.1.3 TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS DO GEL PARA A MEMBRANA (NITROCELULOSE) 38

6.6.1.4 SONDAGENS DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPOS 39

6.6.1.5 REVELAÇÃO COM SISTEMA QUIMIOLUMINESCENTE 40

6.7 MIGRAÇÃO CELULAR 40

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA 40

8. RESULTADOS 42
8.1 MTT 30 MINUTOS ESTÍMULO DE LPS 42
8.1 MTT 24 HORAS COM ESTÍMULO DE LPS 44
8.3 CICLO CELULAR AVALIADO POR CITOMETRIA DE FLUXO 48
8.4 DOSAGEM DE CITOCINAS: IL1α, IL1β, TNFα, IL6 E IL10 50
8.4.1 IL1α 50
8.4.2 IL1β 52
8.4.3 TNFα 54
8.4.4 IL6 56
8.4.5 IL10 58
8.5 RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO NFκB (TOTAL E FOSFORILADO) 60
8.6 RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO IKB-α (TOTAL E FOSFORILADO) 63
8.7 MIGRAÇÃO CELULAR 66
9.DISCUSSÃO 68
10. CONCLUSÃO 77
REFERÊNCIAS: 78
ANEXOS 90

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A terapia nutricional objetiva a modulação do sistema imune pelo fornecimento de nutrientes específicos. É considerada um dos principais pilares para recuperação e manutenção do estado de saúde de pacientes enfermos e muitos estudos recentes têm avaliado o papel de dietas imunomodulatórias (immunomodulating diets IMDs) e seus componentes, que incluem aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, minerais e água (FERREIRA *et al*., 2007; TEIXEIRA *et al*, 2006).

Sabe-se que o sistema imunológico é responsável pela defesa do organismo além de reparo de tecidos. A resposta imune quando localizada apresenta vantagens ao organismo e envolve a eliminação da infecção. Porém, algumas condições fisiopatológicas que envolvem estado catabólico intenso e inadequado fornecimento de nutrientes, acarretam impacto direto na imunocompetência, aumentando a susceptibilidade a infecções (CALDER, 2006). Se os mecanismos contra regulatórios da resposta imunológica forem superados, a homeostasia pode falhar levando a um desequilíbrio no processo de reparo do organismo, podendo levar a danos, insuficiência de órgão e até a morte (WHEELER *et al.*, 1999).

Muitos estudos têm demonstrado a interação entre o sistema imunológico e os aminoácidos (ROGERO, 2007). MARIK e ZALOGA, 2010 demonstraram diminuição das complicações e infecções em pacientes que receberam dietas imunomodulatórias. No entanto, os mecanismos da suplementação com nutrientes específicos não são totalmente claros.

Muitos estudos acerca desses aminoácidos referem-se a glutamina e a taurina, devido ao grande potencial destes aminoácidos na modulação da resposta inflamatória.

Na literatura já são muito bem descritos os papeis metabólicos da glutamina, como substrato energético para enterócitos, além de fornecer nitrogênio para síntese de purinas e pirimidinas para proliferação celular (NEWSHOLME *et al.*, 2001). A taurina também já foi muito bem descrita pela sua importante participação da hoemostasia, estabilização de membranas, mobilização de cálcio, além de ser importante agente antioxidante, atuando no reparo celular aos danos causados por espécies reativas de oxigênio (NISHIYAMA e CURI, 2000; PARK *et al.*, 1993; KIM *et al*., 1996).

Inúmeros avanços já foram alcançados a respeito da influência que nutrientes específicos podem exercer sobre o sistema imunológico, entretanto devido à complexidade da resposta imune e todas as vias e mecanismos que nela estão envolvidos, diversos aspectos permanecem incompreendidos.

Considerando que a resposta imunológica uma vez desequilibrada, pode originar efeitos deletérios responsáveis pelas complicações em pacientes com doenças graves e tendo em vista que a literatura já demonstrou a importância metabólica e funcional dos aminoácidos glutamina e taurina, porém destacando-se também que os dados da literatura ainda são contraditórios a respeito dos efeitos protetores, pró ou anti-inflamatórios que esses aminoácidos podem exercer.

Optamos nesse trabalho pela investigação da participação e associação da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do fator nuclear Kappa-B (NFκB), a produção de citocinas, bem como proliferação e migração de células da linhagem Raw 264.7

2. OBJETIVO GERAL:

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos dos aminoácidos glutamina e taurina sobre aspectos relacionados resposta imunológica de células linhagem Raw 264.7, estimulados com LPS.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Para tanto, células Raw 264.7 receberem tratamento com os aminoácidos glutamina e suas associações e avaliou-se:

- ✓ viabilidade celular
- ✓ a capacidade proliferativa e o ciclo celular;
- ✓ a capacidade de síntese de citocinas: IL1α, IL1β, IL6, IL10 e TNFα
- ✓ a expressão do fator de transcrição NFκB, bem como de seu inibidor IκBα

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 INFLAMAÇÃO E SISTEMA IMUNE

O processo inflamatório é a principal forma pela qual o sistema imune lida com infecções e lesões teciduais. Corresponde a uma resposta fundamentalmente protetora do organismo, que tem o objetivo de eliminar agentes agressores. A imunidade protetora contra estímulos prejudiciais ao organismo é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas respostas posteriores da imunidade adaptativa (COICO e SUNSHINE, 2009).

São constituintes do sistema imune inato: as barreias físicas e químicas, proteínas do sangue, citocinas e células fagocitárias, como os neutrófilos e macrófagos (ABBAS *et al.*, 2013). Os macrófagos, incialmente nomeados como monócitos, originam-se de um precursor comum na medula óssea, circulam no sangue, sofrem maturação e são ativados nos tecidos. São células que desempenham funções centrais no sistema imunológico, destacando-se a ingestão e morte de microrganismos por meio de fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; ingestão de células mortas do hospedeiro; também apresentam elevada capacidade secretória, incluindo produção de lisozimas, hidrolases ácidas, proteases neutras, inibidores de enzimas, elementos do sistema complemento , intermediários do metabolismo do ácido araquidônico, fatores de coagulação e citocinas, os macrófagos ainda correlacionam a imunidade inata com a imunidade adquirida, uma vez que atuam como células apresentadoras de antígenos (APC) aos linfócitos (LASSER, 1983; NATHAN, 1987; WERE, 1975; SILVERSTEIN e FRIEDLAND, 1979)..

A imunidade inata proporciona a linha de defesa inicial contra microrganismos, por meio de mecanismos celulares e bioquímicos, que já existem até mesmo antes da infecção e que estão prontos para responder rapidamente a infecções. Uma das estratégias do sistema imune inato é o reconhecimento do padrão molecular filogenéticamente conservado associado ao patógeno (pathogen-associated molecular patterns - PAMP) (VANDERWALLE, 2008; PASSARE, 2006).

Receptores tipo Toll like (TLR) desempenham um importante papel no reconhecimento de diversos padrões moleculares associados à patógeno. Esses receptores são capazes de reconhecer ligantes estruturalmente diversos, incluindo produtos de todas as classes de microorganismos (VANDERWALLE, 2008; PASSARE, 2006). Existem nove diferentes TLR funcionais em humanos, denominados TLR1 a TLR9. Os TLR podem estar localizados tanto na membrana plasmática quanto nas membranas intracelulares. Os TLR 1,2,4,5 e 6 são expressos na membrana plasmática, onde reconhecem diversos PAMP no ambiente extracelular, já os TLR 3,7,8 e 9 são expressos no interior das células, no reticulo endoplasmático e nas membranas endossômicas, onde detectam diferentes ligantes de ácido nucleico (ABBAS *et al.*, 2013; BLASIUS e BEUTLER, 2010; AKIRA *et al.*, 2006).

Dessa forma, componentes da parede bacteriana, como lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas desencadeiam uma cascata inflamatória, via receptor TLR4. O lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina presente na membrana de bactérias Gram-negativas, induz o sistema imune inato a produzir respostas não-específicas através do seu reconhecimento via TLR4 (LIU *et al.*, 2004). Uma vez ativado o complexo TLR-4 algumas vias de sinalização podem ser desencadeadas como: MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*), AP-1 (*activator protein 1)*, STAT (*signal*

tranducer and activator of transcription) IRF3 (*interferon (IFN) regulatory factor 3*) e também do fator de transcrição NFκB. (BEUTLER, 2003; KAWAI; AKIRA, 2005).

3.2 ATIVAÇÃO IMUNOLÓGICA E VIA DE SINALIZAÇÃO DO NFκB

Descoberto em 1986, o NFκB uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κB). O papel mais bem conhecido e estudado desse fator de transcrição se dá na resposta imunológica, na qual regula expressão de genes essenciais no processo inflamatório, bem como na sobrevivência, proliferação e apoptose (XIAO, 2004).

No citoplasma de células não estimuladas, o fator de transcrição NFκB, que se apresenta na forma de dímero, encontra-se na forma inativa, devido a sua associação com proteínas denominadas inibidoras κB (IκB). A família de proteínas IκB inclui IκBα, IκBβ, IκBε, Bcl-3 e aas regiões carboxi terminal do NFκB1 (p105), NFκB2 (p 100). As proteínas IκB ligam-se com diferentes afinidades e especificidades, para diferentes dímeros do NFκB (CAAMAÑO; HUNTER, 2002; LI; VERMA, 2002).

Existem duas vias descritas para a ativação do fator de transcrição nuclear NFκB: clássica (via canônica) e alternativa (via não-canônica). A via clássica é a mais comum e está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata, à antiapoptose e à sobrevivência celular (XIAO, 2004). Já a via alternativa está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e

manutenção de órgãos linfóides secundários (linfonodos, baço, tonsilas e placas de Peyer) (ALCAMO *et al.*, 2002).

Na via clássica, para que haja ativação do NFκB, o IκB é fosforilado no resíduo de serina pelo complexo de proteína quinase IKK. Essa fosforilação é o sinal para a ubiquitinação e posterior degradação do IκB pelo proteassoma 26S. No citoplasma um conjunto de proteínas adaptadoras e ancoradoras (TRAFs, MyD88 e TIRAP) e quinases (RIP, IRAK) formam um complexo quando há um estímulo, facilitando o recrutamento da IKK. Após a degradação do IκB os dímeros do NFκB são liberados e migram para o núcleo onde atuarão na regulação da transcrição de genes específicos. (KALTSCHMIDT *et al.*, 2005).

O complexo IKK contém duas subunidades catalíticas denominadas IKKα (IKK1) e IKKβ (IKK2) e uma subunidade não catalítica denominada NEMO (do inglês *NFκB essential modulator*). Existem diversas combinações entre as subunidades do IKK, podendo ser homo ou heterodímeros de IKKα ou IKKβ, associados ou não ao NEMO (MERCURIO *et al.*, 1999). O mais comumente encontrado é IKKα-IKKβ-NEMO SCHEIDEREIT, 2006). Esta via é ativada por uma variedade de sinais inflamatórios, incluindo citocinas próinflamatórias e endotoxinas bacterianas, que leva a ativação do complexo IKK (XIAO, 004).

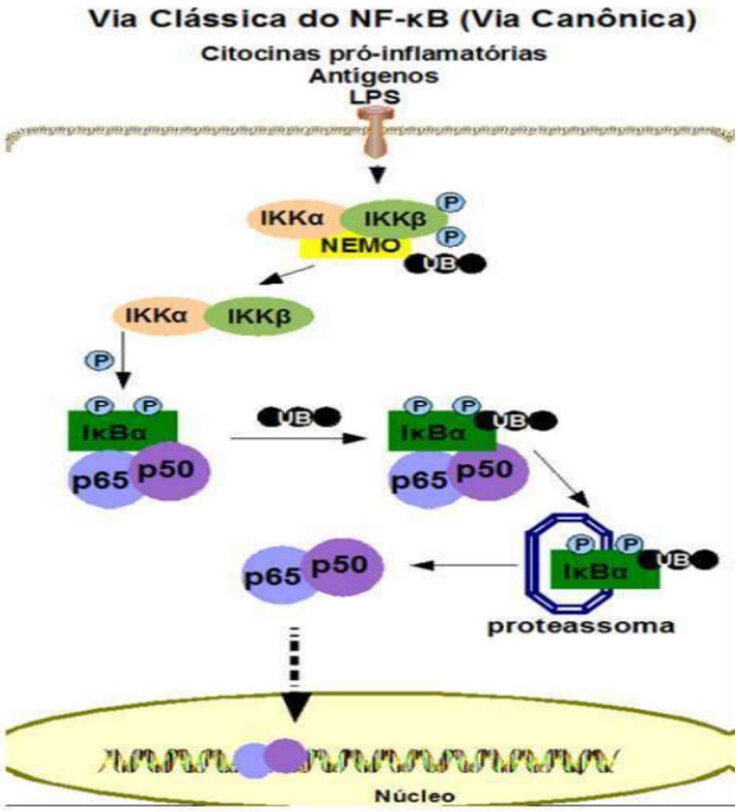


Figura 1- Ilustração da via clássica, dependente de NEMO (Adaptado de, FRANCO, 2010).

Dessa forma o LPS estimula a síntese de citocinas, induzindo a ativação de vários fatores de transcrição como o NFκB, entre outros como AP-1 e o STAT, os quais ativam ou reprimem os genes alvo. Estes fatores podem também intensificar e perpetuar a expressão de citocinas, visto que as regiões promotoras de muitas citocinas e seus genes de receptores revelam numerosos sítios reguladores para estes fatores de transcrição (CAAMANO; HUNTER, 2002).

A ativação da via do NFκB leva a produção de citocinas IL1, IL6 e TNFα, consideradas mediadores pró-inflamatórios celulares que controlam a infecção através da liberação de mediadores secundários, da indução da quimiotaxia e da ativação, sobrevivência, proliferação, maturação e/ou morte de células imunológicas (BEUTLER, 2003; LIMA *et al.*, 2013).

Desde que as citocinas não atuam sozinhas, sendo produzidas e liberadas em rede bem coordenada, os níveis relativos destes fatores de transcrição podem ser responsáveis pela ação inflamatória e anti-inflamatória prolongada das citocinas e seus ativadores (CAAMANO; HUNTER, 2002; LI VERMA, 2002; BILLACK, 2006).

4. GLUTAMINA

Em 1955, nos trabalhos realizados por Eagle, surgiram as primeiras evidências de que a glutamina possuía importantes propriedades metabólicas. A partir destes trabalhos, Eagle demonstrou que a glutamina é indispensável para o crescimento e manutenção de células em cultura (EAGLE, 1959).

A glutamina é um dos aminoácidos constituintes das proteínas e é o mais abundante no plasma e nos tecidos, principalmente no músculo esquelético onde este aminoácido representa aproximadamente 40-60% do pool de aminoácidos livres. O musculo esquelético possui importante papel metabólico para este aminoácido, uma vez que apresenta elevada capacidade de sua síntese e liberação, numa taxa de síntese de aproximadamente 50mmol/h, sendo maior que qualquer outro aminoácido (NEWSHOLME *et al.*, 2003). O principal órgão de utilização de glutamina é o trato gastrointestinal, sendo o intestino delgado o sítio mais importante de metabolização deste aminoácido, onde este, é utilizado como substrato respiratório quantitativamente mais importante para os enterócitos do que a glicose.

Normalmente, a glutamina é considerada um aminoácido dispensável, pois pode ser sintetizada pelo organismo de acordo com suas necessidades (NEWSHOLME, 2001). Porém, durante situações de estresse, como: trauma, septicemia, câncer e exercício físico extenuante, as concentrações de glutamina no plasma podem diminuir a níveis abaixo da concentração fisiológica, resultando numa situação de desequilíbrio; nessas condições um fornecimento extra de glutamina na dieta é necessário. Por essa razão, este aminoácido pode ser considerado “condicionalmente indispensável” (NEWSHOLME, 2001; SMITH e WILMORE, 1990).

Há duas enzimas responsáveis pela síntese de glutamina a partir do glutamato e por sua degradação também em glutamato: a glutamina sintetase e a glutaminase. A glutaminase é a enzima que catalisa a hidrolise de glutamina em glutamato e íon amônio, já a glutamina sintetase catalisa a conversão de glutamato em glutamina, usando a amônia como fonte de nitrogênio (VIEIRA, 1979).

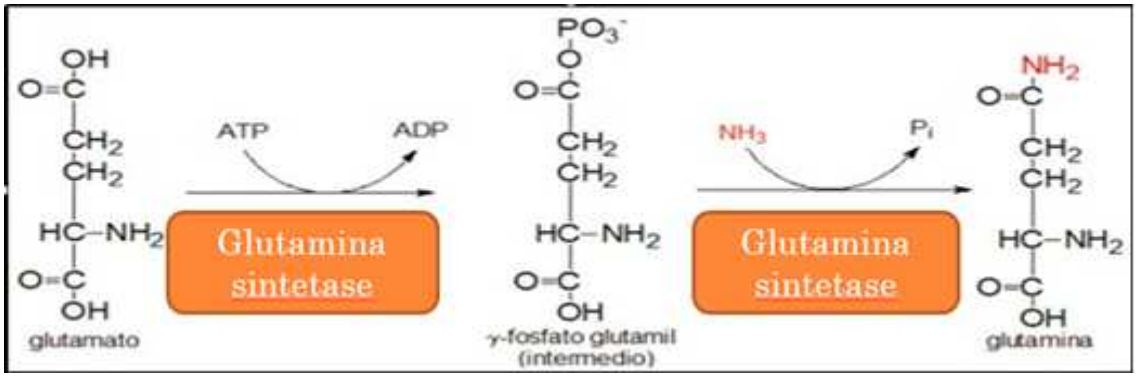


Figura 2- Glutamina sintetase. A amônia livre produzida nos tecidos combina-se com o glutamato, produzindo glutamina, pela ação da glutamina-sintetase. A reação ocorre em duas etapas e requer ATP. Inicialmente o glutamato e o ATP reagem para formar um intermediário (γ- glutamil fosfato), que então reage com a amônia, produzindo glutamina e fosfato inorgânico.Adaptado de KING.Introducción al metabolismo del nitrógeno. Disponível em http://themedicalbiochemistrypage.org/es/nitrogen-metabolism-sp.phg.Acesso 13jun.2014.

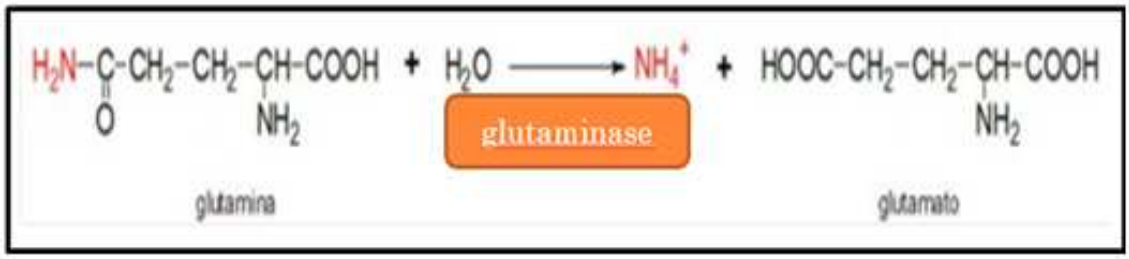


Figura 3 –Glutaminase. Após ser transportada pela corrente sanguínea, a glutamina entra no fígado, e a amônia, é liberada na mitocôndria pela enzima glutaminase (conversão de glutamina em glutamato). Adaptado de KING. Introducción al metabolismo del nitrógeno. Disponível em http://themedicalchemistrypage/es/nitrogen-metabolism-sp.php. Acesso 13 jun.2014.

Em um indivíduo adulto, tanto a concentração tecidual, quanto a concentração sanguínea de glutamina pode ser influenciada de acordo com a atividade de suas enzimas: glutamina sintetase e glutaminase. Alguns tipos de células, como células do

sistema imune, rins e intestino, apresentam elevada atividade glutaminase, sendo assim considerados tecidos predominantemente consumidores de glutamina (VAN DE POLL, *et al.*, 2004). Por outro lado, os músculos esqueléticos, os pulmões, o cérebro, e possivelmente o tecido adiposo, possuem elevada atividade glutamina sintetase, sendo assim considerados tecidos predominantemente sintetizadores de glutamina (CURI *et al.*,1999).

Segundo FRISINA *et al.*, 1994 e ROWBOTTOM *et al.*, 1995, a taxa de utilização de glutamina por macrófagos é similar ou superior à de glicose. Contudo, apenas pequena parte dos carbonos da molécula de glicose (<10%) e do aminoácido glutamina (5-25%) são completamente oxidados por macrófagos em meio de cultura. Sendo assim, a maioria das moléculas de glicose é convertida em lactato (glicólise), enquanto grande parte da glutamina é convertida em glutamato, aspartato e lactato (glutaminólise) (NEWSHOLME *et al.*, 1999).

A glutamina possui importante influência na funcionalidade celular, destacando a participação na divisão de células do sistema imune, sendo muito utilizada por linfócitos, que uma vez devidamente estimulados apresentam grande capacidade proliferativa (NEWSHOLME *et al.*, 2001). LI *et al.*, 2007, relatou que a glutamina é o maior combustível para as células do sistema imune, atuando na proliferação de linfócitos T, na síntese de proteína, produção de citocinas e inibição da apoptose.

A glutamina também apresenta capacidade em modular a atividade fagocitária, apresentação de antígenos e a diferenciação de células monocíticas. Em 1995, Spittler *et al.*, realizou um estudo com monócitos humanos e demonstrou que a diminuição da concentração de glutamina de 2mmol/L (concentração normalmente utilizada em meios de cultura) para 50µmol/L levou a menor expressão de várias moléculas de superfície dos monócitos, como por exemplo HLA-DR. Essa menor expressão foi paralela a

menor capacidade desses monócitos apresentaram antígeno para linfócitos T. ROGERO *et al.,* 2008, também observaram que animais desmamados prematuramente e suplementados com glutamina apresentaram aumento na função de macrófagos e na hemopoese quando estimulados com BCG.

Em estados infecciosos, a manutenção da resposta imune é fundamental para a sobrevida do paciente, neste contexto a glutamina participa no processo de proliferação de linfócitos e adicionalmente na diferenciação de linfócito B (NEWSHOLME, 2001). Estudos realizados por (ARDAWI *et al.,* 1993), mostraram que a resposta proliferativa de linfócitos, tanto de humanos quanto de ratos, foram dependentes de glutamina, bem como o consumo de glutamina tanto por linfócitos quanto por neutrófilos e macrófagos aumenta intensamente, influenciando a produção de citocinas (NEWSHOLME, 2001).

Macrófagos desempenham papel importante na resposta imune inata e adaptativa. Essas células são caracterizadas por alta secreção de proteínas, que depende do aumento da síntese de purinas, pirimidinas e ribose-5-fosfato. Isto caracteriza papel relevante da glutamina na manutenção de altas taxas de transcrição (NEWSHOLME *et al.,* 1996). De acordo com essa hipótese, alguns estudos têm investigado a relação entre secreção de TNFα, IL1 e IL6 que são citocinas quantitativamente relevantes sintetizadas por macrógafos e a concentração extracelular de glutamina, desde que macrófagos podem ser totalmente dependentes da concentração extracelular de glutamina para atingirem uma atividade secretória ótima (MURPHY, NEWSHOLME, 1999). Segundo NEWSHOLME *et al.,* 1999, macrófagos peritoniais de camundongos ativados com BCG e incubados em meio de cultura na presença de 2mM de glutamina apresentam a capacidade de sintetizarem TNFα em altas taxas quando estimulados por LPS. Além disso, WALLACE; KEAST 1992 e YASSAD *et al.,* 1997; demonstraram,

respectivamente, que o aumento da secreção de IL1 e IL6 por macrófagos estimulados por LPS foi dependente da concentração de glutamina extracelular.

No entanto, apesar de muitos estudos demonstrarem os efeitos benéficos da suplementação com glutamina incluindo o tratamento clinico em pacientes com doenças severas, alguns estudos recentes têm demonstrado resultados divergentes. HEYLAND *et al.*, 2013, demonstrou que o aumento da mortalidade entre pacientes com doenças severas, estava associado a suplementação com glutamina.

A literatura apresenta divergências em relação à capacidade da glutamina em melhorar a resposta imune e aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias. A divergência dos dados obtidos pode dever-se a diferenças nos métodos utilizados *(in vivo e in vitro*), nas concentrações de glutamina, e nos tipos celulares avaliados nesses estudos.

5. TAURINA

Originalmente isolada do ácido biliar do boi, a taurina ou ácido-aminosulfônico, é um dos aminoácidos livres mais abundantes encontrado em altas concentrações nos tecidos dos animais, incluindo mamíferos, apesar de não ser utilizado na síntese proteica. A concentração intracelular de taurina em tecidos de mamíferos está entre 5 a 10µmol/g. as altas concentrações de taurina regulam muitas funções celulares, incluindo volume celular, homeostase, estabilização proteica, mobilização de cálcio e imunidade (FUKUDA *et al.*, 1982; HUXTABLE, 1992; SCHULLER e PARK, 2003).

A taurina é um composto capaz de apresentar carga positiva e negativa no mesmo átomo (HUXTABLE, 1992). Esta característica faz com que a taurina tenha alta solubilidade em água e baixa solubilidade em meios lipídicos, o que explica a alta impermeabilidade da taurina em membranas biológicas, devido a este fato altas concentrações de taurina são encontradas em torno de membranas, como é encontrado na retina por exemplo. Algumas funções biológicas da taurina, se devem a sua característica atômica, destacando-se interação com cátions de cálcio, modulação de ações de membrana e conjugação com ácidos biliares (HOFFMANN e LAMBERT 1983, PASANTES-MORALES *et al.*, 1986).

As maiores concentrações de taurina são encontradas no coração e cérebro, porém também há grande quantidade desse aminoácido nos músculos. No músculo esquelético a taurina apresenta importante funções incluindo controle do funcionamento dos canais iônicos e homeostase do cálcio, atuando desta forma na excitação de membranas e contração muscular. No coração a taurina representa até 60% do total do pool de aminoácidos livres (HUXTABLE, 1976). As maiores concentrações de taurina são observadas no cérebro em desenvolvimento, após o desenvolvimento cerebral, os níveis de taurina decrescem e em adultos os níveis cerebrais de taurina chegam a um

terço dos níveis encontrados em neonatais (DAVIS e HIMWICH, 1973; LEFAUCONNIER *et al.*,1976; HUXTABLE, 1972). Devido a este declínio da fase de desenvolvimento para a fase adulta, muitos estudos sugerem que a taurina seja importante na fase de desenvolvimento cerebral. Um estudo realizado com gatos nascidos de progenitoras deficientes em taurina, demonstrou que estes animais apresentaram menor peso cerebral, além de morfologia anormal do cerebelo e do córtex visual (STURMAN *et al.*, 1985).

A taurina é sintetizada pelo corpo humano, no fígado, a partir do metabolismo dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) e sua síntese, a partir destes aminoácidos, ocorre através de uma sequência de reações enzimáticas de oxidação e descarboxilação, até a produção de hipotaurina e taurina (HUXTABLE, 1986). A síntese endógena de taurina é variável entre os indivíduos, uma vez que ela esteja relacionada com a disponibilidade de cisteína e esta por sua vez seja dependente do equilíbrio do metabolismo entre homocisteina e metionina via ácido fólico e vitamina B12.

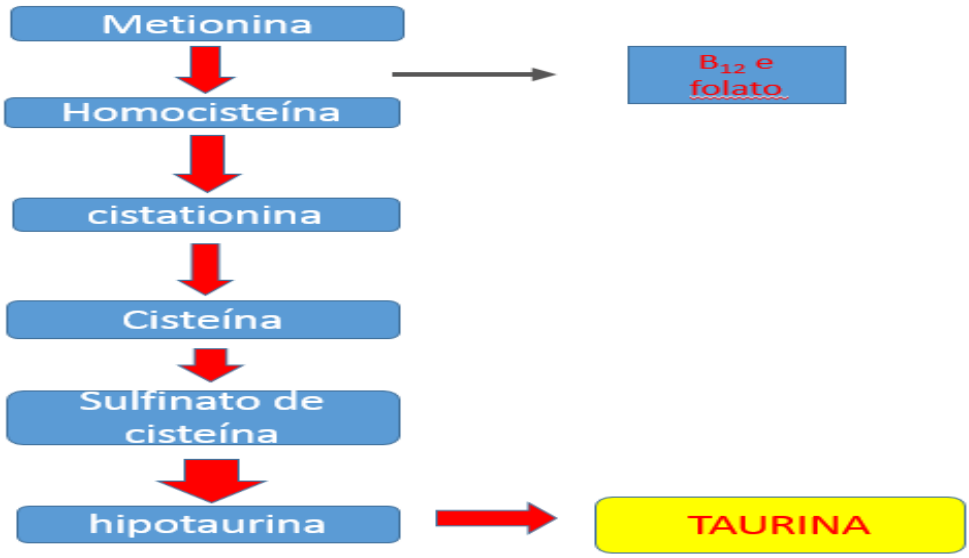


Fig.4 Via de biossíntese de taurina a partir dos aminoácidos metionima e cisteína. A metionina é convertida em homocisteína, esta então é usada como substrato para formar cisteína. Já a cisteína é um importante precursor para síntese de sulfinato de cisteína, que é convertida em hipotaurina e por sua vez em taurina. (Adaptado de Sebastian *et al.*, 2009).

Alguns estudos aplicam a taurina o conceito de aminoácido antioxidante, e segundo esses estudos uma diminuição no conteúdo deste aminoácido, dependente e proporcional ao aumento da idade, levaria ao acumulo de radicais livres, levando a morte celular, ao longo do envelhecimento (WALLACE *et al.,* 1990; EPPLER *et al.,* 1998).

Dentre as diversas funções da taurina, podemos citar proteção celular a lesão inflamatória. Nos neutrófilos, a taurina age atenuando a toxicidade do ácido hipoclórico (HOCl), produzido pelo sistema mieloperoxidase. Reagindo com HOCl, a taurina é capaz de gerar um composto mais estável e menos tóxico para as células, conhecido como taurina-cloramina (TauCl) (WEISS *et al.,* 1883; GRISHAM *et al.,* 1984). Nas células a Tau-Cl pode modular a produção de muitos mediadores pró-infamatórios, como oxido nítrico (NO), ânions superóxido, TNFα, IL6 e IL8 e prostaglandinas. (PARK 1995; MARCINKIEWICZ *et al.,* 1998).

Demonstrou-se recentemente que a taurina-cloramina (TauCl) é mais do que um produto final da detoxificação do ácido hipoclórico. Foi determinado também que a taurina-cloramina possui função de modulador de inflamação, uma vez que culturas de macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (LPS) e intérferon-γ (INF-γ), na presença TauCl, tinham inibidas as suas produções de oxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNFα) e prostaglandinas E_2 (PARK *et al.,* 1993; KIM *et al.,* 1996).

Segundo SUN JANG *et al.,* 2009, o composto TauCl, em um estudo com macrófagos Raw 264.7, protegeu essas células da morte celular induzida por peróxido de hidrogênio (H2O2) e ainda ativou enzimas com capacidade antioxidante.

Em um estudo realizado com macrófagos estimulados com LPS, determinou-se que o tratamento com taurina não afetou os níveis de nitrito, porém o mesmo tratamento

com este aminoácido reduziu os níveis de H_2O_2 nestes macrófagos. A diminuição dos níveis de H_2O_2 mediado pela taurina, possibilitou diminuição da degradação do IκB-α e consequentemente diminuição da ativação do NFκB, uma vez que o H_2O_2 pode atuar como segundo mensageiro para ativação do NFκB. (KARABAY *et al.*, 2008).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 CULTURA CELULAR

Foram utilizadas culturas de macrófagos da linhagem Raw 264,7. Essas células foram obtidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (APABCAM), cuja fonte se deu a partir de ascite por tumor formado após injeção com vírus da leucemia Abselon em camundongo. O cultivo dessas células foi conduzido em frascos de cultura com meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de soro bovino fetal e tampão Hepes (2g/l) com pH final entre 7,2 a 7,4. As células foram adicionadas a incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO_2 á 37°C, para proliferação celular e aderência a garrafa. Inicialmente o meio de cultura foi trocado após 3 ou 4 dias, passado a fase log de crescimento celular. Após esse período as células foram plaqueadas aproximadamente a cada 2 dias, para manter a confluência próximo de 70%.

Para avaliação dos efeitos dos compostos: taurina e glutamina, sobre a proliferação das células Raw 264.7, estas foram tratadas com glutamina (Sigma-Aldrich**)**, ou com taurina (Sigma-Aldrich), ou com ambos No tratamento das células Raw 264.7 com glutamina, as concentrações escolhidas foram de 0mmol/L, 0,6mmol/L, 2mmol/L e 10mmol/L. A escolha pela concentração de glutamina de 0,6 mmol/L durante o período de cultura celular se deve ao fato dessa concentração corresponder àquela observada no plasma de animais adultos saudáveis. A concentração 2 mmol/L é uma concentração padrão em cultura de células e apesar desse valor estar acima das concentrações de glutamina in vivo (0,6 mmol/L), experimentalmente 2 mmol/L propiciaram melhores resultados em condições de incubação de células por períodos prolongados (24-72 horas) (EAGLE *et al.*, 1955). A concentração de 10 mmol/L- apesar de significativamente superior àquela utilizada em ensaios in vitro com macrófagos – é

devido ao fato de estudos, que utilizaram outros tipos celulares, tais como enterócitos e células mononucleares do sangue periférico, terem verificado efeitos opostos da glutamina sobre a expressão de genes que codificam para citocinas quando a concentração desse aminoácido foi igual ou superior a 2 mmol/L (WISCHMEYER *et al.*, 2003; HUBERT-BURON *et al.*, 2006).

Para o tratamento com taurina, as concentrações utilizadas foram as concentrações: 0 mmol/L, 1 mmol/L, 5mmol/L e 10mmol/L. Foi utilizada a concentração de 0 mmol/L como controle negativo da reação, a concentração de 1mmol/L é menor do que a encontrada em tecidos, segundo a literatura, porém estudos recentes, utilizaram esta concentração e verificaram que ela foi inibitória da via NFκB; 5 mmol/L foi usada como concentração intermediária (KIM *et al.*, 2005). A concentração de 10 mmol/L foi utilizada, pois, segundo FUKUDA *et al.*, 1982, as concentrações intracelulares de taurina nos tecidos de mamíferos são de 10- 70mM.

6.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT, que baseia-se na capacidade das células viáveis de reduzirem metabolicamente o sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, em cristais de formazan de cor azul-púrpura, que se acumula no citoplasma celular (MOSMANN, 1983). Dessa forma, o ensaio de MTT

avalia a atividade mitocondrial representativa de células viáveis pela quantificação da atividade da desidrogenase.

Foram realizados dois ensaios de MTT, que diferiram no tempo de estímulo com 1,25µg/L de LPS (cepa 055:B5), um com 30 minutos de estímulo e outro com 24 horas. Para ambos ensaios foram preparadas placas de 96 wells com $1x10^4$ células/well.

Inicialmente, no primeiro ensaio, após 24 horas de exposição de $1x10^4$ células/well a diferentes concentrações de glutamina (0, 0,6, 2 e 10 mmol/L) e taurina (0, 1, 5, 10 mmol/L), as células então foram estimuladas 30 minutos com LPS. No segundo ensaio o estímulo com LPS foi de 24 horas, sendo realizado ao mesmo tempo de exposição aos aminoácidos.

Para ambos os ensaios, no próximo passo, aspirou-se o meio de cultura, adicionou-se 100µL da solução de MTT (5mg/mL em PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) por poço da placa e incubou-se as placas por 2 horas a 37ºC. Posteriormente, aspirou-se a solução de MTT e adicionou-se 100µL de isopropanol por poço para a dissolução dos cristais de formazan. Finalmente, as placas foram incubadas *overnight*, em temperatura ambiente, e a absorbância dos cristais de formazan dissolvidos em isopropanol foi medida a 570nm. A leitura foi realizada no espectrofotômetro EL800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek® Instrumentals, Winooski, EUA).

6.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E MORTE CELULAR

Para a avaliação da viabilidade por citometria de fluxo foram preparadas placas de 12 wells com $1x10^6$ células/well. As células da placa foram expostas 24 horas tanto

aos aminoácidos glutamina (0; 0,6; 2; 10mM/L) e taurina (0; 1; 5; 10mM/L) quanto a 1,25µg/L de LPS (cepa 055:B5), e mantidas em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO_2 á 37°C. As placas controle não receberam estímulo com LPS.

Após o período de cultura e tratamento com os aminoácidos, as células foram retiradas da placa com uso de tripsina.

Foi adicionado 50µl de tampão de anexina em todos os tubos, incluindo controles e amostras. A seguir adicionou-se apenas às amostras,10,5µl do preparo de anexina e iodeto de propídeo, calculado a partir da quantidade de amostras a serem analisadas (2,5µl de anexina e 8µl de Iodeto de propídeo para uma amostra).

No controle de anexina foi adicionado 2,5µl de anexina e no controle de iodeto de propídeo foi adicionado 8µl de iodeto de propídeo.

Os tubos foram mantidos 20 minutos em temperatura ambiente e no escuro. A seguir foi adicionado 200µl de tampão de anexina em todos os tubos e estes seguiram para aquisição dos dados por citometria de fluxo (FACScan®, BECTON DICKSON, SAN JOSE, EUA.). A análise foi feita utilizando o software Cell Quest (versão 3.4, Becton Dickinson).

6.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a avaliação do ciclo celular foram preparadas placas de 12 wells com $1x10^6$ células/well. As células da placa foram expostas 24 horas tanto aos aminoácidos

glutamina (0; 0,6; 2; 10mM/L) e taurina (0; 1; 5; 10mM/L) quanto a 1,25µg/L de LPS (cepa 055:B5), e mantidas em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO_2 á 37°C. As placas controle não receberam estímulo com LPS.

Após, as células foram retiradas da placa com uso de tripsina e então ressuspensas em 50µl de PBS. Em seguida foram adicionados 200µl de etanol 70% e os tubos foram mantidos no gelo por 20 minutos, os tubos então foram centrifugados e o sobrenadante retirado, permanecendo apenas o pellet no tubo.

Ao pellet foi adicionado 2,5µl de RNAse e os tubos foram mantidos em 37° C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se aos tubos 4µl de iodeto de propídeo e estes foram mantidos em 37° C por mais 30 minutos. Após os tubos foram analisados do citometro. A análise se deu pela quantificação da porcentagem das regiões G0/G1 e S/G2/M, utilizando os programas CELLQuest® (versão 3.4, Becton Dickinson) e ModFit 3.0.

6.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

Para dosagem de citocinas foram utilizadas placas de 24 wells com $1x10^6$ celulas/well. Essas células receberam tratamento com os aminoácidos glutamina e taurina nas concentrações descritas no item 6.1, a seguir as placas foram mantidas em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO_2 á 37°C por 24 horas. Após este período 50% dos wells da placa (12 wells) receberam estímulo com 1,25µg/L de LPS (cepa 055:B5) por 30 minutos. Após, os sobrenadantes foram recolhidos e acondicionados em uma temperatura de -40°C para posterior dosagem das citocinas.

A determinação da concentração de IL1α (Catálogo DY400, R&D Systems); IL1β (Catálogo DY401, R&D Systems); IL6 (Catálogo DY406, R&D Systems), IL10 (Catálogo DY417, R&D Systems) e TNFα (Catálogo MTA00, R&D Systems) presente no sobrenadante das culturas celulares foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme Linked ImmnunoSorbent Assay*) – *kits* R&D Systems.

6.6 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS IKBα TOTAL E FOSFORILAFO e NFκB TOTAL E FOSFORILADO.

Para análise da expressão de proteínas foram utilizadas placas de 24 wells com $1x10^6$ celulas/well. Essas células receberam tratamento com os aminoácidos glutamina e taurina nas concentrações descritas no item 6.1, a seguir as placas foram mantidas em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO_2 á 37°C por 24 horas. Após este período 50% dos wells da placa (12 wells) receberam estímulo com 1,25µg/L de LPS (cepa 055:B5) por 30 minutos

6.6.1 SDS-PAGE E "WESTERN BLOTTING"

6.6.1.1. PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA

Foi procedido conforme protocolo de Sambrook et al. (1989) e Harlow & Lane (1988), descrito sucintamente a seguir. Os géis foram preparados em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior

(resolutivo) foi preparado com 6 a 10 % de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl, pH 8,8, 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

6.6.1.2 PREPARO DE LISADO DE PROTEÍNAS PARA SDS-PAGE E "WESTERN BLOTTING"

Os lisados foram preparados a partir de $1x10^6$ células em tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 μg/mL aprotinina, 1 μg/mL leupeptina, 100 μg/mL PMSF, 0,5 mM EDTA). O material foi sonicado (30 segundos), centrifugado por 10 minutos, a 20.000 rpm, e 4°C. o sobrenadante foi quantificado e um volume correspondente a 200 μg foi misturado ao tampão de amostra (3 x concentrado, 100 mM Tris.HCL, pH 6,8, 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 2 % SDS, 20 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol), levadas ao Dry block por 10 minutos a 100°C, para desnaturação das proteínas e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Como padrão foi utilizada a mistura pré-corada Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (THERMO SCIENTIFIC, EUA) (5-10 μg de proteína).

6.6.1.3 TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS DO GEL PARA A MEMBRANA (NITROCELULOSE)

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubado por 10 min em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS, 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e então também incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel 3MM, membrana, gel, 2 folhas de 3 MM (Whatman), esponja. Procedeu-se à transferência em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 200-400 mA, por 30-90 min.

A eficiência da transferência foi verificada, corando-se a membrana por 5-10 min com corante Ponceau (1% Ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com água destilada ou TBS (Tris, pH 7,5, 20 mM, NaCI 0,9 %).

6.6.1.4 SONDAGENS DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPOS

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado Molico, a 3 %, em tampão TBS, por 0,5-14 h, sob agitação. Os anticorpos anti-NF-κB [total (Catálogo SC-33039, Sant Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e fosforilado (Catálogo SC-372, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA)] foram diluídos em TBST nas seguintes concentrações: 1:1000 (anti-NFκB total) e 10:1000 (anti-NFκB fosforilado), os anticorpos anti-IKBα [total (Catálogo SC-371, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e fosforilado (Catálogo SC-101713, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA)] foram ambos diluídos em TBST na concentração de 1:1000 com as membranas, por 24 horas, com agitação, à temperatura ambiente. A membrana foi então lavada 3 vezes, por 10 min, com TBST. As proteínas foram sondadas com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com biotina, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), diluído 1:10000 em TBST, por 3 horas, sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com agitação.

6.6.1.5 REVELAÇÃO COM SISTEMA QUIMIOLUMINESCENTE

A revelação foi realizada utilizando-se o kit de revelação ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents®, Amerahm Biosciences, Pittsburgh, EUA). Para análise foi utilizada o digitalizador de Imagem ImageQuant 400 (GE Helthcare).

6.7 MIGRAÇÃO CELULAR

Os ensaios de migração foram realizados com N -Formilmetionil-leucil-fenilanina (FMLP) como agente quimioatrativo. Para o teste de migração utilizou-se uma placa de 12 wells. Em cada well foi adicionado meio DMEM (sem glutamina) tratado com os aminoácidos glutamina (0; 0,6; 2; 10mM/L) e taurina (0; 1; 5; 10mM/L), adicionou-se em seguida ao fundo do well, 1µl/mL de FMLP como fator quimiotático. Em seguida, em cada well adicionou-se *insert* equipado com filtro de poros de 8µm, dentro dos inserts foi adicionado $1x10^5$ células.

A placa então foi mantida em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO_2 á 37°C por 48 horas. Após este período o *insert* foi retirado e as células que migraram para o fundo do well foram contadas em câmara de neubauer.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism for Windows versão 2.01. Para análise da ação da glutamina ou taurina ou associação de ambos aminoácidos em diferentes concentrações, as amostras foram separadas em grupos sem estímulo com LPS e com estímulo com LPS, os dados então foram

submetidos análise estatística ANOVA. Em seguida, para análise da influência do estímulo com LPS, as amostras foram separadas em grupos tratados com mesma concentração de aminoácido, porém um com estímulo e outro sem, em seguida foram submetidos à análise estatística do teste t. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando o $p \leq 0,05$.

8. RESULTADOS

8.1 MTT 30 MINUTOS ESTÍMULO DE LPS

Buscando avaliar a viabilidade das células da linhagem Raw 264.7 expostas aos aminoácidos glutamina e taurina, realizou-se o ensaio de MTT, inicialmente o estímulo de LPS aplicado foi de 30 minutos. Como mostram (Figuras 5 -A, B e C) não encontramos para este tempo de estímulo, diferença estatisticamente significativa para os tratamentos com os aminoácidos tanto na presença quanto na ausência de LPS.

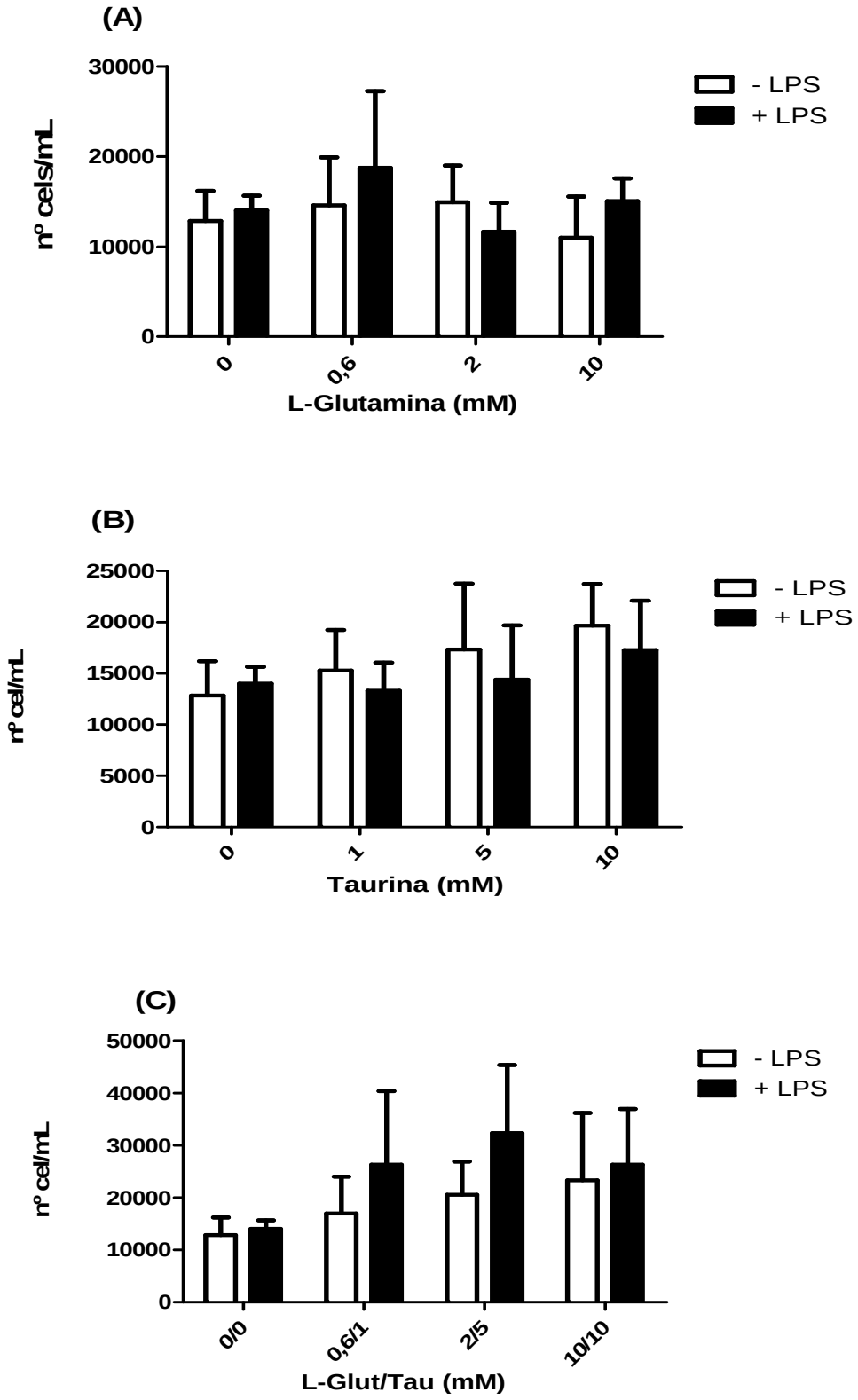


Figura 5. Resultados expressos em média ± desvio padrão do (A) MTT realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) MTT com 30 minutos de estímulo com LPS e concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) MTT com 30 minutos de estímulo com LPS e combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM ($P \leq 0,05$; ANOVA e teste t). Em casa ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas).

8.1 MTT 24 HORAS COM ESTÍMULO DE LPS

No segundo ensaio de MTT, decidiu-se aplicar maior tempo de estímulo com LPS, tempo este que foi paralelo a exposição das células da linhagem Raw 264.7 aos aminoácidos glutamina e taurina, portanto as células foram expostas 24 horas ao LPS e juntamente aos aminoácidos. Para este tempo de estímulo, pode-se observar (A), aumento da viabilidade nas células estimuladas com LPS na presença de 10mM de glutamina quando comparada ao grupo que recebeu 10mM de glutamina, porém ausente de LPS, observamos também uma tendência no aumento da viabilidade celular paralelo ao aumento da concentração de glutamina quando comparamos aos grupos controles 0 mM de glutamina. Para este ensaio não analisamos diferença estatisticamente significativa para as células expostas a taurina. Quando as células foram expostas aos dois aminoácidos (C), observamos o mesmo efeito de aumento de viabilidade nos grupos com 2/5mM e 10/10mM de glutamina e taurina na presença de LPS, quando comparados aos grupos que receberam o mesmo estímulo, 2/5mM e 10/10mM glutamina/taurina, porém ausentes de LPS.

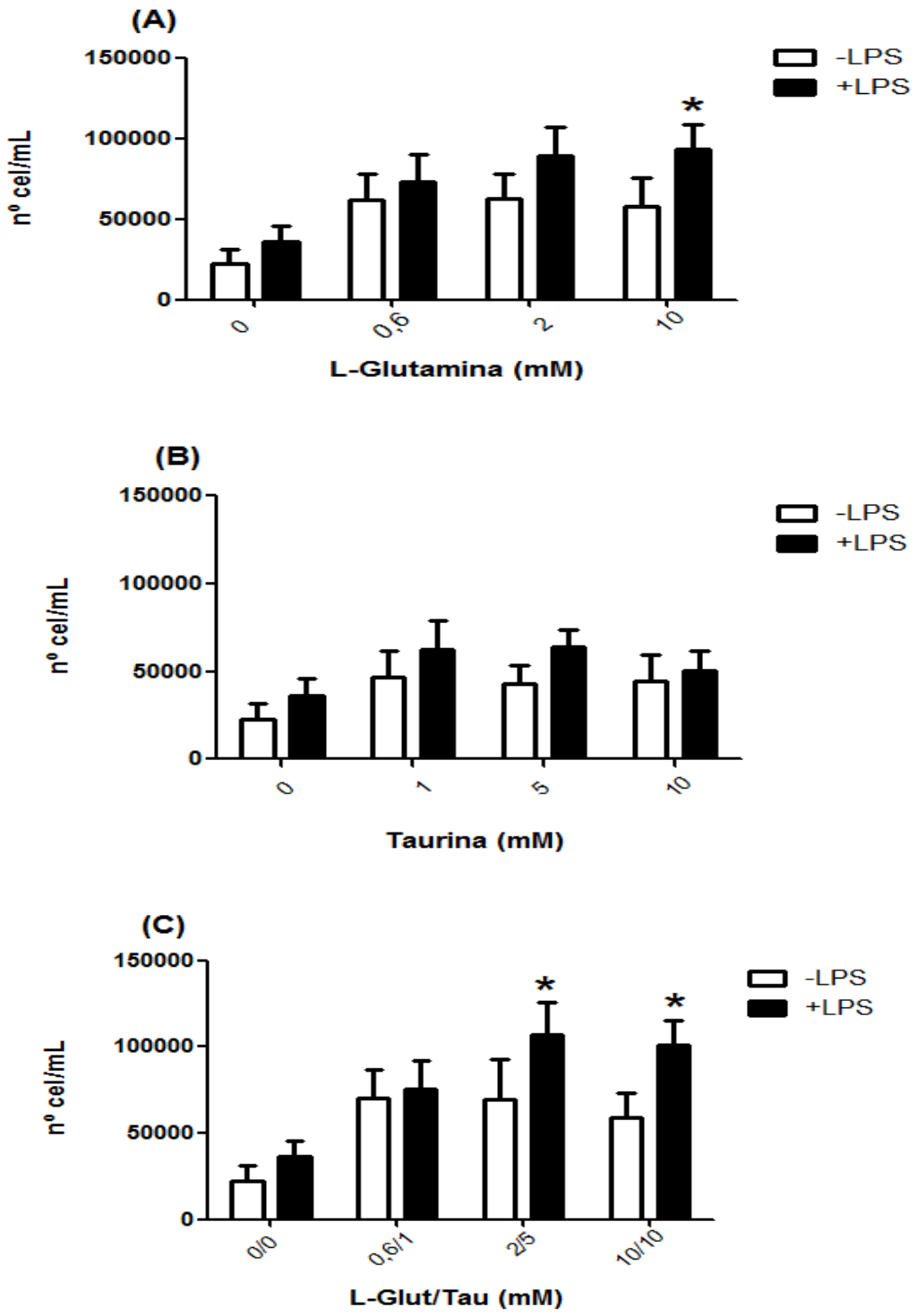


Figura 6. Resultados expressos em média ± desvio padrão do (A) MTT realizado com 24 horas de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) MTT com 24 horas de estímulo com LPS e concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) MTT com 24 horas de estímulo com LPS e combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido (P≤0,05; ANOVA e teste t). Em casa ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas).

8.2 VIABILIDADE E MORTE CELULAR AVALIADA POR CITOMETRIA DE FLUXO (ANEXINA E IODETO DE PROPÍDEO)

Buscando uma análise detalhada sobre a viabilidade celular ao expor as Raw 264.7 a glutamina e taurina, realizamos o ensaio de citometria de fluxo utilizando anexina e iodeto de propídeo (PI). A marcação das células com anexina-V conjugada com FITC (a qual se liga à fosfatidilserina que é externalizada durante o processo de morte por apoptose) e PI (que se intercala entre bases do DNA de células com a membrana rompida, característica da morte celular por necrose. No ensaio de viabilidade por citometria de fluxo, observamos (A) aumento da viabilidade celular paralelo ao aumento da concentração de glutamina na presença de LPS, 2mM e 10mM, quando comparados as células que receberam 0mM e 0,6mM de glutamina. Na figura (B) observamos que o grupo tratado com 10mM de taurina na presença de LPS, apresentou diminuição da viabilidade quando comparado ao grupo que recebeu a mesma concentração de taurina , porem na ausência de LPS. Já em (C) quando os dois aminoácidos foram associados pode-se observar aumento da viabilidade celular tanto nos grupos com LPS quanto nos grupos sem LPS, quando estes foram comparados aos controles (0mM de glutamina e taurina).

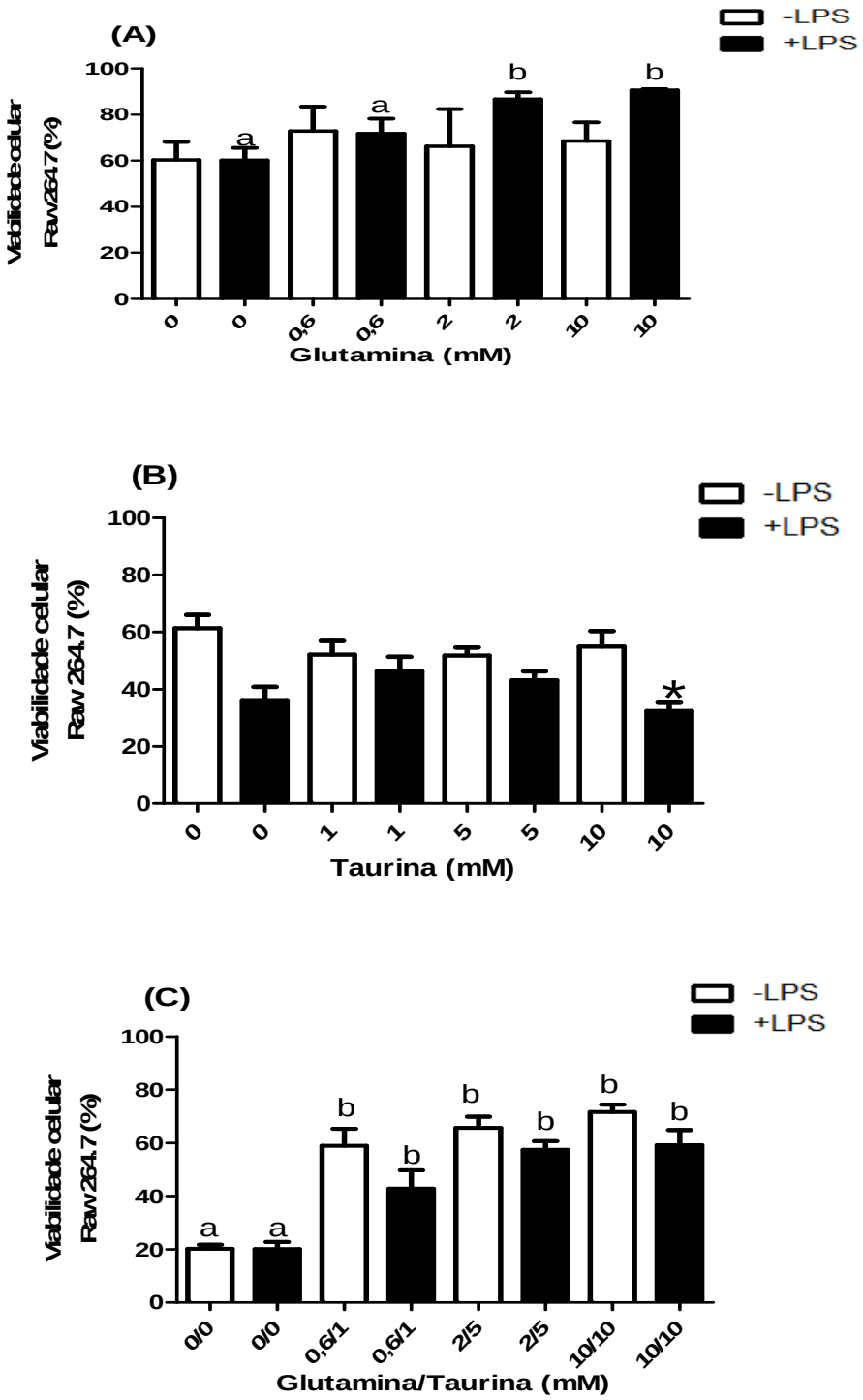


Figura 7. Resultados expressos em média ± desvio padrão do (A) ensaio de viabilidade por citometria realizado com 24 horas de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) MTT com 24 horas de estímulo com LPS e concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) MTT com 24 horas de estímulo com LPS e combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações de aminoácidos e com mesmo estímulo, ou seja, apenas na presença de LPS ou apenas na ausência de LPS. ($P \leq 0,05$; ANOVA e teste t). Em casa ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas).

8.3 CICLO CELULAR AVALIADO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para analisarmos se os tratamentos com os aminoácidos glutamina e taurina teriam alguma influência na progressão do ciclo celular das células Raw 264.7, quantificou-se a porcentagem de células na fase G0/G1 e S/G2/M do ciclo celular. Demonstrou-se nesse ensaio, que a exposição das células Raw 264.7 a glutamina (0,6; 2 e 10mM) na presença de LPS, (24 horas de estímulo) levou a uma menor porcentagem de células fase G0/G1 do ciclo celular em relação ao controle (0mM) e consequentemente levou a uma maior porcentagem de células a fase S/G2/Mitose do ciclo, portanto, aumento de células em divisão celular (Figura 8-A).

Na Figura 8-B, observamos nos grupos tratados com 1mM e 10mM de taurina na presença de LPS, apresentaram aumento da porcentagem de células em fase G0/G1, bem como diminuição da porcentagem de células em fase S/G2/M do ciclo quando comparados aos grupos que receberam a mesma concentração do aminoácido, porém ausentes de LPS (Figura 8-B).

Não encontramos diferença estatisticamente significativa para a exposição a ambos aminoácidos glutamina/taurina (Figura 8- C).

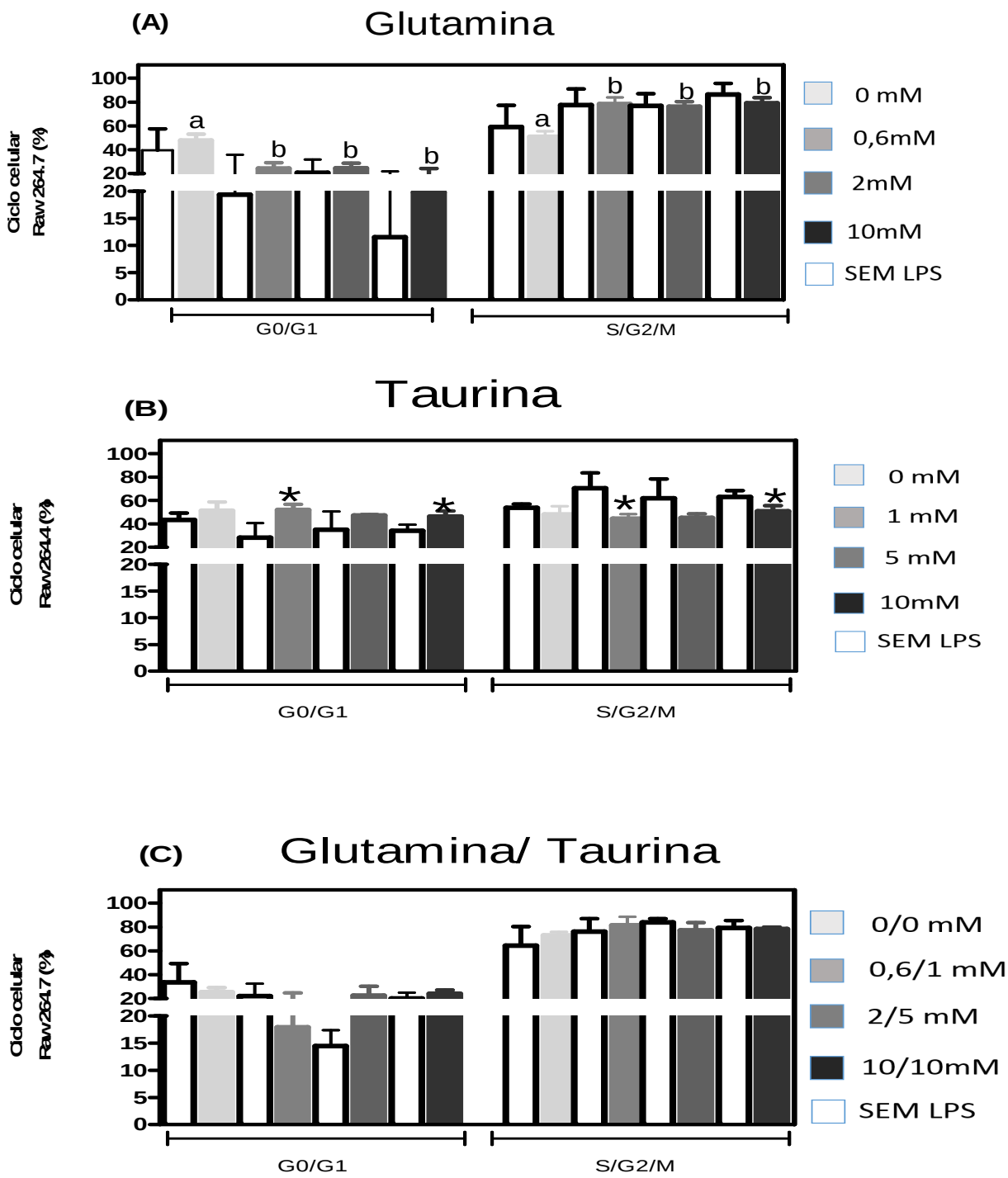


Figura 8. Resultados expressos em média ± desvio padrão do (A) ensaio de ciclo celular por citometria realizado com 24 horas de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) Combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações de aminoácidos e com mesmo estímulo, ou seja, apenas na presença de LPS ou apenas na ausência de LPS ($P \leq 0,05$; ANOVA e teste t). Em casa ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas)

8.4 DOSAGEM DE CITOCINAS: IL1α, IL1β, TNFα, IL6 E IL10

8.4.1 IL1α

Com objetivo de analisar a produção de citocinas pró-inflamatórias, as células da linhagem Raw 264.7 foram expostas aos aminoácidos glutamina e taurina por 24 horas e foram estimuladas com LPS por 30 minutos. Para dosagem IL1α, observamos uma tendência a menor síntese desta citocina ao aumentar a concentração de glutamina, na presença de LPS, como ilustrado na figura houve diferença estatística entre os grupos estimulados e os não estimulados, porém não encontramos diferença estatisticamente significativa para as diferentes concentrações de glutamina (Figura 9-A).

Em relação as células cultivadas na presença de taurina. Encontramos o mesmo efeito para grupos estimulados quando comparados com os grupos não estimulados na Figura 9-B, porém não houve diferença entre as diferentes concentrações de taurina.

Quando os aminoácidos foram associados observamos efeito do LPS nos grupos 0/0mM glutamina/taurina, o grupo que recebeu estímulo de LPS teve aumento da síntese da citocina quando comparado ao grupo sem LPS, figura 9-C, não observamos diferença estatisticamente significativa para as diferentes concentrações dos aminoácidos.

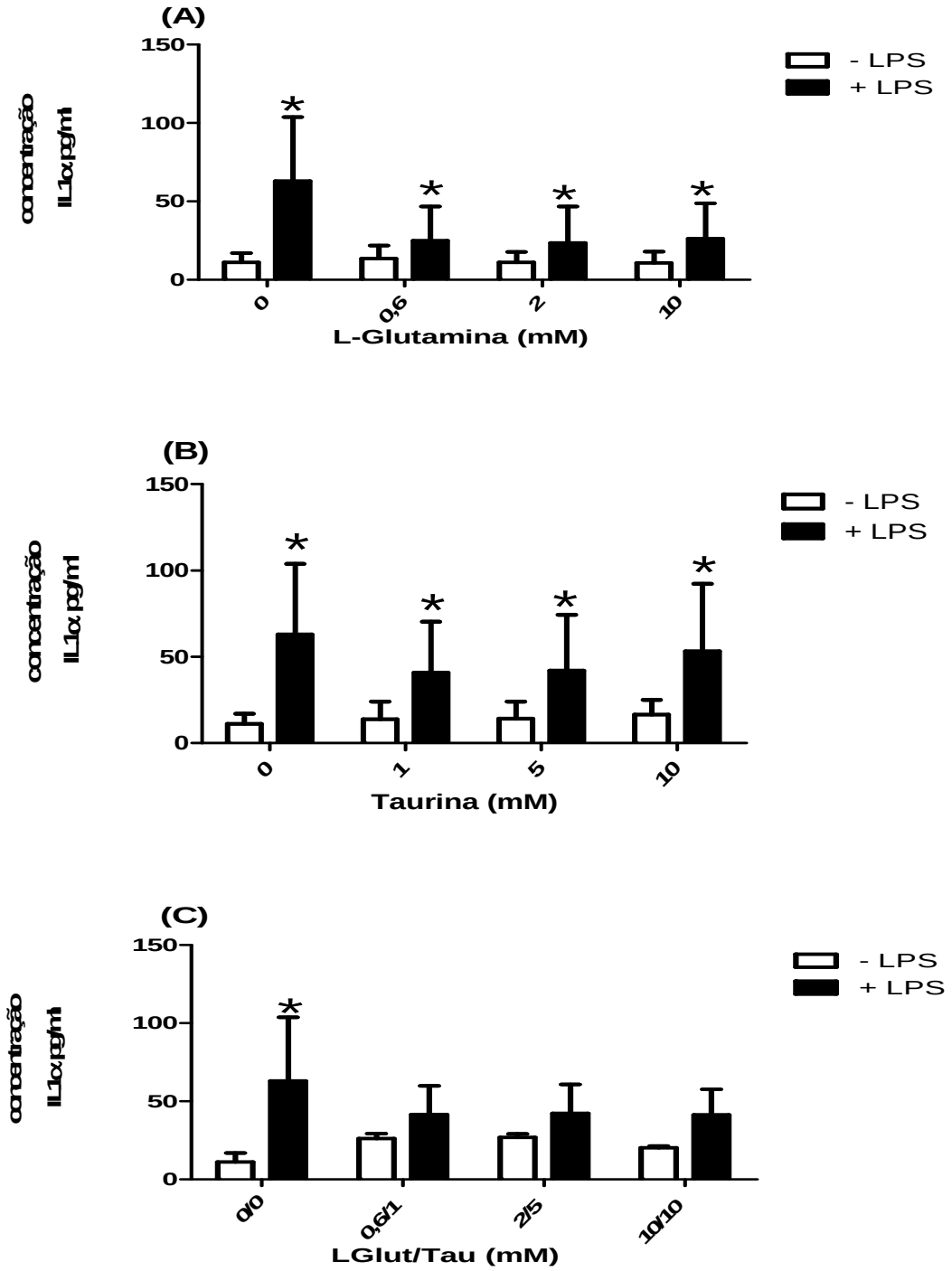


Figura 9. Resultados expressos em média ± desvio padrão da dosagem da citocina IL1α (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações de aminoácidos e com mesmo estímulo, ou seja, apenas na presença de LPS ou apenas na ausência de LPS ($P \leq 0,05$; ANOVA e teste t). Em casa ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas)

8.4.2 IL1β

Ao analisarmos a síntese de IL1β observamos que no grupo estimulado com LPS o aumento da concentração de glutamina 2mM e 10mM levou a uma diminuição da síntese da citocina quando comparada aos grupos 0mM e 0,6mM de glutamina, figura 10-A. Observamos também que os grupos estimulados tratados com 0mM e 0,6mM de glutamina apresentaram maior síntese de citocina quando comparados aos grupos sem estímulo e expostos a mesma concentração do aminoácido, figura 10-A.

Para exposição das células com taurina, foi possível observar que nos grupos estimulados com LPS as células expostas a 0mM, 5mM e 10mM de taurina apresentaram maior síntese da produção de IL1β, quando comparadas aos grupos sem LPS e expostas a mesa concentração do aminoácido, figura 10-B.

A exposição a ambos aminoácidos também levou a uma menor síntese da citocina, figura 10-C, isso foi observado nos grupos com LPS e tratados com 2/5mM e 10/10mM de glutamina/taurina quando comparados aos grupos 0/0mM e 0,6/1mM glutamina/taurina.

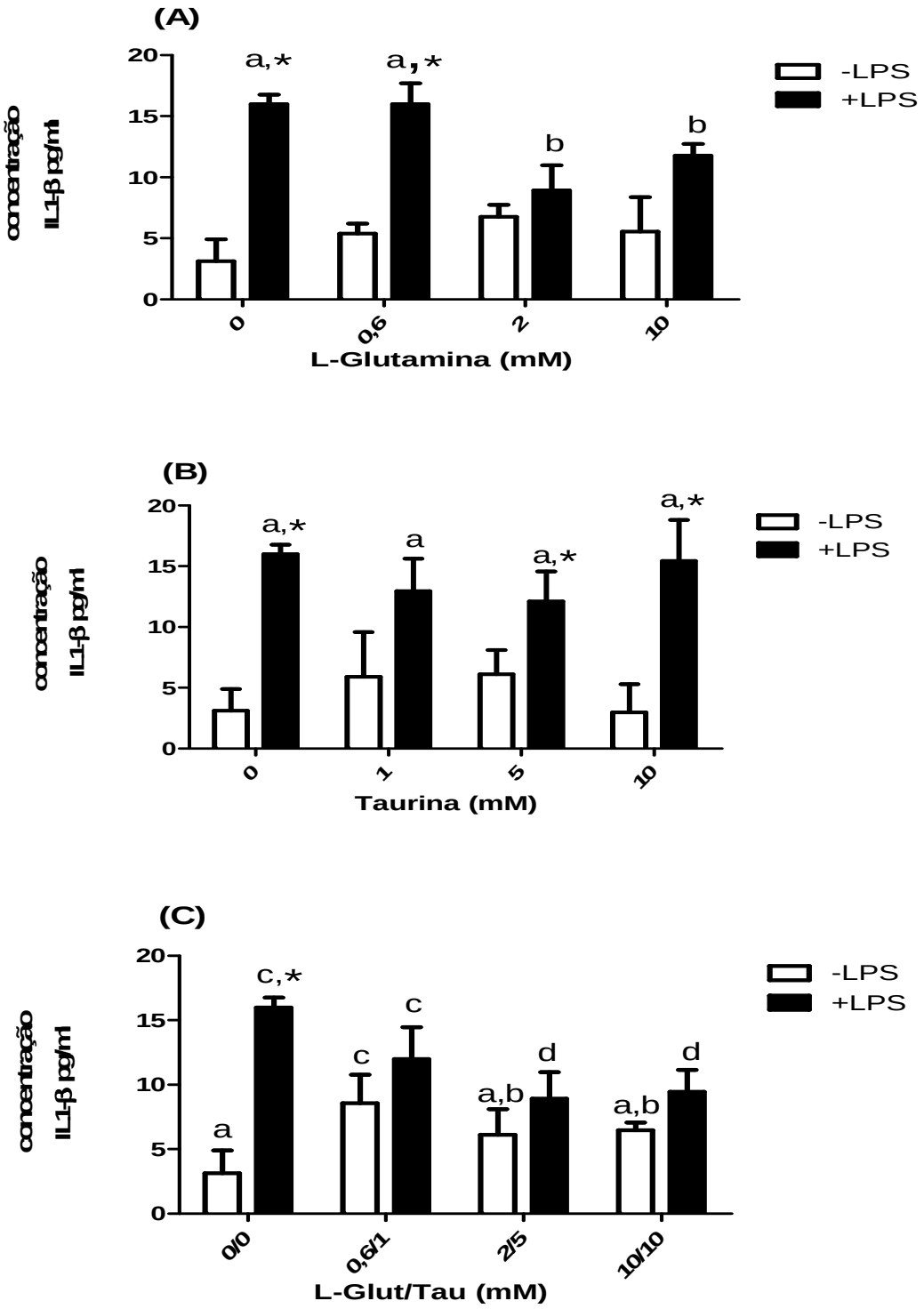


Figura 10. Resultados expressos em média ± desvio padrão da dosagem da citocina IL1β (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações de aminoácidos e com mesmo estímulo, ou seja, apenas na presença de LPS ou apenas na ausência de LPS ($P \leq 0,05$; ANOVA e teste t). Em casa ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas).

8.4.3 TNFα

Na dosagem da síntese da citocina TNFα observamos que os grupos com LPS e tratados com 0,6mM; 2mM e 10mM de glutamina apresentaram menor síntese da citocina quando comparados ao controle 0mM de glutamina, figura 11-A. Também foi observado que o grupo estimulado apresentou maior síntese da citocina quando comparado ao grupo não estimulado.

Observamos nas células que foram expostas a taurina uma tendência a menor síntese da citocina TNFα, que foi paralela ao aumento da concentração de taurina, os grupos estimulados apresentaram maior síntese de TNFα em relação aos grupos sem estímulo, figura 11-B.

Demonstrou-se que no tratamento com ambos aminoácidos, as células estimuladas que receberam maiores concentrações de glutamina e taurina 10/10mM apresentaram menor síntese de TNFα quando comparadas as células que receberam 0/0mM; 0,6/1mM e 2/5mM, figura 11-C. Neste gráfico ainda observamos que o efeito do LPS levou a um aumento da síntese da citocina nas células tratadas com 0/0mM; 0,6/1mM e 2/5mM quando comparadas as células que não receberam estímulo por LPS.

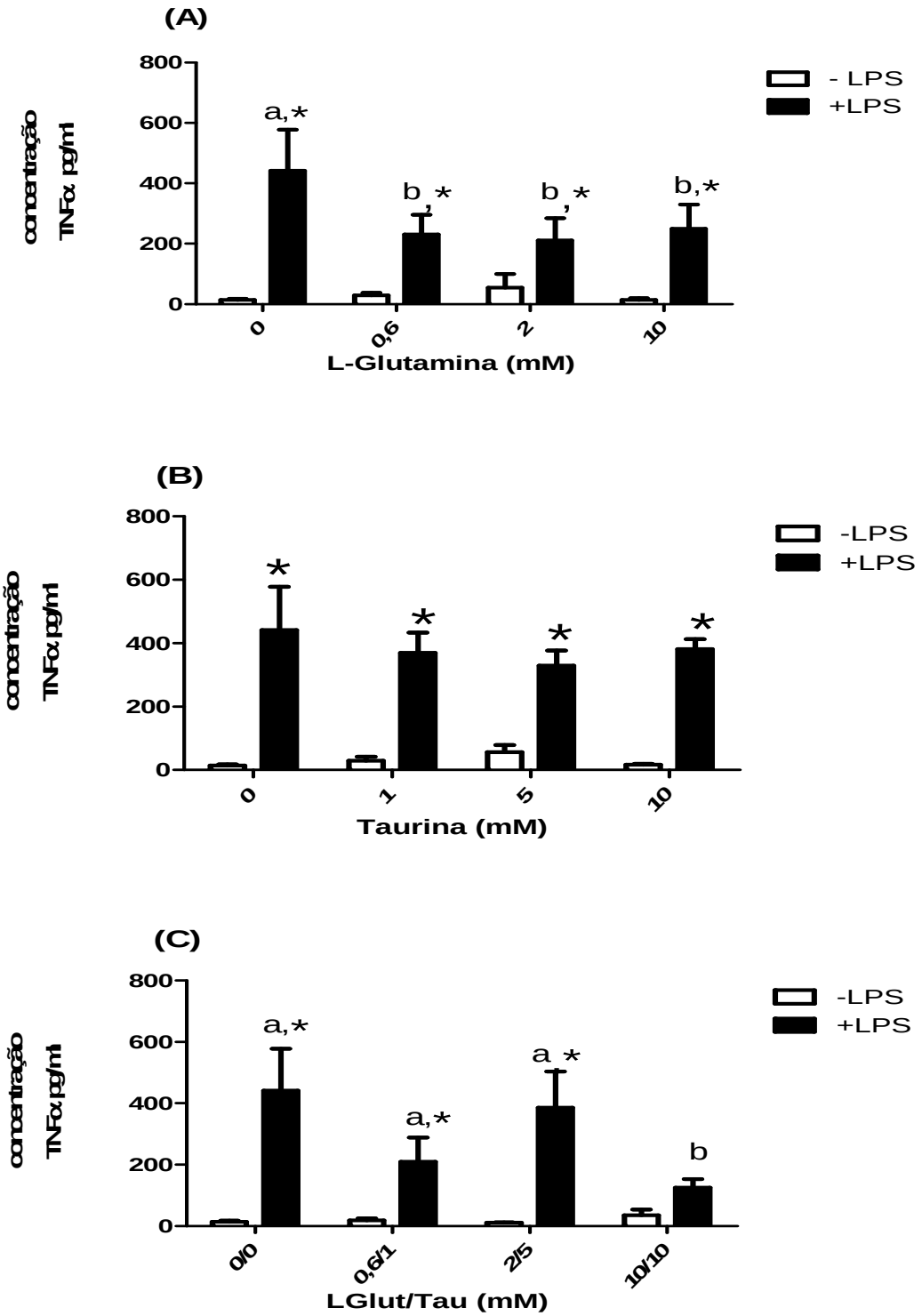


Figura 11. Resultados expressos em média ± desvio padrão da dosagem da citocina TNFα (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações de aminoácidos e com mesmo estímulo, ou seja, apenas na presença de LPS ou apenas na ausência de LPS ($P \leq 0,05$; ANOVA e teste t) . Em casa ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas)

8.4.4 IL6

Para citocina IL6 não encontramos diferença estatisticamente significativa, perante as diferentes concentrações dos aminoácidos tanto para células tratadas com glutamina, taurina ou para associação dos aminoácidos.

Não observamos também influência do LPS na síntese de IL6 para nenhum dos tratamentos aos quais as células foram expostas.

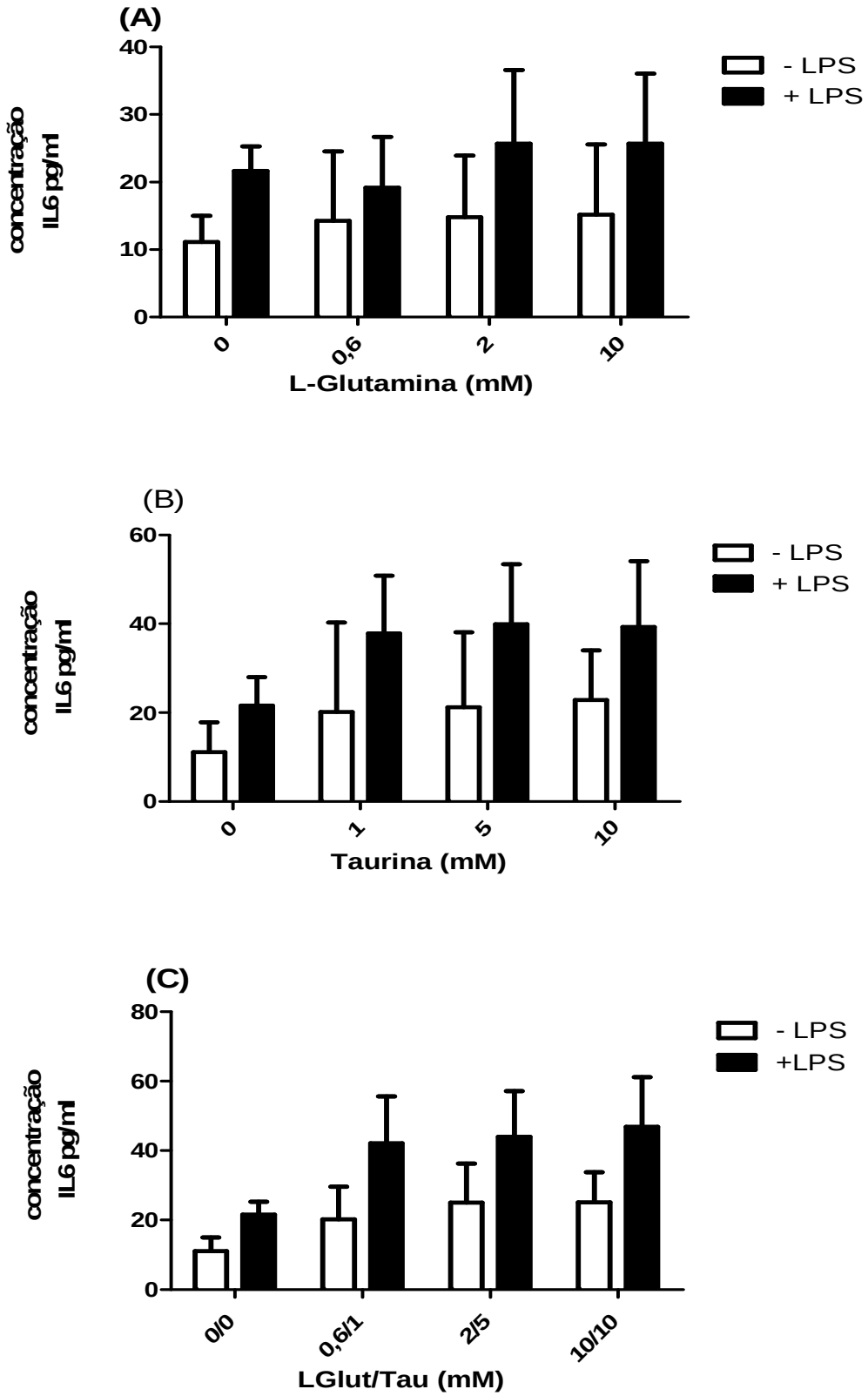


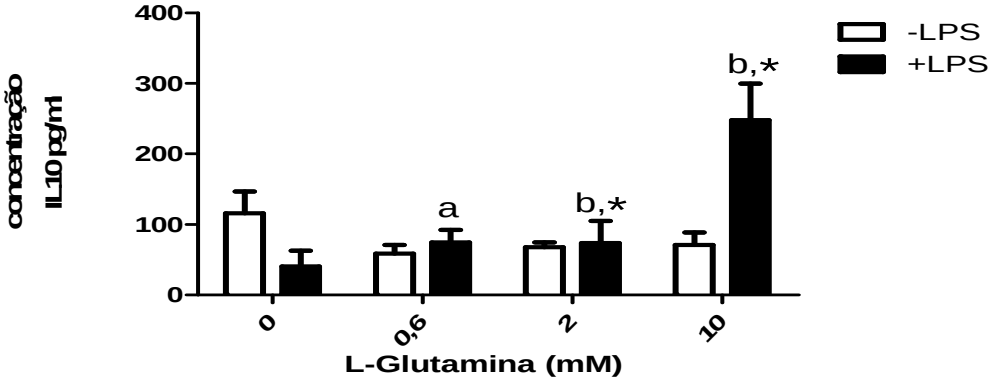
Figura 12. Resultados expressos em média ± desvio padrão da dosagem da citocina IL6 (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. Em casa ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas)

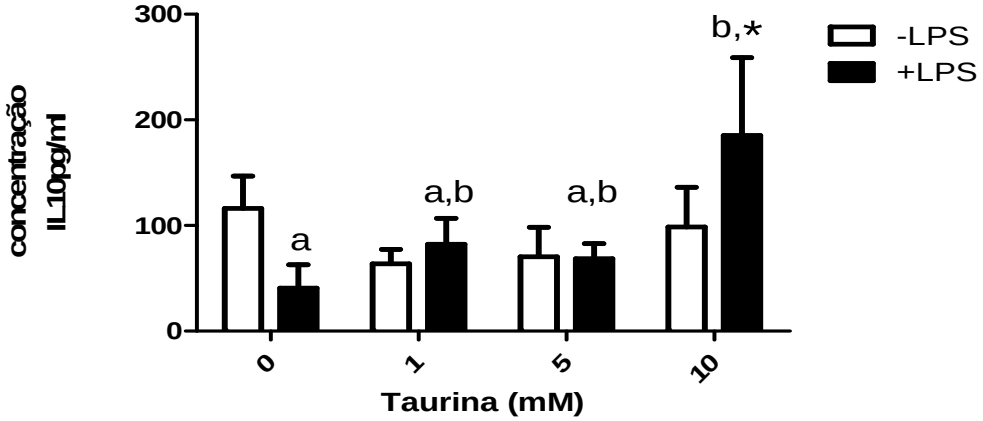
8.4.5 IL10

Além da dosagem de citocinas pró-inflamatórias, também analisamos a síntese da citocina anti-inflamatória IL10. Para células que receberam 2mM e 10mM de glutamina na presença de LPS houve um aumento da citocina, quando comparados aos grupos 0mM e 0,6mM. Os grupos com LPS 2mM e 10mM também mostraram aumento na síntese de IL10 quando comparados aos grupos que receberam a mesma concentração do aminoácido ausentes de LPS.

Células que receberam tratamento com taurina e estimulo de LPS tiveram aumento da produção de IL10 quando foram expostas a 10mM do aminoácido, quando comparadas ao grupo controle 0mM.

Na associação dos aminoácidos os grupos 2/5mM e 10/10mM com LPS apresentaram maior síntese de IL10 quando comparados aos grupos que receberam a mesma concentração do aminoácido, porém ausentes de LPS.





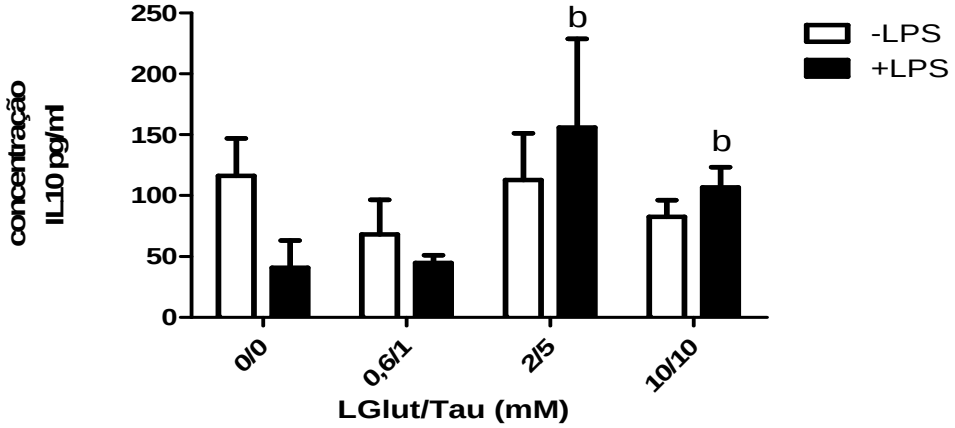
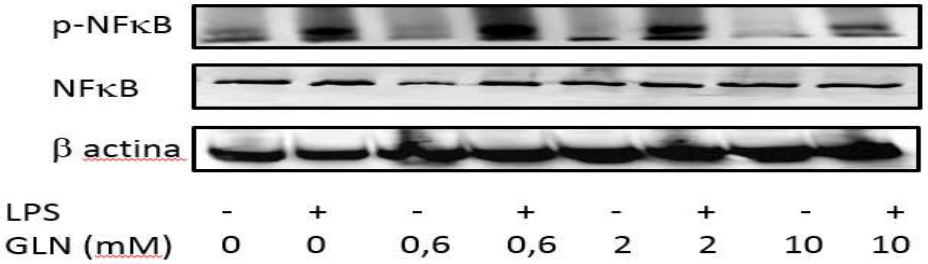


Figura 13. Resultados expressos em média ± desvio padrão da dosagem da citocina IL10 (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações de aminoácidos e com mesmo estímulo, ou seja, apenas na presença de LPS ou apenas na ausência de LPS ($P \leq 0,05$; ANOVA e teste t). Em casa ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas)

8.5 RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO NFκB (TOTAL E FOSFORILADO)

Observamos uma tendência da diminuição da relação p-NFκB/NFκB ao aumentarmos a concentração de glutamina, indicando menor expressão da proteína de NFκB ativa (fosforilada), figura 14-A. Esta tendência também foi observada para a exposição das Raw 264.7 a ambos aminoácidos, figura 14-C., Porém isso não foi demonstrado para o tratamento apenas com taurina, onde notou-se que há maior expressão da proteína do NFκB fosforilado em células ativadas, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações de taurina, figura 14-B.



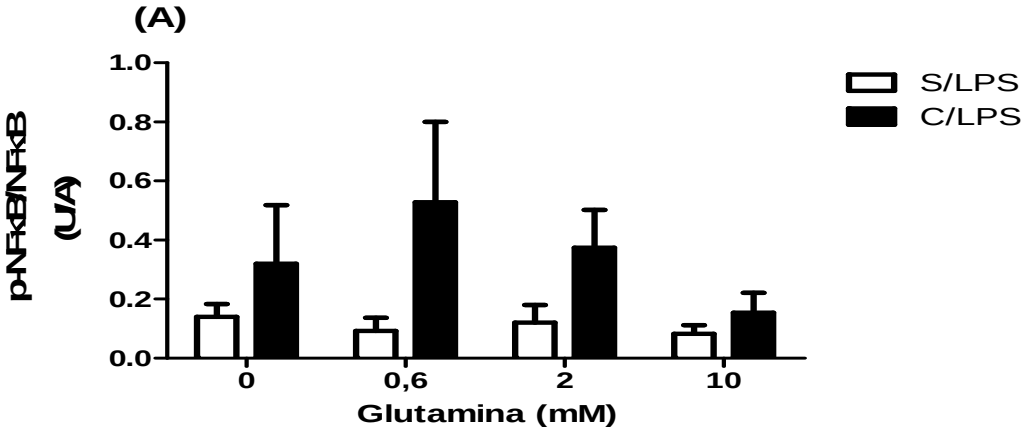
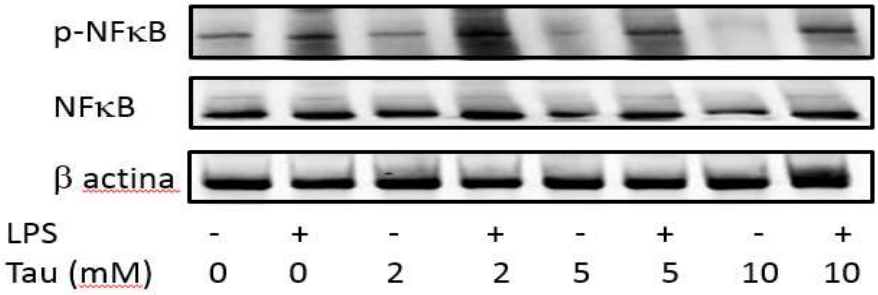


Figura 14-A. Resultados expressos em média ± desvio padrão da expressão pNF-κB/NF-κB (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. (P≤0,05; ANOVA e teste t).



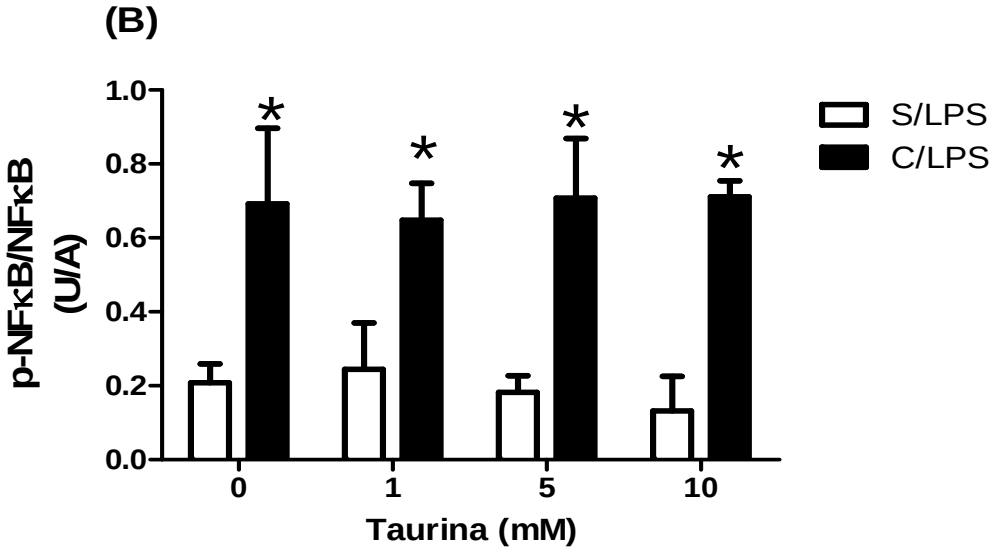


Figura 14-B. Resultados expressos em média ± desvio padrão da expressão pNF-κB/NF-κB (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. (P≤0,05; ANOVA e teste t).

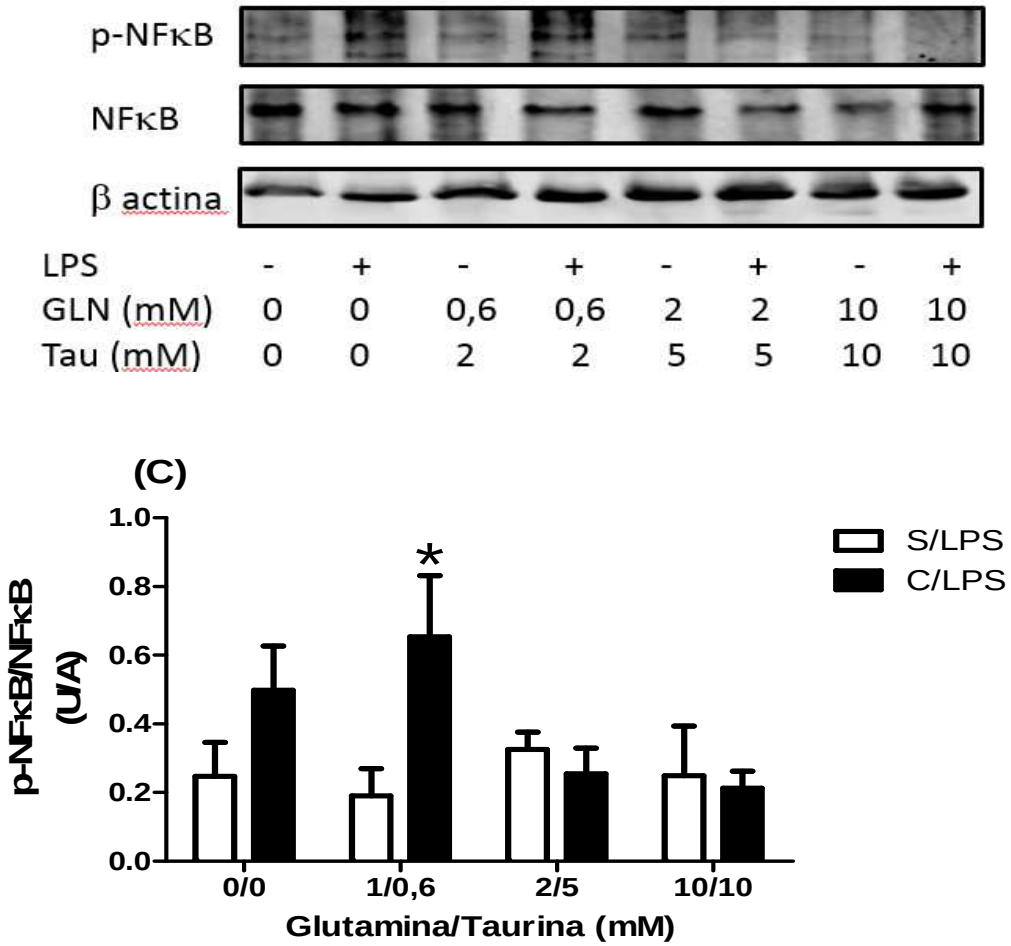


Figura 14-C. Resultados expressos em média ± desvio padrão da expressão pNF-κB/NF-κB (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. (P≤0,05; ANOVA e teste t).

8.6 RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO IKB-α (TOTAL E FOSFORILADO)

Observamos uma tendência da diminuição da relação p-IκB/IκB ao aumentarmos a concentração de glutamina 10mM, indicando menor expressão da proteína de IκB ativa (fosforilada), figura 15-A. Esta tendência também foi observada para a exposição das Raw 264.7 a taurina 10mM, figura 15-B e igualmente para associação dos aminoácidos 10/10mM, figura 15-C.

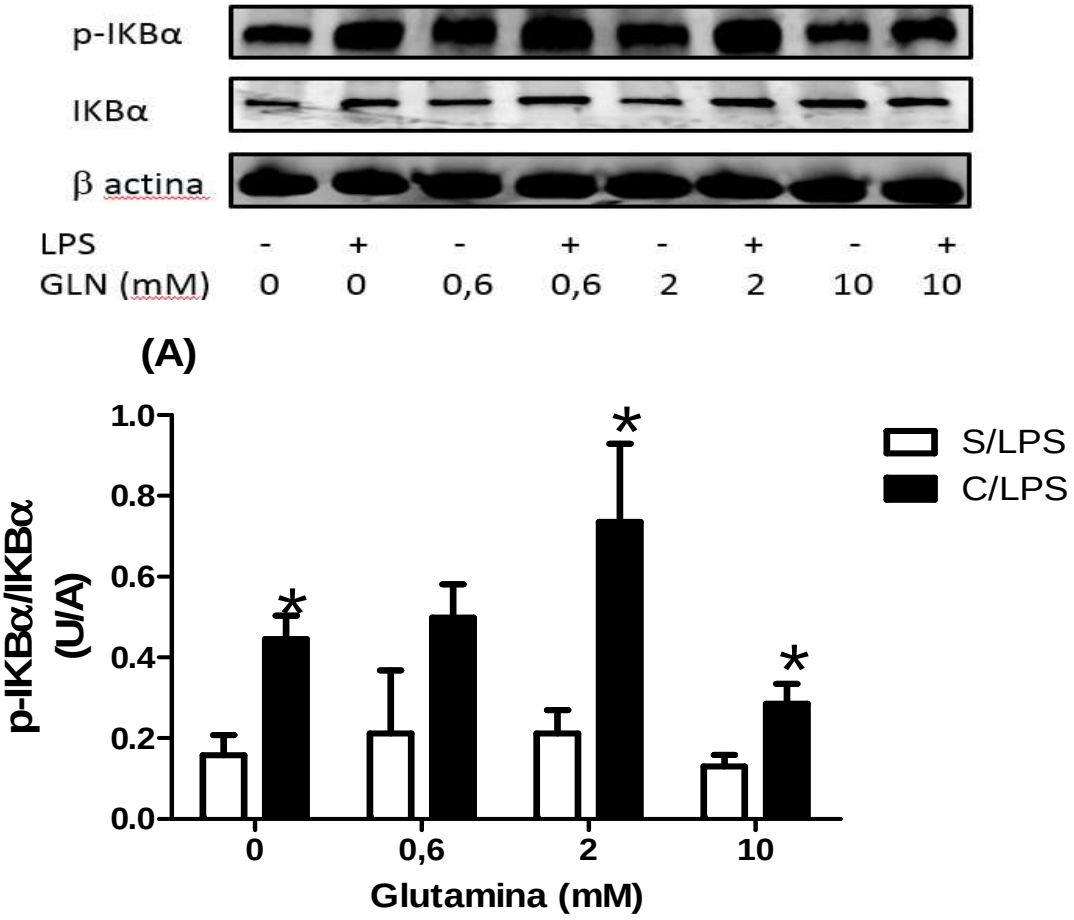
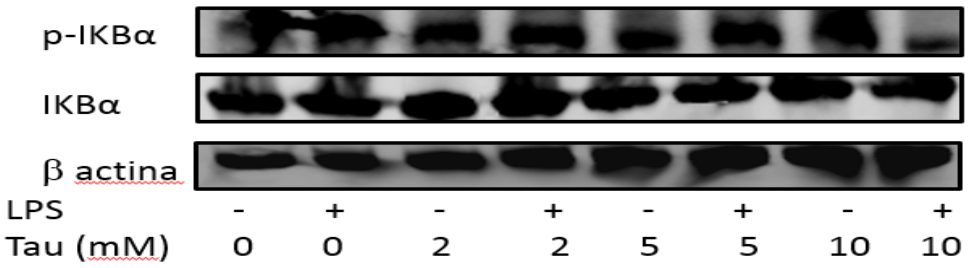


Figura 15-A. Resultados expressos em média ± desvio padrão da expressão pIκB/IκB (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. (P≤0,05; ANOVA e teste t).



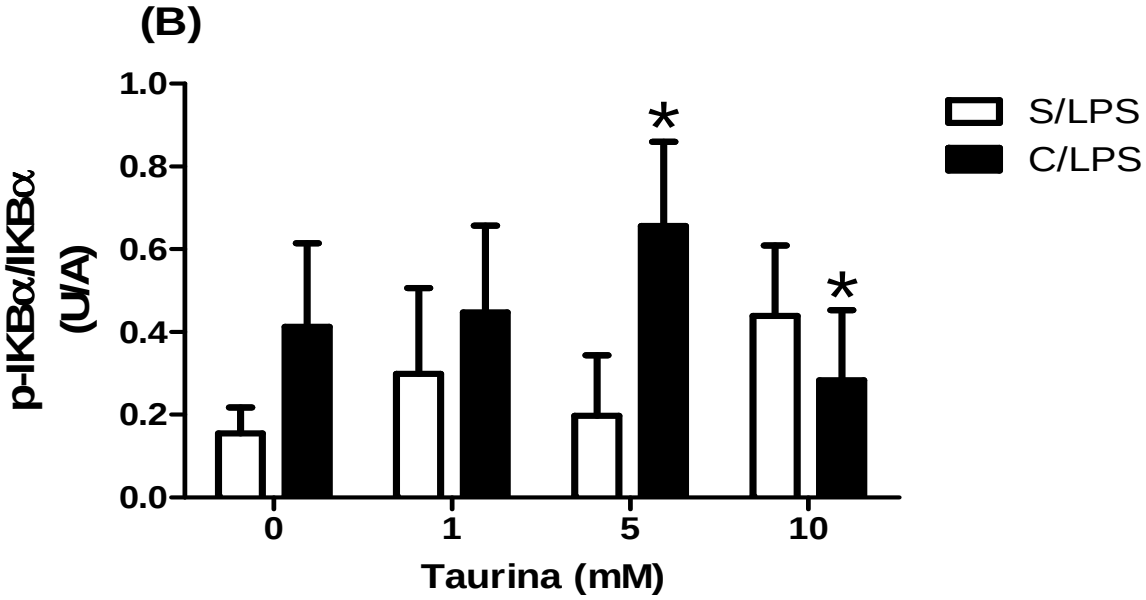


Figura 15-B. Resultados expressos em média ± desvio padrão da expressão pIκB/IκB (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. ($P \leq 0,05$; ANOVA e teste t).

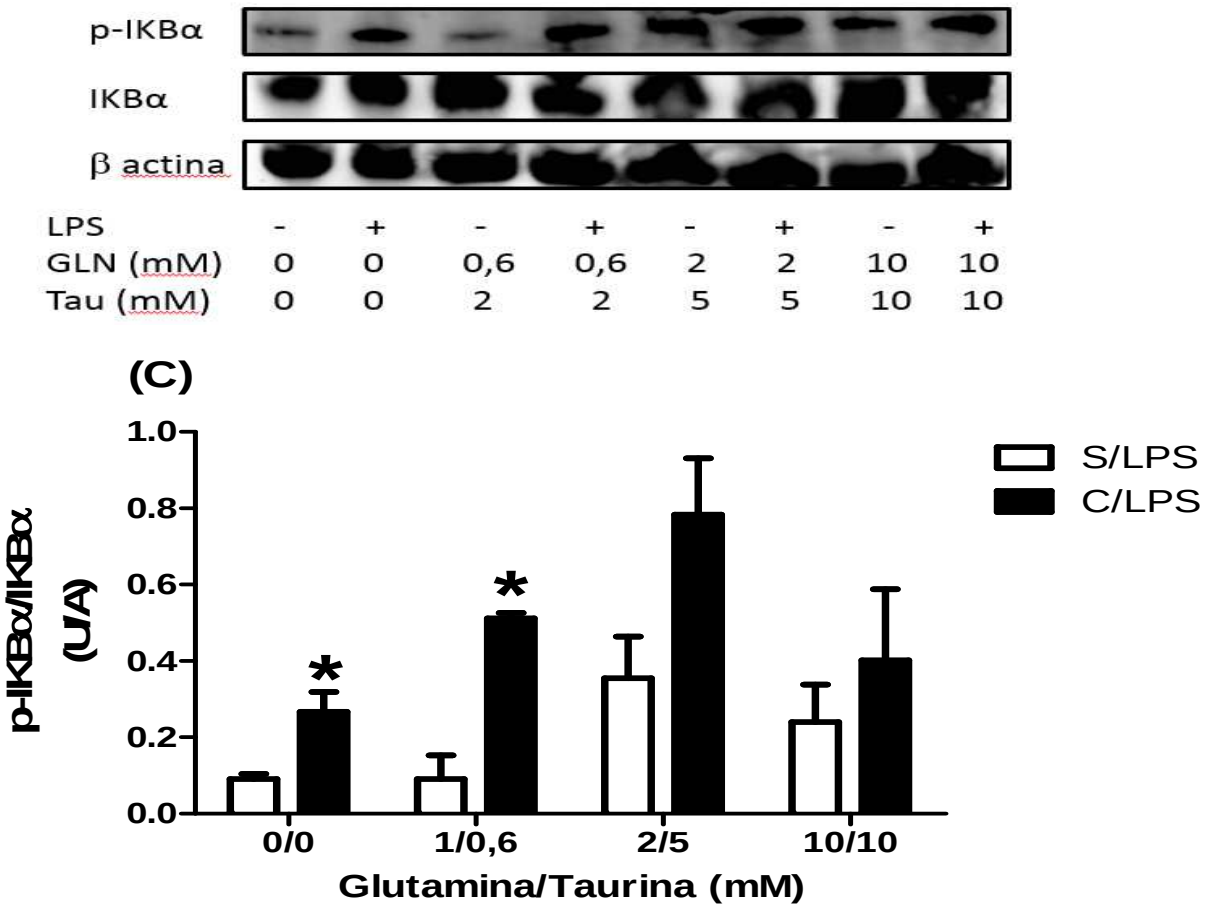


Figura 15-C. Resultados expressos em média ± desvio padrão da expressão pIκB/IκB (A) realizado com 30 minutos de estímulo de LPS e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem estímulo e com estimulo de LPS e mesma concentração de aminoácido. ($P \leq 0,05$; ANOVA e teste t).

8.7 MIGRAÇÃO CELULAR

No ensaio de migração celular utilizamos FMLP como quimioatraente. Os primeiros ensaios foram realizados com 24 horas de estímulo com FMLP, porém não foi observado migração celular. Decidiu-se realizar outro ensaio, neste, as células foram expostas 48 horas ao FMLP bem como aos aminoácidos glutamina, taurina ou glutamina/taurina. Observamos menor porcentagem de células migrando nas concentrações 0,6 e 2mM de glutamina, figura 16-A. Para taurina observamos aumento, dose-dependente, da porcentagem de células que migraram com o aumento das concentrações de taurina 5 e 10mM, figura 16-B. Já para associação de ambos aminoácidos não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos com os aminoácidos, figura 16-C.

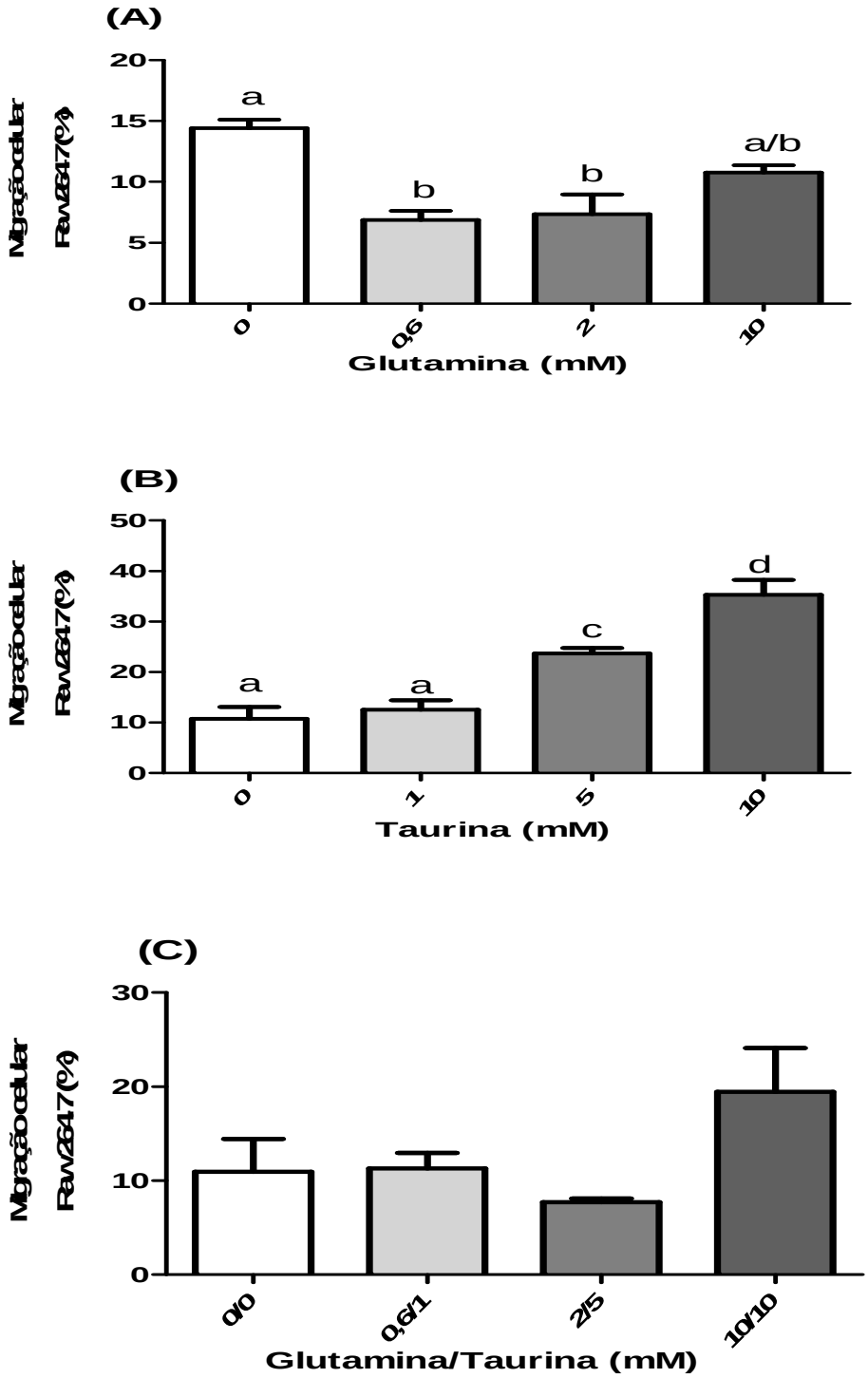


Figura 16. Resultados expressos em média ± desvio padrão da migração celular (A) realizado com 48 horas de estímulo de FMLP e concentrações diferentes de glutamina: 0mM; 0,6mM; 2mM e 10mM. (B) concentrações diferentes de taurina: 0mM; 1mM; 5mM e 10mM. (C) combinações de concentrações diferentes de glutamina e taurina: 0/0mM; 0,6/1mM; 2/5mM e 10/10mM. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações de aminoácidos e com mesmo estímulo, ou seja, apenas na presença de LPS ou apenas na ausência de LPS ($P \leq 0,05$; ANOVA). Em cada ponto avaliado foi utilizado (n=3 placas)

9.DISCUSSÃO

O sistema imunológico preserva a integridade do organismo perante o ambiente que ele está inserido, de forma a defendê-lo de agentes agressores. O processo inflamatório apresenta papel crucial na eliminação desses agentes, destacando-se para esta função os monócitos e macrófagos, que após as barreias naturais da pele e mucosas, constituem a primeira linha de defesa contra infecções, apresentando papel chave na resposta imune (ABBAS *et al.,* 2013). Essas células apresentam importante papel de fagocitar e destruir microrganismos, apresentar antígenos, fato que coloca essas células como importantes mediadores da resposta imune específica; e também de sintetizar diversas substâncias que atuam como mediadores inflamatórios, como por exemplo as citocinas (CAVALLO *et al*., 1994; ADAMS, 1992).

As reações imunológicas são essenciais para controle e eliminação da infecção, porém ao mesmo tempo se essa resposta ocorrer de forma demasiada, um estado de desequilíbrio pode se instalar, levando a lesão de tecidos, falência de órgãos e até morte do indivíduo (AKAMINE *et al.*, 1994).

Sabe-se que há muitos anos, o uso de nutrientes específicos é aplicado com o objetivo de modular o sistema imune em pacientes enfermos (CALDER, 2003). Esta intervenção é conhecida como imunonutrição ou terapia nutricional.

Utilizada para evitar o agravamento de doenças, bem como, prevenir que o estado de subnutrição se estabeleça, a terapia nutricional tem papel central na recuperação e manutenção do estado de saúde de pacientes enfermos, uma vez que possui capacidade de fornecer quantidades adequadas de macro e micro nutrientes (FERREIRA *et al.,* 2007; TEIXEIRA *et al.,* 2006).

Os principais alvos da terapia nutricional são: a função da barreira de mucosas, a defesa celular e a inflamação local ou sistêmica. Para tanto, os nutrientes mais utilizados são: arginina, glutamina, aminoácidos de cadeia ramificada, ômega 3 e nucleotídeos (CALDER, 2003).

Como já mencionado, os monócitos e macrófagos são células que apresentam diversas funções no sistema imune, incluindo elevada capacidade de secretar grande número de compostos, como por exemplo: enzimas, proteínas plasmáticas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prostaglandinas e citocinas. Para realizarem suas funções, essas células possuem elevada taxa de utilização de aminoácidos, especialmente quando ativadas. Dentre esses aminoácidos, podemos ressaltar a importância da glutamina e taurina. Há tempos que a literatura já demonstra a evidente importância destes aminoácidos para o metabolismo e funcionalidade celular. A glutamina vem sendo descrita como importante fornecedora de energia para células intestinais e células do sistema imune, fornecedora de nitrogênio para síntese de purinas e pirimidinas, substrato para gliconeogênese no fígado e também atua no equilíbrio ácido-básico nos rins. Já a taurina possui importante ação osmorregulatória, capacidade antioxidativa, controle da sinalização e homeostasia do cálcio, além do papel clássico na conjugação de ácidos biliares (WU *et al.*, 1992; FROSINI *et al.*, 2003). Ambos aminoácidos ainda apresentam influência na produção de mediadores inflamatórios.

Por este contexto, no estudo presente optamos pela investigação de aspectos da capacidade imunomodulatória dos aminoácidos glutamina e taurina em macrófagos da linhagem Raw 264.7.

Inicialmente foi avaliada a viabilidade celular na presença dos aminoácidos glutamina e taurina, sobre as Raw 264.7 estimuladas com LPS, pelo ensaio de MTT. No primeiro ensaio, escolhemos 30 minutos para estímulo das células com LPS. Trabalhos

do nosso grupo, utilizando macrófagos peritoniais de camundongos, demonstraram que o tempo de 30 minutos foi suficiente para estimular a produção de citocinas sem levar à morte celular (FOCK *et al*., 2007). Porém, no atual trabalho, não encontramos diferenças estatisticamente significativa nos ensaios de MTT, quando as células foram estimuladas com LPS por 30 minutos. Dessa forma, decidimos realizar outro ensaio de MTT com tempo de estímulo de LPS de 24 horas, mesmo tempo de exposição das células aos aminoácidos, glutamina ou taurina ou glutamina/taurina. Para este segundo ensaio, observamos que o aumento da concentração de glutamina para 10mM, na presença de LPS, levou a um aumento da viabilidade celular quando comparado com mesma concentração, porém ausente de LPS. O mesmo ocorre quando os aminoácidos são associados, nas concentrações 2/5mM e 10/10mM de glutamina e taurina respectivamente.

Utilizando também 24 horas de estímulo com LPS, os resultados da viabilidade celular avaliados por citometria de fluxo igualmente demonstraram, que na presença de LPS o aumento da concentração de glutamina 2mM e 10 mM, levou a um aumento da viabilidade celular.

Acreditamos que este fato possa ser explicado pelo importante papel da glutamina na proliferação celular. A literatura mostra que isso também já foi observado em outros tipos celulares, como por exemplo: linfócitos, enterócitos e células tumorais (NEWSHOLME e CALDER, 1997; OBRADOR *et al*.,2001; MATES *et al.*, 2002).

Em 1984, ENGSTROM e ZETTERBERG demonstraram que a produção de purinas e pirimidinas foi estimulada pela administração extracelular de glutamina. O primeiro passo para a síntese de novo de purinas, ocorre com a conversão de glutamina fosforibosilfosfato em ribose-5-fosfato. Assim como a síntese de pirimidinas se inicia com a produção de carbamail fosfato, a partir de glutamina, dióxido de carbono e

adenosina trifosfato. ARDAWI *et al.*, 1983, demonstraram aumento da proliferação de linfócitos de ratos, em até quatro vezes após adição de glutamina ao meio de cultura. Neste trabalho encontramos resultados semelhantes, observamos menor número de células em fase G0/G1 do ciclo celular na presença de glutamina (0,6; 2 e 10 mM) quando comparado com o controle negativo 0 mM de glutamina e paralelamente, observamos que um número maior de células se encontra em estágio G2/S/M, ou seja, em divisão celular, na presença de glutamina.

Outra hipótese se deve ao fato da glutamina estar relacionada com reparo e defesa celular. A glutamina pode modular a ativação de proteínas de estresse ou choque térmico (*heat schock proteins* - HSPs), que estão relacionadas com a resposta antiapoptotica celular. As HSPs desencadeiam respostas intracelulares quando a célula é exposta a algum estresse. Atuando de forma colaborativa para o reparo de estruturas na molécula proteica, bem como na identificação e remodelamento de proteínas danificadas durante uma situação de estresse. Estudos observaram que quando 2 a 10mM de glutamina é adicionado ao meio de cultura, há um aumento da proteção de enterócitos submetidos a lesões do tipo oxidativo (WISCHMEYER *et al., 1997).*

Em relação a exposição a taurina, não observamos diferença estatisticamente significativa para os ensaios de MTT tanto com 30 minutos quanto com 24 horas de exposição ao LPS. Porém no ensaio de viabilidade por citometria de fluxo, encontramos um número menor de células viáveis quando aumentamos a concentração de taurina (10mM) na presença de LPS. Observamos também a taurina (1 e 10mM) na presença de LPS quando comparado ao grupo de mesma concentração, porém sem estímulo, leva a um número menor de células em fase G2/S/Mitose do ciclo celular, portanto um menor número de células em divisão. Para estes resultados, nós hipotetizamos que possa haver influência da taurina na indução da apoptose e na inibição de proliferação celular.

A literatura mostra que a taurina tem propriedades antitumorais, porém estes mecanismos ainda não são completamente elucidados. Estudos demonstraram em uma análise bioquímica, aumento da expressão da proteína pró-apoptotica “B-cell lymphoma-2-associated X (Bax) ” com o aumento das doses de taurina (ZANG et al.,2014). Segundo Neary PM et al., 2010, a taurina também atuar como agente antitumoral pela diminuição da expressão de metaloproteinase 2 e aumentando a expressão de N-acetilgalactosaminiltransferase. Outros estudos demonstraram que a taurina foi capaz de induzir apoptose em células de câncer de cólon de humanos, pelo aumento da expressão do gene modulador de apoptose, PUMA (ZANG X *et al.*, 2014).

Quando macrófagos são estimulados por LPS *in vitro*, há síntese de citocinas, como por exemplo TNFα, essa capacidade de síntese, deve-se ao fato do LPS conseguir ativar essas células por meio da sua ligação as proteínas CD14 e TLR4, presentes na membrana plasmática (MIYAKE, 2003). Isso leva a ativação de moléculas envolvidas na transdução do sinal com a fosforilação do inibidor do NFκB, IκB-α, que resulta na degradação do IκB-α e a subsequente liberação e migração do NFκB para o núcleo da célula, onde este promove a ativação de genes, entres eles os que codificam a síntese de citocinas (BEUTLER *et al.*, 2006).

Observamos neste trabalho, que houve uma tendência da diminuição de expressão da relação de p-NFκB/NFκB quando se aumentou a concentração de glutamina, portanto há menor expressão da proteína ativa, aquela capaz de migrar para o núcleo. A mesma tendência foi observada quando houve associação de glutamina/taurina. Paralelamente, o mesmo foi encontrado para relação p-IκB/IκB, ou seja, há menor expressão de proteína inibitória ativa de NFκB fosforilada, p-IκB. Concluímos, portanto, que a os aminoácidos glutamina e taurina quando em maiores concentrações (10mM) podem levar a diminuição da fosforilação do NFκB, fazendo

com que se tenha menor migração deste para o núcleo e menor transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias.

Esses resultados corroboram com os resultados encontrados na produção das citocinas pró-inflamatórias IL1α, Il1β e TNFα, uma vez que ao aumentarmos a concentração de glutamina e taurina, observamos menor produção das mesmas. Complementarmente, encontramos resultados opostos para a citocina anti-inflamatória IL-10, a qual teve maior síntese em resposta ao aumento dos aminoácidos.

Em nosso grupo já foram encontrados resultados semelhantes, segundo LIMA *et al.*, 2012, células de macrófagos peritoneais, quando cultivadas com glutamina em concentrações de 2 ou de 10 mmol/L, apresentaram redução da proteína fosforilada IκBα e também diminuição da expressão de NFκB fosforilado, bem como redução na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNFα e IL1α.

Também em concordância com nossos resultados, WISCHMEYER *et al.*, 2003, relatou que a suplementação com glutamina acima de 4mmol/L possui capacidade de diminuir a produção de TNFα em células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro* com LPS, enquanto CRUZAT *et al*., 2009 demonstrou *in vivo* que a suplementação com glutamina na forma livre ou como dipeptídeo diminui a liberação de TNF-α imediatamente após o exercício intenso..

Alguns estudos revelam que a glutamina diminui a produção de IL1, IL6 e IL8 e aumenta a produção de IL10 na mucosa duodenal de humanos (COEFFIER *et al.*, 2001). Segundo HUBERT-BURON *et al*., 2006, os efeitos no pré tratamento com glutamina reduz a produção de citocinas pró inflamatórias.

Em contrapartida, WALLACE e KEAST, 1992 e YASSAD *et al.*, 1997, demonstraram que o aumento da secreção de IL1 e IL6 por macrófagos estimulados por LPS é dependente da concentração de glutamina e ROGERO *et al*., 2010 demonstrou

que macrófagos peritoneais, quando estimulados com LPS e tratados com glutamina, apresentam redução na expressão das proteínas IKK-β e IκBα, levando a um aumento da expressão do NFκB e consequentemente aumentando também a síntese de TNFα. Segundo NEWSHOLME *et al*., 1999, macrófagos peritoneais de camundongos ativados com BCG e incubados em meio de cultura na presença de 2mM de glutamina apresentam a capacidade de sintetizarem TNFα em altas taxas quando estimulados por LPS.

Um possível mecanismo da ação imunomodulatória da taurina, foi demonstrado pelo autor LIN *et al.*, 2015, em um trabalho que utilizou ratos com inflamação hepática crônica, este autor observou que a taurina inibiu a sinalização da via TLR-4/ MyD88 e IkB/NFκB p65, suprimindo dessa forma proteínas associadas a inflamação e também citocinas, melhorando o quadro de inflamação hepática crônica.

Sabe-se que a taurina tem atividade antioxidante, uma vez que atenua a toxicidade do ácido hipoclórico, pois ao reagir com este, produz o composto taurina-cloramina Tau-Cl, que é mais estável e menos tóxico para as células, capaz de protege-las do dano oxidativo causado por moléculas reativas, como o peróxido de hidrogênio, H_2O_2.

Segundo KARABAY *et al.*, 2008 o peróxido de hidrogênio pode atuar como sinalizador intracelular, ativando o NFκB e regulando a expressão e atividade da enzima iNOS, conferindo ao H_2O_2 função de segundo mensageiro para ativação do NFκB. Demonstraram neste mesmo estudo que o tratamento com taurina foi eficiente para diminuir os níveis de peróxido de hidrogênio em macrófagos estimulados com LPS, consequentemente levando a uma menor ativação de NFκB.

Outros estudos também avaliaram os efeitos da taurina cloramina Tau-Cl em macrófagos estimulados com LPS. O LPS, conhecido como indutor da via do MAPK, e

este por sua vez capaz fosforilar e degradar o IκBα, ativando e translocando o NFκB para o núcleo. KIM e KIM , 2005 demonstraram que a Tau-Cl inibiu a ativação via de sinalização do MAPK induzida pelo LPS, portanto inibindo a ativação do NFκB.

Observamos na associação dos aminoácidos glutamina e taurina, uma tendência da prevalência dos efeitos da glutamina. Há na literatura alguns trabalhos que correlacionam ambos aminoácidos. BOELENS *et al.,* 2002, realizaram um estudo com pacientes com múltiplos traumas e com ratos em situação de estresse. Foi demonstrado por estes autores que os níveis plasmáticos de taurina aumentaram após dieta enteral enriquecida com glutamina, sugeriu-se que a glutamina atuaria como substrato e facilitador da disponibilidade plasmática de taurina. Consequentemente melhorando os distúrbios osmóticos observados pós trauma, bem como melhorando o quadro dos pacientes.

Considerada uma propriedade singular do sistema imunológico, a migração celular, é o movimento constante e altamente regulado de componentes celulares através do sangue aos tecidos, sendo um processo essencial para desenvolvimento, homeostasia e cicatrização de tecido. A migração é mediada por uma combinação de processos químicos, mecânicos e moleculares (ALVES-FILHO *et al.,* 2008), sendo que a participação de agentes quimiotrativos são importantes para esse processo recrutando subpopulações específicas de leucócitos para o tecido inflamado (MULLER, 2003).

Para o presente estudo foi utilizado FMLP com agente quimioatrativo das células Raw 264.7, uma vez que não obtivemos migração celular nos ensaios em que utilizamos LPS.

Alguns estudos na literatura descrevem a capacidade da glutamina modular a funcionalidade de alguns tipos celulares. ROGERO *et al.,* 2008 demonstrou que uma dieta suplementada com glutamina conseguiu reverter a funcionalidade (aumento da

capacidade de adesão, síntese de NO, H_2O_2, TNFα, IL1β e IL6) de macrófagos de animais prematuramente desmamados, quando comparados a macrófagos de animais prematuramente desmamados que receberam dieta ausente de glutamina. Entretanto, neste trabalho não encontramos efeito da glutamina sobre a migração das células Raw 264.7.

Observamos aumento dose-dependente da migração celular com o aumento da concentração de taurina. A literatura tem demonstrado que a taurina inibe a migração celular. Estudo realizado com células de câncer de mama demonstrou que a taurina reduziu a migração dessas células, bem como reduziu a expressão de genes relacionados a migração. Os mecanismos da ação da taurina sobre a migração ainda não estão totalmente elucidados, sugerindo que mais estudos devem ser direcionados a esta questão (CHOI *et al.*, 2015).

10. CONCLUSÃO

Nossos resultados de viabilidade celular indicam ação protetora da suplementação com glutamina, entretanto não conseguimos demonstrar o mesmo para suplementação com taurina.

As células Raw 264.7 deste trabalho quando tratadas com maiores concentrações de glutamina na presença de LPS, apresentaram maior capacidade proliferativa. Demonstramos também que a exposição das células à taurina levou a uma menor proliferação celular.

Nosso trabalho demonstra que macrófagos da linhagem Raw 264.7 quando suplementados com glutamina ou glutamina e taurina estimulados com LPS, apresentam menor produção das citocinas IL1α, IL1β e TNFα. E apesar de não encontrarmos diferença estatisticamente significativa, observamos tendência na diminuição da expressão da relação p-NFκB/NFκB.

Em relação a migração celular não observamos diferença nas células tratadas com glutamina. Já a suplementação com taurina mostrou aumento da migração em dose-dependente.

Concluímos que tanto a glutamina quanto a taurina possuem capacidade de modular aspectos da resposta imunológica de células Raw 264.7.

REFERÊNCIAS:

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia básica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 320p.

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In: LEWIS, C.E.; McGEE, J.O., eds. **The macrophage**: the natural immune system. Oxford, Oxford University Press; New York: IRL Press, 1992. p.75-105.

AKAMINE, N.; FERNANDES JR., C.J.; WEY, S.B.; KNOBEL, E. Choque séptico. In: KNOBEL, E. **Condutas no paciente grave**. São Paulo: Atheneu, 1994. cap.15, p.175-210.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.124, p.783-801, 2006.

ALCAMO, E.; HACOHEN, N.; SCHULTE, L.C.; RENNERT, P.D.; HYNES, R.O.; BALTIMORE, D. Requirement for the NF-κB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. **Journal of Experimental Medicine**, v.195, p.233–244, 2002.

ALVES-FILHO, J.C.; FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; CUNHA, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v.30, suppl.1, p.3-9, 2008.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochemical Journal**, v.212, n.3, p.835-842, 1983.

ARDAWI, M.S.; KHOJA, S.M. Effects of hyperthyroidism on glucose, glutamine and ketone-body metabolism in the gut of the rat. **International Journal of Biochemistry**, v.25, n.4, p.619-624, 1993.

BEUTLER, B. Science review: key inflammatory and stress pathways in critical illness - the central role of the Toll-like receptors. **Critical Care**, v.7, n.1, p.39-46, 2003.

BEUTLER, B.; JIANG, Z.; GEORGEL, P.; CROZAT, K.; CROKER, B.; RUTSCHMANN, S.; DU, X.; HOEBE, K. Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large. **Annual Review of Immunology**, v.24, p.353-89, 2006. [Review].

BLASIUS, A.L.; BEUTLER, B. Intracelular toll-like receptors. **Immunity**, v.32, n.3, p.305-315, 2010.

BILLACK, B. Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v.70, n.5, p.70-102, 2006.

BOELENS, P.G.; HOUDIJK, A.P.; THOUARS, H.N.; TEERLINK, T.; VAN ENGELAND, M.I.; HAARMAN, H.J.; VAN LEEUWEN, P.A. Plasma taurine concentrations increase after enteral glutamine supplementation in trauma patients and stressed rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.1, p.250-256, 2003.

CAAMAÑO, J.; HUNTER, C.A. NF-κB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.3, p.414-428, 2002.

CALDER, P.C. Immunonutrition: may have beneficial effects in surgical patients. **British Medical Journal**, v.327, n.7407, p.117-118, 2003.

CALDER, P.C. Branched-chain amino acids and immunity. **Journal of Nutrition**, v.136, n.1, suppl., p.288S-293S, 2006.

CAVALO, M.G.; POZZILLI, P.; THORPE, R. Cytokines and autoimmunity. **Clinical & Experimental Immunology**, v.86, n.1, p.1-7, 1994.

CHOI, E.J.; TANG, Y.; LEE, C.B.; CHEONG, S.H.; SUNG, S.H.; OH, M.R.; JANG, S.Y.; PARK, P.J.; KIM, E.K. Effect of Taurine on *in vitro* migration of MCF-7 and MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.803, p.191-201, 2015.

COËFFIER, M.; MIRALLES-BARRACHINA, O.; LE PESSOT, F.; LALAUDE, O.; DAVEAU, M.; LAVOINNE, A.; LEREBOURS, E.; DÉCHELOTTE, P. Influence of glutamine on cytokine production by human gut *in vitro*. **Cytokine**, v.13, n.3, p.148-154, 2001.

COICO, R.; SUNSHINE, G. **Immunology**: a short couse. 6.ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2009. 391p.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; PITHON-CURI, T.C.; PIRES-DE-MELO, M.; GARCIA, C.; HOMEM-DE-BITTENCOURT JR., P.I.; GUIMARÃES, A.R. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.1, p.15-21, 1999.

CRUZAT, V.F.; TIRAPEGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition**, v.25, n.4, p.428-435, 2009.

LIMA, F.S.; ROGERO, M.M.; RAMOS, M.C.; BORELLI, P.; FOCK, R.A. Modulation of the nuclear fator-kappa B (NF-kappaB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine modelo of protein malnutrition. **European Journal of Nutrition**, v.52, n.4, p.1343-1351, 2013.

EAGLE, H.; OYAMA, V.I.; LEVY, M.; HORTON, C.L.; FLEISCHMAN, R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v.218, n.2, p.607-617, 1955.

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v.130, n.3373, p.432-437, 1959.

ENGSTRÖM, W.; ZETTERBERG, A. The relationship between purines, pyrimidines, nucleosides, and glutamine for fibroblast cell proliferation. **Journal of Cellular Physiology**, v.120, n.2, p.233-241, 1984.

EPPLER, B.; DAWSON Jr., R. The effects of aging on taurine content and biosynthesis in different strains of rats. In: SCHAFFER, S.; LOMBARDINI, J.B.; HUXTABLE, R.J., eds. **Taurine 3**: cellular and regulatory mechanisms. New York; London: Plenum Press, 1998. p.55-61. (Advances in experimental medicine and biology, v.442) [Proceedings of the International Taurine Symposium '97: Cellular and Regulatory Mechanisms, held July 15-19, 1997, in Tucson, Arizona].

FERREIRA, I.K.C. Terapia nutricional em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.19, n.1, p.90-97, 2007.

FOCK, R.A.; VINOLO, M.A.; MOURA, AS.; ROCHA, V.S.; ROCHA, L.C.S.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis if TNF-α in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Cytokine**, v.40, n.2, p.105-114, 2007.

FRANCO, D.G. Fator de transcrição nuclear kappa B no Sistema Nervoso Central: do fisiológico ao patológico. **Revista da Biologia**, v.4, p.35-39, 2010.

FRISINA, J.P.; GAUDIERI, S.; CABLE, T.; KEAST, D.; PALMER, T.N. Effects of acute exercise on lymphocyte subsets and metabolic activity. **International Journal of Sports Medicine**, v.15, n.1, p.36-41, 1994.

FROSINI, M.; SESTI, C.; DRAGONI, S.; VALOTI, M.; PALMI, M.; DIXON, H.B.; MACHETTI, F.; SGARAGLI, G. Interactions of taurine and structurally related analogues with the GABAergic system and taurine binding sites of rabbit brain. **British Journal of Pharmacology**, v.138, n.6, p.1163–1171, 2003.

FUKUDA, K.; HIRAI, Y.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; USUI, T. Free amino acid content of lymphocytes and granulocytes compared. **Clinical Chemistry**, v.28, n.8, v.1758-1761, 1982.

GRISHAM, M.B.; JEFFERSON, M.M.; MELTON, D.F.; THOMAS, E.L. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils: ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, n.16, p.10404-10413, 1984.

HEYLAND, D.; MUSCEDERE, J.; WISHMEYER, P.E.; COOK, D.; JONES, G.; ALBERT, M.; ELKE, G.; BERGER, M.M.; DAY, A.G.; CANADIAN CRITICAL CARE TRIALS GROUP. A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients. **New England Journal of Medicine**, v.368, p.1489-1497, 2013.

HOFFMANN, E.K.; LAMBERT, I.H. Amino acid transport and cell volume regulation in Ehrlich ascites tumour cells. **Journal of Physiology**, v.338, p.613–625, 1983.

HUBERT-BURON, A.; LEBOND, J.; JACQUOT, A.; DUCROTTE, P.; DECHELOTTE, P.; COEFFIER, M. Glutamine pretreatment reduces IL-8 production in human intestinal epithelial cells by limiting LkappaB-alpha ubiquitination. **Journal of Nutrition**, v.136, n.6, p.1461-1465, 2006.

HUXTABLE, R.; BRESSLER, R. Taurine and isethionic acid: distribution and interconversion in the rat. **Journal of Nutrition**, v.102, n.7, p.805-814, 1972.

HUXTABLE, R.J. Metabolism and function of taurine in the heart. In: HUXTABLE, R.J.; BARBEAU, A., eds. **Taurine**. New York: Raven Press, 1976. p.99-119. [Proceedings of the 1st. International Symposium on Taurine, held in Tucson, Arizona, March 1975].

HUXTABLE, R.J. Taurine and the oxidative metabolism of cysteine. In: HUXTABLE, R.J. ed. **Biochemistry of sulfur**. New York: Plenum, 1986. p.121-198.

HUXTABLE, R.J. Physiological actions of taurine. **Physiological Reviews**, v.72, n.1, p.101-163, 1992.

KALTSCHMIDT, B.; WIDERA, D.; KALTSCHMIDT, C. Signaling via NF-κB in the nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1745, n.3, p.287–299, 2005.

KARABAY, A Z.; KOÇ, A.; OZKAN, T.; BUYUBINGOL, Z.; SUNGUROGLU, A.; AKTAN, F. Effect of taurine on hydrogen peroxide production in lipopolisaccharide induced RAW 264.7 macrophage cells. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.33, n.4, p.187-192, 2008.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: uptade on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v.11, n.5, p.373-384, 2010.

KIM, C.; PARK, E.; QUINN, M.R.; SCHULLER-LEVIS, G. The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF-alpha in the conditioned media is inhibited by taurine chloramine. **Immunopharmacology**, v.34, n.2/3, p.89-95, 1996.

KIM, J.W.; KIM, C. Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated though Ras-ERK-NF-kappaB. **Biochemical Pharmacology**, v.70, n.9, p.1352-1360, 2005.

KING, M.G. **Introducción al metabolismo del nitrógeno**. Disponível em: http://themedicalbiochemistrypage.org/es/nitrogen-metabolism-sp.php. Acesso em: 13 jun. 2014.

LASSER, A. The mononuclear phagocyte system: a review. **Human Pathology**, v.14, n.2, p.108-126, 1983.

LI, Q.; VERMA, I.M. NFKappaB regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.10, p.725-734, 2002. [Review]. Erratum in: **Nature Reviews Immunology**, v.2, p.975, 2002.

LI, P.; YIN, Y.L.; LI, D.; KIM, S.W.; WU, G. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, v.98, n.2, p.237-252, 2007.

LIN, C.J.; CHIU, C.C.; CHEN, Y.C.; CHEN, M.L.; HSU, T.C.; TZANG, B.S. Taurine attenuates hepatic inflammation in chronic alcohol-fed rats through inhibition of TLR4/MyD88 signaling. **Journal of Medicinal Food**, p.1-8, 2015. Disponível em: http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/jmf.2014.3408. Acesso em: 12 out.2015.

LIU, Y.; DONG, W.; CHEN, L.; XIANG, R.; XIAO, H.; DE, G.; WANG, Z.; QI, Y. BCL 10 mediates lipopolusaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.36, p.37436-37444, 2004.

MARIK, P.E.; ZALOGA, G.P. Immunonutrition in high-risk surgical patients: a systematic review and analysis of the literature. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.34, n.4, p.378-386, 2010.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; BERETA, J.; STELMASZYNSKA, T. Taurine chloramine a product of activated neutrophils, inhibits *in vitro* the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. **Journal of Leukocyte Biology**, v.58, n.6, p.667-674, 1995.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I.; ASENJO, M.; MÁRQUEZ, J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, n.5, p.439-458, 2002.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Immunology: toll-like receptors and antibody responses. **Nature**, v.441, n.7091, p.E4, 2006.

MERCURIO, F.; MURRAY, B.W.; SHEVCHENKO, A.; BENNETT, B.L.; YOUNG, D.B.; LI, J.W.; PASCUAL, G.; MOTIWALA, A.; ZHU, H.; MANN, M.; MANNING, A.M. IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, n.2, p.1526–1538, 1999.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. **International Immunopharmacology**, v.3, n.1, p.119-128, 2003. [Review].

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v.24, n.6, p.327-334, 2003.

NATHAN, C.F. Secretory products of machrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v.79, n.2, p.319-326, 1987.

NEARY, P.M.; HALLIHAN, P.; WANG, J.H.; PFIRRMANN, R.W.; BOUCHIER HAYES, D.J.; REDMOND, H.P. The evolving role of taurolidine in cancer therapy. **Annals of Surgical Oncology**, v.17, n.4, p.1135 1143, 2010.

NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. **Nutrition**, v.13, n.7/8, p.728-730, 1997. [Review].

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; PITHON CURI, T.C.P.; MURPHY, C.J.; GARCIA, C.; MELO, M.P. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in healthy and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.10, n.6, p.316-324, 1999.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**, v.131, n.9, suppl., p.2515S-2522S, 2001.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M.M.R.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; DOI, S.Q.; BAZOTTE, R.B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.2, p.153-163, 2003.

NISHIYAMA, A.; CURI, R. Metabolismo da glutamina no macrófago. In: CURI, R. **Glutamina**: metabolismo e aplicações clínicas no esporte. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. p.190-198.

OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PELLICER, J.A.; ESTRELA, J.M. Possible mechanisms for tumour cell sensitivity to TNF-alpha and potential therapeutic

applications. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.2, n.2, p.119-130, 2001. [Review].

PASANTES-MORALES, H.; MORÁN, J.; FELLMAN, J.H. Hypotaurine uptake by the retina. **Journal of Neuroscience Research**, v.15, n.1, p.101–109, 1986.

PARK, E.; QUINN, M.R.; WRIGHT, C.E.; SCHULLER-LEVIS, G. Taurine chloramine inhibits the synthesis of nitric oxide and the release of tumor necrosis factor in activated RAW 264.7 cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v.54, n.2, p.119-124, 1993.

PARK, E.; SCHULLER-LEVIS, G.; QUINN, M.R. Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells by mechanisms that involve transcriptional and translational events. **Journal of Immunology**, v.154, n.9, p.4778-4784, 1995.

ROGERO, M.M. **Efeito do desmame precoce e da suplementação com glutamina, *in vitro* e *in vivo*, sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos**. São Paulo, 2007. 191p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

HOFFMANN, E.K.; LAMBERT, I.H. Amino acid transport and cell volume regulation in Ehrlich ascites tumour cells. **Journal of Physiology**, v.338, p.613–625, 1983.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.; VINOLO, M.A.R.; BORGES, M.C.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O.; BORELLI, P. Dietary glutamine supplementation increases the activity of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. **Journal of Nutrition**, v.138, n.7, p.1343-1348, 2008.

ROGERO, M.M.; BORELLI, P.; VINOLO, M.A.R.; FOCK, R.A.; PIRES, I.S.O.; TIRAPEGUI, J. Dietary glutamine supplementation affects macrophage function, hematopoiesis and nutritional status in early weaned mice. **Clinical Nutrition**, v.27, n.3, p.386-397, 2008.

ROGERO, M.M.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; BORGES, M.C.; VINOLO, M.A.; CURI, R.; NAKAJIMA, K.; CRISMA, A.R.; RAMOS, A.D.; TIRAPEGUI, J. Effects of glutamine on the nuclear factor-kappaB signaling pathway of murine peritoneal macrophages. **Amino Acids**, v.39, n.2, p.435-441, 2010.

ROWBOTTON, D.G.; KEAST, D.; GOODMAN, C.; MORTON, A.R. The haematological, biochemical and immunological profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v.70, n.6, p.502-509, 1995.

SCHULLER-LEVIS, G.B.; PARK, E. Taurine: new implications for an old amino acid. **FEMS Microbiology Letters**, v.226, n.2, p.195-202, 2003.

SILVERSTEIN, E.; FRIEDLAND, J.; SETTON, C. Angiotensin converting enzyme: induction in rabbit alveolar macrophages and human monocytes in culture. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.121A, p.149-156, 1979.

SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Glutamine nutrition and requirementes. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, n.4, suppl., p.94S-99S, 1990.

STURMAN, J.A.; MORETZ, R.C.; FRENCH, J.H.; WISNIEWSKI, H.M. Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the cerebellar external granule cell layer. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.179, p.43-52, 1985.

SPITTLER, A.; WINKLER, S.; GÖTZINGER, P.; OEHLER, R.; WILLHEIM, M.; TEMPFER, C.; WEIGEL, G.; FÜGGER, R.; BOLTZ-NITULESCU, G.; ROTH, E. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. **Blood**, v.86, n.4, p.1564-1569, 1995.

SUN JANG, J.; PIAO, S.; CHA, Y.N.; KIM, C. Taurine chloramine activates NrF2, increases HO-1 expression and protects cells from death caused by hydrogen peroxide. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v.45, n.1, p.37-43, 2009.

TEIXEIRA, A.C.C.; CARUSO, L.; SORIANO, F.G. Terapia nutricional enteral em unidade de terapia intensiva: infusão versus necessidades. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, n.4, p.331-337, 2006.

VANDERWALLE, A. Toll-like receptors and renal bacterial infections. **Chang Gung Medical Journal**, v.31, n.6, p.525-537, 2008.

VAN DE POLL, M.C.G.; SOETERS, P.B.; DEUTZ, NICOLAAS, E.P.; FEARON KENNETH, C.H.; DEJONG CORNELIS, H.C. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.2, p.185-197, 2004.

VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M., eds. **Bioquímica celular**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1979. 399p.

WALLACE, C.; KEAST, D. Glutamine and macrophages function. **Metabolism**, v.41, n.9, p.1016-1020, 1992.

WEISS, S.J.; LAMPERT, M.B.; TEST, S.T. Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity. **Science**, v.222, n.4624, p.625-628, 1983.

WERE, Z.; GORDON, S. Elastase secretion by stimulated macrophages: characterization and regulation. **Journal of Experimental Medicine**, v.142, n.2, p.361-377, 1975.

WU, J.Y.; TANG, X.W.; TSAI, W.H. Taurine receptor: kinetic analysis and pharmacological studies. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.315, p.263–268, 1992.

XIAO, W. Advances in NF-κB signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology**, v.1, n.6, p.425–435, 2004.

WESSELING, S.; KOENERS, M.P.; JOLES, J.A. Taurine: red bull or red herring? **Hypertension**, v.53, n.6, p.909-911, 2009.

WISCHMEYER, P.E.; MUSCH, M.W.; MADONNA, M.B.; THISTED, R.; CHANG, E.B. Glutamine protects intestinal cells: role of inducible HSP 70. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.272, n.4, pt.1, p.G879-G884, 1997.

WISCHMEYER, P.E.; RIEHM, J.; SINGLETON, K.D.; REN, H.; MUSCH, M.W.; KAHANA, M.; CHANG, E.B. Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. **Nutrition**, v.19, n.1, p.1-6, 2003.

YASSAD, A.; LAVOINNE, A.; BION, A.; DAVEAU, M.; HUSSON, A. Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture. **FEBS Letters**, v.413, n.1, p.81-84, 1997.

ZHANG, X.; SHENG, J.; ZHANG, C.; ZHAO, F. [Taurine induces apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v.37, n.5, p.654-657, 2012.

ZHANG, X.; TU, S.; WANG, Y.; XU, B.; WAN, F. Mechanism of taurine induced apoptosis in human colon cancer cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.46, n.4, p.261-272, 2014.

ANEXOS

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

ANEXO II- HISTÓRICO ESCOLAR

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 8720690/1 - Talita Sartori

Email:	sartori_40@usp.br
Data de Nascimento:	14/10/1986
Cédula de Identidade:	RG - 248839275 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - São Paulo - Brasil - 2009

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	04/07/2013
Início da Contagem de Prazo:	04/07/2013
Data Limite para o Depósito:	04/01/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 04/07/2013 até o presente. E.Mail: hemato@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 04/07/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 12/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 04/07/2013 Matrícula Regular em 17/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)
Última ocorrência: Matrícula Regular em 17/07/2014
Impresso em: 29/10/14 20:05:55

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 8720690/1 - Talita Sartori

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5719-3/1	Trato Gastrointestinal: Imunomodulação da Colonização e Infecção Bacteriana	02/08/2013	14/11/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-4/2	Tópicos em Análises Clínicas II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	100	A	N	Concluída
BMB5818-1/4	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/08/2013	04/09/2013	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
EDM5102-3/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	20/08/2013	30/09/2013	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
IMT5110-2/1	Princípios Básicos de Biologia Molecular Aplicada (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo)	16/10/2013	19/11/2013	90	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
BMI5856-5/1	Sistema Complemento: Ativação, Funções Biológicas, Mecanismos Efetores e Regulatórios (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	29/10/2013	29/11/2013	75	5	100	B	N	Concluída
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5793-12/1	Tópicos em Análises Clínicas I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	80	A	N	Concluída
BMB5760-5/1	Metabolismo Celular e sua Regulação (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	17/03/2014	27/04/2014	60	4	93	A	N	Concluída
QBQ5751-9/1	Bioquímica Avançada (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	25/04/2014	17/07/2014	180	0	0	-	N	Matrícula cancelada
BMI5898-1/1	O Ensino de Imunologia para Cursos de Graduação (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	14/05/2014	26/06/2014	120	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5722-2/3	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/09/2014	22/09/2014	60	4	90	A	N	Concluída
FBC5772-2/1	Conexões das Vias de Ativação dos Processos Inflamatórios Periféricos e Centrais	22/09/2014	12/10/2014	60	4	100	A	N	Concluída
BMF5862-4/1	Ciclo Celular e Apoptose (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/11/2014	23/11/2014	90	0	0	-	N	Pré-matrícula deferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

ANEXO III- CURRÍCULO LATTES

Talita Sartori

- Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/7461700008745564
- Última atualização do currículo em 04/11/2015

Graduação em Biomedicina pelo CENTRO UNIVERSITARIO UNIFMU (2008). Atualmente mestranda do laboratório de hematologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo USP. Tem experiência na área de Biologia Geral, com ênfase em biologia molecular, atuando principalmente no seguinte tema: hepatite c; bem como experiência na área de análises clínicas, com ênfase em hematologia, atuando principalmente em mecanismos de transcrição, inflamação e imunologia. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome
Talita Sartori
Nome em citações bibliográficas
SARTORI, T.

Endereço

Endereço Profissional
Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Cidade Universitária
Butantã
05508900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913639

Formação acadêmica/titulação

2005 - 2008
Graduação em Biomedicina.
CENTRO UNIVERSITARIO UNIFMU, UNIFMU, Brasil.
Título: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VHC EM AMOSTRAS DE LEITE DE MÃES COM HEPATITE C.
Orientador: Dra. Norma de Paula Cavalheiro.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

Atuação Profissional

Hospital Sírio-Libanês, SIRIO-LIBANÊS, Brasil.
Vínculo institucional

2008 - 2008
Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiario, Carga horária: 30
Outras informações
Atividades: exames de imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética. Participação de seminários e aulas teóricas em radiologia

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Vínculo institucional

2013 - Atual
Vínculo: Mestranda, Enquadramento Funcional: Mestranda, Carga horária: 30

Outras informações
Realização do projeto de mestrado, intitulado como "Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFκB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS"

Vínculo institucional
2007 - 2008
Vínculo: iniciação cientifica, Enquadramento Funcional: iniciação cientifica, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional
2006 - 2008
Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiario, Carga horária: 20

Projetos de pesquisa

2013 - Atual
Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFκB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS

Descrição: Sabendo-se que os aminoácidos glutamina e taurina apresentam papel importante na modulação da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1 e IL-6, pretendemos nesse trabalho investigar a participação da glutamina, da taurina e suas associações sobre a via de sinalização do fator nuclear Kappa-B (NF-κB) (principal via da resposta inflamatória e imune) e a produção de citocinas pró e anti inflamatórias em macrófagos estimulados com LPS (Lipopolissacarideo)..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Talita Sartori - Coordenador / Ricardo Fock - Integrante.

2007 - 2008
AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VHC EM AMOSTRAS DE LEITE DE MÃES COM HEPATITE C

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Talita Sartori - Coordenador.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa.

Áreas de atuação

1.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral.

2.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina.

3.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

4.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética.

5.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia.

6.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.

Idiomas

Inglês
Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Produções

Produção bibliográfica

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.
SBAN. 2015. (Congresso).

2.
Progress on alternative in vitro methods for the safety assessment of chemicals and their impact on human health: international and Brazilian views. 2015. (Outra).

3.
Jornada Paulista de Radiologia. 2008. (Outra).

4.
Sétimo Congresso Nacional de Iniciação Científica e Quinto Congresso Internacional de Iniciação Científica. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VHC EM AMOSTRAS DE LEITE DE MÃES COM HEPATITE C. 2007. (Congresso).

5.
Terceiro Simpósio de Avanços em Pesquisas Médicas dos Laboratórios de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP. 2007. (Simpósio).

6.
Curso sobre Hepatites Virais. 2006. (Outra).

7.
Feiras da Saúde.trabalho voluntário. 2005. (Outra).

8.
Curso de coleta de materiais biológicos- Biosciences.aluna. 2005. (Outra).

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Dissertação de mestrado

1.
Talita Sartori. Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFκB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS. Início: 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. (Orientador).

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1.
Talita Sartori. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VHC EM AMOSTRAS DE LEITE DE MÃES COM HEPATITE C. 2008. Iniciação Científica - Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Orientador: Talita Sartori.