



**Universidade Federal de Minas Gerais**

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz**

*Requerimento de receptores scavenger na sinalização  
via TLR4 para a produção de óxido nítrico por  
macrófagos estimulados com LPS: papel na ativação  
de IRF-3 e STAT-1*

Maria de Fátima Martins Horta (Orientadora)

Luciana Souza de Oliveira (Co-orientadora)

Belo Horizonte

Junho, 2015

**Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz**

***Requerimento de receptores scavenger na sinalização  
via TLR4 para a produção de óxido nítrico por  
macrófagos estimulados com LPS: papel na ativação  
de IRF-3 e STAT-1***

*Tese de doutorado apresentada ao  
programa de pós-graduação em  
Bioquímica e Imunologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais.*

**Orientadora: Dra. Maria de Fátima Martins Horta**

**Co-orientadora: Dra. Luciana Souza de Oliveira**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte

Junho, 2015

*“Todo verbo que é forte*

*Se conjuga no tempo*

*Perto, longe o que for”*

(Winston Foster)

## DEDICATÓRIA

Na vida, é muito mais fácil conder-se com as fraquezas alheias, que nos fazem sentir momentaneamente superiores, do que alegrar-se com as conquistas que não nos pertencem. Portanto, dedico este trabalho a um amigo cuja alegria de viver estava em compartilhar com sinceridade e verdade as nossas vitórias e que nunca faltou quando precisamos do seu apoio nos momentos de desafios. **Juliano Leal**, eu sei que vai faltar o seu aplauso, seu sorriso sincero ajudando a preparar as comemorações e seu carinhoso abraço. Mas, você está aqui e espero que possamos continuar unidos, nos fortalecendo e comemorando cada passo desta vida eterna e infinita. Sempre juntos!

## AGRADECIMENTOS

A vitória após esses cinco anos de intensas experiências no doutorado só foi possível porque muitas forças se aliaram às minhas e me sustentaram nesta maravilhosa etapa da caminhada. Portanto, os meus agradecimentos são extensivos àqueles que contribuíram diretamente no desenvolvimento da pesquisa e também aos que foram além, nos aprendizados incontáveis da busca por viver em plenitude:

À Patiu, por embarcar nesta viagem comigo e estar sempre disposta a rever o plano de voo, compartilhando reflexões profundas sobre esta intrigante e maravilhosa experiência que é o viver. Agradeço por sempre trabalharmos de forma agradável, numa relação de profissionalismo, compreensão, carinho e amizade, proporcionando a mim outros aprendizados além da ciência.

À Luciana Souza de Oliveira, que compartilhou generosamente comigo todo seu conhecimento em pesquisa, promovendo esta parceria que foi minha base e meu suporte. Hoje, através do seu merecido crescimento profissional, ela pode permanecer ao meu lado agora na condição de co-orientadora e ainda assim, cada vez mais amiga.

Ao professor Sergio Costa Oliveira, à professora Leda Quércia Viera, à professora Ana Maria Caetano de Faria e seus estudantes Marco Túlio, Matheus e Thaís que muito colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Santuza Maria Ribeiro Teixeira por sempre me acolher generosamente para orientações, pela infraestrutura de trabalho e pelas valiosas contribuições durante as reuniões de laboratório.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG pela oportunidade de aprendizado no campo da docência e pela generosidade ao me tutelarem nestes primeiros passos em que pude adquirir novos aprendizados como professora substituta em Bioquímica e Biologia Molecular. Sem esta experiência a minha formação não teria sido completa.

Aos amigos de laboratório, que fizeram o meu dia a dia mais prazeroso, por dividirem comigo os desafios da pesquisa e da vida, entre eles: Nat, Lú, Jah, Bah, Thiago, Gabi, Vivi, Let, Lu Zuccherato, Fernanda, Rita, Nailma, Rondon, Bruna, Thaís e Juliana. Em memória,

agradeço ao nosso eterno amigo Juliano Leal. Agradeço à Anna e Diana, em nome de todos os alunos de Iniciação Científica que passaram pelo laboratório.

Agradeço também aos colegas de Bases 1 e 2, que compartilharam comigo o maravilhoso desafio da busca por aprendizado em Ciências.

Na pessoa do Elimar Faria, que muito contribuiu ao meu trabalho no laboratório, agradeço aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pela infraestrutura e pela oportunidade de trabalhar e crescer.

Ao incentivo e ao financiamento da bolsa e do projeto pelo CNPQ e FAPEMIG, por intermédio dos quais foi possível desenvolver e concluir esta pesquisa com qualidade.

Especialmente, agradeço aos meus pais, que nunca colocaram na distância peso maior do que pudéssemos suportar e que me permitiram voos leves e suaves, sem perder contato com a linha que me sustenta e direciona.

Aos meus avós, que são meu céu e meu firmamento.

Às minhas irmãs que, por fazerem tanta falta, me estimularam a buscar e valorizar os irmãos da família espiritual.

Aos amigos dos dois planos da vida, que em todos os momentos em que o peso do medo, das tensões, das frustrações, do cansaço e da insegurança me jogaram ao chão, souberam me mostrar que dividindo o peso era possível voar.

A todos que, seja no primeiro tempo, no segundo ou na prorrogação me ajudaram a jogar o jogo e resistir com alegria e gratidão até o final.

A Minas Gerais, que me atraiu e me acolheu com suas boas energias, por estes morros que me fizeram enfrentar a longa viagem do amadurecimento e do eterno encantamento em florescer.

Agradeço, sobretudo a Deus, pela oportunidade da vida e por me ensinar a respirar, nos momentos de aperto e também quando consegui me soltar.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Os receptores TLR, respectivos ligantes e suas principais vias de sinalização.

**Figura 2:** Sinalização de LPS via TLR4 dependente e independente de MYD88.

**Figura 3:** Processo de endocitose do TLR4 dependente de CD14.

**Figura 4:** Arquitetura dos domínios que constituem as diferentes classes de receptores scavenger.

**Figura 5:** A importância do IFN- $\beta$  e da endocitose na produção de NO via TLR4 estimulado por LPS.

**Figura 6:** Associação dos receptores Scavenger ao TLR4 para produção de NO estimulado por LPS.

**Figura 7:** Scavenger Receptor e TLR4 agem em conjunto para ativar a expressão de iNOS e consequente a produção de NO.

**Figura 8:** Scavenger Receptor inibe a produção de IFN- $\beta$  por diminuir a ativação de IRF-3.

**Figura 9:** Scavenger Receptor diminui a expressão de IRF-1 e a ativação de STAT1.

**Figura 10:** Mecanismo proposto de associação entre TLR4 e SR na ativação de iNOS para produção de NO.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**µg:** micrograma

**µL:** microlitro

**µM:** micromolar

**CD:** do inglês *Cluster of Differentiation*

**cDNA:** ácido desoxirribonucleico complementar

**cm:** centímetro

**CpG:** citosina guanina metilada

**DNA:** ácido desoxirribonucléico

**DSS:** dextran sulfato de sódio

**g:** força centrífuga ou gravitacional

**h:** hora

**IFN (-α, -β, -ε, -κ, λ, ω, γ):** interferon (alfa, beta, epsilon, kappa, lambda, omega e gama)

**IgG:** Imunoglobulina G

**IKK:** IκB cinase

**IL:** interleucina

**iNOS:** óxido nítrico sintase induzível

**IRAK:** cinase associada a receptor IL-1

**IRF:** fator regulador de interferon

**kDa:** quilodaltons

**KO:** do inglês *knockout*

**LPS:** lipopolissacarídeo

**mA:** miliampere

**min:** minutos

**mg:** miligrama

**mL:** mililitro

**mM:** milimolar

**mRNA:** ácido ribonucleico mensageiro

**mRNA:** ácido ribonucleico mensageiro

**MyD88:** fator de diferenciação miéloide 88

**NF-κB:** fator nuclear kappa B



**ng:** nanogramas

**nm:** nanometro

**NO:** óxido nítrico

**NO<sub>2</sub>:** nitrito

**NOS:** óxido nítrico síntese

**PCR:** reação em cadeia pela polimerase

**pM:** picomolar

**PRR:** receptor de reconhecimento de padrão

**Rheb:** do inglês *Ras homolog enriched in brain*

**rIFN:** interferon recombinante

**RNA:** ácido ribonucléico

**rpm:** rotações por minuto

**SDS:** dodecilsulfato de sódio

**SFB:** soro fetal bovino

**SOCS:** do inglês *Suppressor of cytokine signaling*

**SR:** receptores scavenger

**STAT:** transdutor de sinal e ativador da transcrição

**TBS:** tampão Tris-HCl salina

**TGF- $\beta$ :** fator de transformação do crescimento beta

**Th:** *T helper*

**TIR:** região homóloga de receptores Toll/IL-1-receptor

**TLR:** receptores semelhantes ao Toll

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa

**TRIF:** adaptador indutor de interferon- $\beta$  que contém o domínio TIR

**WT:** selvagem

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	7
<b>1. Introdução</b> .....	8
1.1. A importância do óxido nítrico na resposta imune .....	9
1.2. Regulação da expressão e atividade da iNOS .....	13
1.3. A sinalização celular induzida por LPS via TLR4 .....	17
1.4. O IFN- $\beta$ e a produção de NO .....	22
1.5. Os Receptores Scavenger (SR) na resposta imune.....	24
<b>2. Objetivos</b> .....	29
2.1.    Objetivo Geral .....	30
2.2.    Objetivos Específicos .....	30
<b>3. Material e Métodos</b> .....	31
3.1. Animais .....	32
3.2. Reagentes e Equipamentos.....	32
3.3. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos.....	33
3.4. Inibição da endocitose de TLR4.....	33
3.5. Neutralização dos Receptores Scavenger.....	34

3.6. Quantificação da produção de NO por macrófagos .....	34
3.7. Extrato proteico total e <i>Western blot</i> .....	34
3.8. Extração de RNA e <i>Real Time PCR</i> .....	366
3.9. Análise estatística.....	377
<b>4. Resultados</b> .....	<b>388</b>
4.1. A produção de NO induzida por LPS ocorre na ausência de TLR-4, desde que rIFN- $\beta$ seja fornecido aos macrófagos .....	399
4.2. Inibição dos Receptores Scavenger (SR) impede a produção de NO induzido por LPS.....	41
4.3. A produção de NO e a expressão de iNOS inibidas por anti-SR-AI, mas não por DSS, são totalmente restauradas pela adição de IFN- $\beta$ exógeno .....	43
4.4. Inibição de SR-AI diminui a ativação de IRF-3 e a produção de IFN- $\beta$ .....	45
4.5. Inibição de SR diminui a ativação de STAT-1 e a expressão de IRF-1.....	47
<b>5. Discussão</b> .....	<b>49</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>59</b>

## Resumo

O óxido nítrico (NO) é uma molécula versátil com efeitos tanto tóxicos quanto regulatórios. Em macrófagos, o papel antimicrobiano do NO é, até a data, o mecanismo letal ou inibitório mais evidente, descrito para um grande número de microrganismos, devido aos seus efeitos diretos e indiretos. O papel do TLR4 na transcrição de iNOS induzida por LPS está relacionado à inicialização de um complexo de sinalização celular que induz a produção da citocina IFN- $\beta$ , a síntese de IRF-1 e a ativação de NF- $\kappa$ B e STAT-1, fatores de transcrição necessários para a síntese de iNOS. A absorção de uma concentração elevada de LPS (1 ug/ml) é mediada pelo receptor Scavenger (SR-A), com a participação de CD14, atuando em conjunto com o receptor TLR4 nas respostas inflamatórias ao LPS. A literatura sobre a sinalização de SR-A em macrófagos é restrita e muitas vezes contraditória. Os mecanismos pelos quais o LPS promove a interação do SR-A com TLR4 e suas vias de sinalização precisam ser melhor compreendidos. O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do estímulo de LPS na via de TLR4 associada ao SR-A para a produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6. Nossos experimentos confirmam que os camundongos TLR4 *knockout* não produzem NO quando estimulados apenas com LPS, mas a adição conjunta de LPS e IFN- $\beta$  restaura a capacidade destes macrófagos de expressar iNOS e produzir NO. Estes resultados sugerem que o LPS pode estimular os macrófagos por outro receptor diferente do TLR4. A inibição de SR-A usando DSS ou anticorpo neutralizante anti-SR-A mostrou que a associação entre SR-A e TLR4 é essencial para a expressão de iNOS e a produção de NO. Os nossos resultados comprovam que TLR4 e SR-A atuam em conjunto principalmente na ativação da via TLR4-TRIF para a produção de IFN- $\beta$  e, conseqüentemente, promovendo a síntese de STAT-1 e de IRF-1, que agem em conjunto para ativar a produção de NO em macrófagos.

## Abstract

Nitric oxide (NO) is a versatile molecule with both toxic and regulatory effects. In macrophages, the antimicrobial role of NO is, to date, the most evident, and several lethal or inhibitory mechanisms for a number of microorganisms, due to both direct and indirect effects, have been described. The role of TLR4 in the LPS-induced transcription of iNOS is due to the initiation of a complex cellular signaling that leads to production of the cytokine IFN- $\beta$ , synthesis of IRF-1 and activation of NF- $\kappa$ B and STAT-1, transcription factors required for iNOS synthesis. The uptake of a high concentration of LPS (1  $\mu$ g/ml) is mediated by Scavenger Receptor A (SR-A) with participation of CD14 and this receptor acts in concert with TLR4 to mediated LPS inflammatory responses. The literature on signaling SR-A in macrophages is small and often contradictory. Mechanisms by which LPS promotes SR-A interaction with TLR4 and her pathways need to be better understood. Then, our main goal in this study is evaluate the effect of LPS stimulus on TLR4 signaling pathway associated with SR-A to NO production by peritoneal macrophages from C57BL/6 mice. Our experiments confirm that TLR4 knockout mice don't make NO when stimulated with LPS only, but the addition of IFN- $\beta$  to the LPS stimulus restores the ability of these macrophages to express iNOS and produce NO. These results suggest that LPS could stimulate macrophages by another receptor different from TLR4. The inhibition of SR-A using DSS and neutralizing antibody shows that SR-A associated with TLR4 is essential for the expression of iNOS and NO production. Our results reinforce that TLR4 and SR-A acts in concert activating mainly TLR4-TRIF pathway for the production of IFN- $\beta$  and consequently stimulating the synthesis of STAT-1 and IRF-1, they all together activate the NO production by macrophages.

***Requerimento de receptores scavenger na sinalização via TLR4 para a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS: papel na ativação de IRF-3 e STAT-1***

***1. Introdução***

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A importância do óxido nítrico na resposta imune

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa produzida por quase todas as células de mamíferos, especialmente aquelas do sistema imune (células dendríticas, células *natural killers* - NK, mastócitos e fagócitos incluindo monócitos, macrófagos, microglia, células de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos) e outras células envolvidas nas reações imunes (células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, hepatócitos, mesangiais e células de Schwann) (Bogdan, 2001). Esta molécula possui potenciais efeitos biológicos, envolvendo vasodilatação, agregação plaquetária, comunicação interneuronal, motilidade gastrointestinal, resposta imune contra microrganismos e regulação gênica (Bogdan, 2001; Gutierrez *et al.*, 2009).

A bioquímica do NO gira em torno do seu elétron não pareado, que o torna um radical livre. Em sistemas biológicos o NO tem uma meia vida curta (ordem de segundos) e sozinho não interage facilmente com proteínas ou ácidos nucleicos. Porém, NO reativo pode ser gerado pela perda de um elétron a partir do radical NO (Stamler, 1994; Wink & Mitchell, 1998). Em mamíferos, NO ( $\cdot\text{NO}$ ,  $\text{NO}^+$  ou  $\text{NO}^-$ ) são produzidos pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que catalisa a conversão de oxigênio molecular e L-arginina, na presença de NADPH (nicotinamida adenina *dinucleotídeo* fosfato), no intermediário L-hidroxi-arginina e posteriormente em citrulina, NO e duas moléculas de água. Na presença de oxigênio, o NO é rapidamente convertido em outros intermediários reativos de nitrogênio, incluindo  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NO}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , S-NO e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Santolini, 2011). Em condições normais de oxigênio, o NO pode ser rapidamente oxidado formando produtos estáveis como nitrito e nitrato, sendo que o nitrito pode facilmente se tornar fonte de NO de maneira não enzimática sob condições ácidas (ex: estômago e tecidos inflamados) ou por ação das nitrito redutases (Li *et al.*, 2008; Lundberg *et al.*, 2008). O termo óxido nítrico – NO (sem um ponto para o elétron não pareado) será usado neste trabalho de maneira coletiva, para representar todos os intermediários reativos de nitrogênio, que são produtos imediatos da reação de NOS.

Em mamíferos, o NO é sintetizado a partir de L-arginina por uma família de enzimas chamadas de NO sintases (EC 1.14.13.39), que existem em três principais isoformas e algumas variantes produzidas por *splicing* alternativos. As isoformas de NOS são provenientes de diferentes genes e também diferem quanto à localização, regulação,

propriedades catalíticas e sensibilidade a inibidores. Duas NOS são expressas constitutivamente, uma principalmente em células nervosas, músculo esquelético e músculo cardíaco (NOS1 ou nNOS – óxido nítrico sintase neuronal) e outra em células endoteliais (NOS3 ou eNOS - óxido nítrico sintase endotelial). A expressão da terceira isoforma (iNOS ou NOS2) é induzida por citocinas pró-inflamatórias ou endotoxinas em várias células e tecidos como uma resposta do sistema imune (Alderton *et al.*, 2001; Bredt, 1999; Daff, 2010; Santolini, 2011). Alguns estudos propõem a existência de uma NOS mitocondrial em células de mamíferos, tendo sido demonstrada uma via de síntese de NO mitocondrial em cérebro de camundongos e em células endoteliais humanas. Além disso, a síntese de NO já foi observada em plantas, algas e leveduras (Poyton *et al.*, 2009). O NO também pode ser gerado a partir de nitrito por certos sistemas redutores como a cadeia respiratória e xantina oxidase em condições de hipóxia ou anóxicas (Gao, 2010).

Em condições homeostáticas, NO é produzido em baixas concentrações e age como mensageiro intracelular e fator antioxidante, regulando os processos fisiológicos. Porém, em condições patológicas, NO é produzido em altas concentrações e as espécies reativas de nitrogênio (RNS – *reactive nitrogen species* ou espécies reativas de nitrogênio) derivadas do NO, como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), têm seus níveis elevados provocando danos à cadeia respiratória, inibição da síntese de ATP (adenosina trifosfato), liberação de citocromo c e indução ou inibição de apoptose dependente de caspases (Gao, 2010; Peter *et al.*, 2002). Em contraste com as citocinas, a interação de NO não é restrita a um único receptor, podendo exercer sua ampla atividade biológica ativando uma sequência de sinalização via guanilato ciclases solúveis ou através de reações com outras moléculas inorgânicas (como oxigênio, superóxidos e metais de transição), estruturas de DNA (bases de pirimidinas), grupos prostéticos (como heme) ou proteínas. A interação com centros metálicos e S-nitrosilação é considerado o principal mecanismo pelo qual o NO exerce suas funções biológicas. A S-nitrosilação ocorre quando NO reage com tióis em resíduos de cisteína formando S-nitrosotiol, que caracteriza uma importante modificação estrutural das proteínas podendo modular sua função (Bogdan, 2001; Santolini, 2011).

A atividade antimicrobiana do NO pode ser resultante da sua ação em muitos processos, desde a transdução de sinal, efeitos na mutação de DNA, inibição do reparo e síntese de DNA, inibição da síntese de proteínas, modificações em proteínas por S-nitrosilação, ADP-ribosilação (ADP - ácido desoxirribonucleico) ou nitração de tirosinas, ativação ou inativação de enzimas por rompimento de *clusters* Fe-S (ferro-enxofre), dedos de zinco ou grupos heme e peroxidação de membranas lipídicas (Bogdan, 2001; Broillet,



1999; Marshall *et al.*, 2000). Além disso, S-nitrosilação pode provocar modificações pós-traducionais em importantes proteínas intracelulares incluindo Ras, ornitina descarboxilase, transglutaminase, c-Jun N-terminal cinases e especialmente caspases (Bauer *et al.*, 1999; Bernassola *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000; Peter *et al.*, 2002; Teng *et al.*, 1999).

NO pode alterar o balanço homeostático das células pela regulação da ativação e atividade das caspases, que são os mediadores centrais da apoptose em processos biológicos e patológicos. Apesar da produção de NO se manter muito baixa nas células em repouso, estímulos apoptóticos frequentemente aumentam a atividade da NOS e a produção de NO. Em alguns casos, a maior estimulação de NOS resulta na S-nitrosilação, que serve como um mecanismo de *feed back* negativo para inibir a apoptose (Chanvorachote *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2005). Em macrófagos, o NO inibe de maneira reversível a atividade da caspase-1 por S-nitrosilação da cisteína presente em seu sítio ativo, impedindo a maturação de IL-1 $\beta$  e IL-18. Camundogos deficientes em iNOS apresentam altos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-18 em resposta ao estímulo com lipopolissacarídeo (LPS), sugerindo que existe uma via de regulação de caspase-1 por NO (Dimmeler *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Peter *et al.*, 2002). Em outros casos, os danos causados no DNA e os efeitos diretos do NO sobre a mitocôndria podem levar à liberação de citocromo c, componente chave do complexo apoptótico, que induz a clivagem e ativação da caspase-9 e consequente apoptose celular (Hengartner, 2000).

O óxido nítrico é uma molécula versátil com efeitos tanto tóxicos quanto regulatórios, atuando sobre cascatas de sinalização e diversos fatores de transcrição (Bogdan, 2001). Em macrófagos, o papel antimicrobiano de NO é o mais evidente mecanismo de morte ou inibição para um grande número de microrganismos, seja por seus efeitos diretos ou indiretos. NO pode inibir a respiração bacteriana, o que explica a indução de um estado persistente ou dormente em certos microrganismos, como o *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, vários patógenos são dependentes de arginina exógena para a síntese de poliaminas e proliferação celular, portanto, a depleção da arginina pela iNOS ou arginase nos macrófagos pode levar a inibição do crescimento e morte dos parasitas (Bogdan, 2001; Fang, 2004).

O NO gerado em grandes quantidades nos macrófagos e outras células do sistema imune está envolvido na defesa contra organismos infecciosos incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários. Mais especificamente, NO protege contra infecções por

*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium SP*, *Schistosoma mansoni*, *Salmonella* e *Escherichia coli*. A eficácia do NO como agente antimicrobiano irá depender da sua concentração local e do ambiente redox, bem como da sensibilidade do microrganismo, que varia entre as diferentes cepas do patógeno (Gao, 2010; Gutierrez *et al.*, 2009; Mukbel *et al.*, 2007; Nairz *et al.*, 2013; Vareille *et al.*, 2007). Muitos microrganismos desenvolveram mecanismos de resistência ao stress oxidativo e também para escapar da morte por fagócitos ativados (Bogdan, 2015).

Em vários modelos murinos de infecção, já foi demonstrado que a resistência mediada pelo NO é devido à resposta do macrófago ao IFN- $\gamma$  produzido por linfócitos Th1, que induz à síntese da iNOS, e que uma resposta do tipo Th2, na ausência de IFN $\gamma$ , não apenas não induz a iNOS como também inibe a síntese de iNOS, o que foi particularmente estudado no modelo de infecção por *Leishmania major* (Locksley & Scott, 1991; Liew *et al.*, 1991). Estudos do nosso e de outros grupos em modelos murinos de resistência/susceptibilidade revelaram ainda que, independente da ativação de linfócitos Th1 e Th2, macrófagos de linhagens de camundongos resistentes (C57BL/6) a vários tipos infecção são mais sensíveis aos estímulos de IFN $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  ou LPS para a produção de NO quando comparados às linhagens de camundongos susceptíveis (BALB/c). Isto indica que, independente do patógeno, macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c apresentam mecanismos regulatórios inatos distintos, sugerindo que a resistência e a susceptibilidade destes camundongos deve ser também dependente da capacidade intrínseca do macrófago de produzir NO, independentemente do tipo de resposta adaptativa (Jardim *et al.*, 1997; Liew *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 1992, Santos *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2014).

Anteriormente, o NO era conhecido principalmente por seu papel antimicrobiano, tumoricida e por seus efeitos nos danos teciduais, operando como molécula essencial do sistema imune inato. Hoje já ficou claro que esta molécula afeta também as respostas do sistema imune adaptativo, exercendo seus efeitos protetores por sua capacidade de sinalização pleiotrópica e versátil (Bogdan, 2011; Bogdan, 2015; Niedbala *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2010).

## 1.2. Regulação da expressão e atividade da iNOS

A síntese de iNOS se diferencia de maneira espécie-específica. Já foi observado que a expressão desta proteína e a síntese de NO é notavelmente menor em macrófagos humanos do que em roedores. Esta variação acontece mais em função das diferenças no promotor da iNOS humana e não propriamente da atividade da iNOS (Ganster *et al.*, 2001; Weinberg, 1998; Wink *et al.*, 2011). A dificuldade em detectar NO em macrófagos humanos ocorre devido a perda da tetrahidrobiopterina nas culturas *in vitro*, um cofator necessário para a atividade catalítica da iNOS, que não é constitutivamente expresso por monócitos e macrófagos humanos, e pela baixa sensibilidade dos testes colorimétricos padrões de detecção de NO. Entretanto, *in vivo*, macrófagos humanos podem obter a tetrahidrobiopterina a partir de células vizinhas capazes de sintetizar esta molécula (Chan *et al.*, 2001). A espécie humana sintetiza NO a partir do aumento da atividade de iNOS. Embora os níveis de produção de NO e da proteína iNOS em macrófagos humanos sejam menores, a indução desta proteína é dependente da combinação sinérgica de vários sinais imunes (Weinberg, 1998; Wink *et al.*, 2011).

A iNOS não é expressa em macrófagos em repouso, mas é rapidamente transcrita em resposta a estímulos de microrganismos e citocinas e tem grande capacidade imunoprotetora. Diferentemente das outras isoformas, a iNOS pode produzir grande quantidade de NO em um curto período de tempo (Tennyson & Lippard, 2011). A sua expressão é induzida principalmente por citocinas tais como IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-1 $\beta$  ou produtos microbianos, como o LPS. Diferentemente de células de camundongos ou ratos, a indução da expressão da iNOS em células humanas requer uma combinação de várias citocinas incluindo IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Os indutores da expressão de iNOS ativam diferentes e complexas vias de sinalização que, de forma geral, levam à ativação ou inibição de JAKs (Janus cinase) e STATs (*signal transducers and activators of transcription*), por citocinas como os interferons (IFN) e/ou NF- $\kappa$ B (Kleinert *et al.*, 2004). Outras citocinas podem exercer efeito oposto, como o TGF- $\beta$  que atua como supressor da síntese de iNOS pela regulação das vias de IRF-3 (IRF- *interferon regulatory factor*) e STAT-1 (Sugiyama *et al.*, 2012; Takaki *et al.*, 2006; Vodovotz *et al.*, 2004).

As sequências publicadas de promotores da iNOS clonados de diferentes espécies mostram homologias a sítios de ligação para numerosos fatores de transcrição incluindo: NF- $\kappa$ B, AP-1 (*activating protein-1*), STAT1, IRF1, NF-IL-6 (*nuclear factor IL-6* ou fator nuclear IL-6), C/EBP (*CCAAT-enhancer box binding protein* ou proteína intensificadora de ligação a CCAAT), CREB (*cAMP responsive element binding protein* ou proteína

ligante ao elemento responsivo de cAMP), Oct-1 (*octamer factor-1* ou fator octâmero-1) e proteínas do grupo-I (Y) de alta mobilidade. Todos os promotores da iNOS em mamíferos contem sítios de ligação para STAT1, que é essencial para a indução da expressão da iNOS ativada pela estimulação do TLR4 por LPS, seja pela ligação direta ao promotor da iNOS ou indiretamente pela indução de IRF1, fator de transcrição também essencial para a transcrição do seu gene (Bogdan, 2001; Kleinert *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1993). A indução da isoforma iNOS é principalmente regulada ao nível de sua expressão e envolve também mecanismos que regulam a modulação da atividade do promotor, estabilidade do mRNA e da proteína. O estímulo e as condições que determinam a expressão da iNOS são espécie-específicos (Pautz *et al.*, 2010).

O sistema interferon (IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha/\beta$ ) de camundongos e produtos de patógenos microbianos como por exemplo o LPS são indutores transcricionais de iNOS que efetivamente estimulam macrófagos para a liberação de grandes quantidades de NO. O estímulo via LPS ativa a expressão de IFN, que posteriormente irá induzir a dimerização de STAT1, a expressão do IRF-1 e a formação do ISGF (*interferon stimulated gamma factor* ou fator gama estimulador de interferon) complexo-3 (constituído por STAT1, STAT2 e IRF-9) ou a ativação de NF- $\kappa$ B, todos podendo se ligar a sítios de ligação no promotor de iNOS (Bogdan, 2015; Kleinert *et al.*, 2004). A primeira etapa desta ativação compreende a interação de componentes bacterianos com PRR (*pattern recognition receptors*) na membrana ou no citosol levando à ativação de NF- $\kappa$ B e a produção de IFN- $\alpha/\beta$  endógeno, respectivamente. Na segunda etapa, a sinalização de IFN- $\alpha/\beta$  promove a formação e ligação do complexo ISGF3 ao promotor, permitindo a ligação e ativação da polimerase II. Assim, NF- $\kappa$ B e ISGF3 agem sequencialmente e cooperativamente para ativar a transcrição da iNOS (Bogdan, 2015; Farlik *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 1998; Toshchakov *et al.*, 2002).

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B parece ser o alvo central dos ativadores ou inibidores da expressão da iNOS. O LPS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e até mesmo o estresse oxidativo induzem a expressão da iNOS em diferentes células por ativar o NF- $\kappa$ B. A inibição da expressão da iNOS por muitos agentes, tais como, glicocorticoides, TGF- $\beta$  ou antioxidantes também parece ser resultado da inibição da ativação NF- $\kappa$ B (Kleinert *et al.*, 2004, Pautz *et al.*, 2010). As proteínas da família do NF- $\kappa$ B são estruturalmente homólogas e formam vários homo ou heterodímeros que agem como ativadores ou repressores da transcrição. O heterodímero p50/p65 é a forma de NF- $\kappa$ B mais abundante na maioria das células e juntamente com os complexos p50/c-Rel, p65/p65 e p65/c-Rel são ativadores da

transcrição. Os complexos p50/p50 e p52/p52 funcionam como repressores da transcrição. O NF- $\kappa$ B no citosol está associado a uma proteína que impede a sua translocação para o núcleo, denominada I $\kappa$ B ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ). O NF- $\kappa$ B é então ativado após a degradação do I $\kappa$ B pelo proteassoma (Liang *et al.*, 2004; Rothwarf & Karin, 1999; Sun & Ley, 2008; Xie *et al.*, 1994).

O STAT1 é essencial para a indução da expressão da iNOS. Na ativação por LPS apenas, o STAT1 é produzido pela estimulação da síntese autócrina/parácrina de IFNs do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) que, assim como o IFN- $\gamma$ , induzem a fosforilação de STAT1. As proteínas STAT fosforiladas se dimerizam e translocam ao núcleo onde ativam a expressão dos genes dependentes de STAT (Kleinert *et al.*, 2004), como a iNOS. Na combinação dos estímulos LPS e IFN- $\gamma$  há a indução da ativação do NF- $\kappa$ B e de STAT1 bem como a síntese de IRF1. Os homodímeros de STAT1 fosforilado também participam da *trans*-ativação do gene de IRF1 aumentando a sua expressão. O acúmulo desses três fatores de transcrição no núcleo, juntamente com um dos fatores de transcrição octâmeros constitutivamente presentes, levam à transcrição do gene da iNOS. Quando apenas LPS é estímulo para a produção de NO, outra cascata de sinalização é iniciada que culmina na ativação do NF- $\kappa$ B e na indução de IFNs do tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ) e IRF. Ao interagir com o seu receptor, o IFN- $\beta$  induz a ativação de STAT1, que da mesma forma que descrito para a estimulação simultânea com LPS e IFN- $\gamma$ , ativa a expressão de IRF1 (Gao *et al.*, 1998). Assim, STAT1 está essencialmente envolvido na estimulação da iNOS, seja diretamente pela ligação ao promotor ou indiretamente pela indução de IRF1 (Kleinert *et al.*, 2004).

Outras citocinas e fatores de crescimento também foram identificados como indutores da iNOS em macrófagos. Resultados recentes mostraram que macrófagos de camundongo infectados com *Leishmania amazonensis* e estimulados com IL-1 $\beta$  liberam quantidades notáveis de NO, demonstrando que aproximadamente 40% da produção de NO é dependente da ativação do inflamassomo (caspase 1) e conseqüentemente da síntese de IFN- $\gamma$  endógeno (Lima-Junior *et al.*, 2013). Isto sugere que IL-1 $\beta$  pode conferir sinais para indução da iNOS, confirmando outros achados em diferentes tipos celulares de várias espécies (Bogdan, 2015). Outra descoberta inovadora relaciona os micro RNAs (miRNAs) na regulação dos níveis de mRNA de iNOS e da expressão desta proteína em vários tipos celulares, incluindo macrófagos de camundongo. Na maioria dos casos, os miRNAs identificados agem indiretamente bloqueando a expressão de sinalizadores ou fatores de transcrição (ex: SOCS-1, IRAK-1, NF- $\kappa$ B, Rheb), que podem regular positiva

ou negativamente a expressão de iNOS (Banerjee *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013; Yang, *et al.* 2014).

A regulação da estabilidade do mRNA é importante na regulação da expressão da iNOS, especialmente em humanos. A inibição da expressão da iNOS por diferentes agentes tais como TGF- $\beta$ 1 em macrófagos murinos ou dexametasona em células mesangiais de ratos tem sido descrita como resultado da desestabilização do mRNA e da proteína iNOS (Kleinert *et al.*, 2004; Pautz *et al.*, 2010). Em macrófagos alveolares humanos estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS, a perda de iNOS mRNA e da expressão da proteína foram recentemente atribuídas a efeitos epigenéticos relacionados ao silenciamento gênico pela metilação CpG, modificações de histonas e compactação da cromatina (Gross *et al.*, 2014).

A expressão de iNOS também pode ser regulada, em parte, pelo próprio NO endógeno. Baixas quantidades de NO, como encontrado em concentração fisiológica, mantêm suprimida a expressão de iNOS por impedir a ativação do NF- $\kappa$ B. Se o nível de NO cai para um valor abaixo do *threshold*, a expressão de iNOS é facilmente ativada. Nesta perspectiva, citocinas pró-inflamatórias e LPS rapidamente diminuem o nível de NO na fase precoce da resposta inflamatória, para então permitir ativação de NF- $\kappa$ B e conseqüentemente a indução de iNOS (Colasanti *et al.*, 1995; Persichini *et al.*, 2006). Albakri e Stuehr (1996) demonstraram três mecanismos pelos quais NO pode regular a expressão de iNOS: 1) inibição direta da catálise pela ligação do NO ao ferro-heme da enzima formando um complexo ferro-nitrosil inativo; 2) aumento do mRNA e da proteína iNOS por promover a perda de ferro; 3) inibição da montagem pós-traducional da iNOS dimérica por sub-regular a inserção e disponibilidade do heme.

A atividade da iNOS depende da disponibilidade, regulação do transporte ou do consumo do seu substrato por outras vias bioquímicas (Pautz *et al.*, 2010). Em células de mamíferos, L-arginina é usada como substrato por NOS, arginase, argininaglicina transaminase e arginina descarboxilase. Entre essas enzimas, NOS e arginase desempenham papéis mais significativos no metabolismo de L-arginina em macrófagos citotóxicos (Chang *et al.*, 1998; Hrabák *et al.*, 1994). A atividade de iNOS é um fator importante no mecanismo citotóxico de macrófagos para controlar o crescimento de patógenos. Por outro lado, atividade de arginase impede ativação excessiva do sistema imune e promove a resolução da inflamação. As citocinas pró-inflamatórias clássicas como IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 induzem a expressão de iNOS, enquanto citocinas anti-inflamatórias humorais como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$ , prostaglandinas (PGE) e

catecolaminas induzem a expressão de arginase I. As endotoxinas induzem tanto iNOS como arginase I. Sob indução, iNOS exerce um efeito regulador na atividade da arginase pela produção de hidróxi-L-arginina, um produto intermediário da síntese de NO, enquanto arginase I regula NO por meio da depleção da disponibilidade de arginina (Marathe *et al.*, 2006; Popovic *et al.*, 2007). Como podemos observar, a atuação do óxido nítrico na resposta imune é altamente regulada pela expressão da iNOS, que irá depender da origem de cada célula, das condições de cultura e dos estímulos a que estão submetidas.

### **1.3. A sinalização celular induzida por LPS via TLR4**

O sistema imune age de forma coletiva e coordenada, por meio de suas células e moléculas e associado a outros sistemas, na manutenção do equilíbrio fisiológico do organismo. Para garantir este equilíbrio o sistema imune identifica o que é próprio e, dentre os agentes externos, distingue ainda a microbiota benéfica dos agentes patogênicos ao organismo (Janeway & Medzhitov, 2002). Os componentes da imunidade inata são específicos para estruturas comuns aos grupos de microrganismos relacionados e muitas vezes não distinguem semelhanças discretas entre eles. A interação entre patógeno invasor e hospedeiro é geralmente iniciada via reconhecimento de estruturas moleculares conservadas e presentes em todos os estágios e ciclos de vida dos patógenos, conhecidas como Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou padrão molecular associado à patógeno), que são essenciais para a sobrevivência dos microrganismos. Estas estruturas são reconhecidas por meio dos Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs – *Pattern Recognition Receptors*), que levam à ativação de diferentes componentes do sistema imune inato tanto humorais como celulares (Akira *et al.*, 2006). Os PRRs também são capazes de interagir com estruturas próprias presentes em células em estresse ou lesadas, chamados de Padrões Moleculares Associados ao Perigo (DAMPs – *Danger Associated Molecular Patterns* ou padrão molecular associado ao perigo), iniciando o processo de reparo tecidual. As células que estão diretamente infectadas ou na vizinhança de outras infectadas podem aumentar a expressão de DAMPs. Assim, a imunidade inata contribui para a eliminação de células não funcionais e/ou que contêm microrganismos patogênicos, mesmo se os produtos microbianos não forem expostos (Abbas *et al.*, 2012; Villaseñor-Cardoso & Ortega, 2011).

Os vários PAMPs reconhecidos pelo sistema imune inato estão presentes em diferentes microrganismos e, em sua maioria, essenciais à sua sobrevivência, o que garante que estes não sejam perdidos ao sofrerem mutações que evitariam o seu reconhecimento. Alguns exemplos comuns de alvos da imunidade inata e que são essenciais aos microrganismos são: RNA viral de fita dupla, sequências de CpG não metiladas do DNA de bactérias, proteínas bacterianas cuja síntese é iniciada por Nformilmetionina, lipídios e carboidratos complexos, componentes estruturais de paredes bacterianas conhecidos como LPS e o ácido lipoteicoico (LTA) (Abbas *et al.*, 2012). Por outro lado, os PRRs podem ser expressos na superfície celular e no interior da célula (associado com membranas de endossomos ou no citosol) ou ainda secretados como moléculas solúveis na circulação, fluidos intersticiais e/ou em secreções. Eles podem mediar várias funções tais como opsonização, ativação das cascatas do complemento ou da coagulação, fagocitose, citotoxicidade celular, secreção de citocinas e/ou mediadores pró-inflamatórios pela célula e indução de apoptose (Teixeira *et al.*, 2002; Villaseñor-Cardoso & Ortega, 2011). Vários tipos de PRRs já foram descritos, como os Receptores semelhantes ao Toll (TLRs – *Toll-like receptors*), os receptores semelhantes a NOD (NLRs – *NOD-like receptors* ou receptores semelhantes a NOD), Helicases semelhantes a RIG (RLRs – *RIG-like receptors* ou receptores semelhantes ao RIG), lectina ligadora de manose (MBL – *Mannose-binding lectin* ou lectina ligadora de manose) receptores citosólicos de DNA e receptores scavenger (SR - *scavenger receptors*) (Kumar *et al.*, 2011; Villaseñor-Cardoso & Ortega, 2011).

Os PRRs mais estudados são os TLRs, principalmente expressos em células apresentadoras de antígenos (APCs – *Antigen-Presenting Cells*), tais como células dendríticas e macrófagos. Além destas, os membros da família dos TLR podem ser expressos também em linfócitos T e B, outras células do sistema imune e células que não pertencem ao sistema imune (Egan *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Villaseñor-Cardoso & Ortega, 2011). Até o momento foram descritos 13 TLRs, sendo TLR1 ao TLR9 conservados em camundongos e humanos, TLR10 não funcional em camundongos devido a uma inserção de retrovírus e TLR11, TLR12 e TLR13 não expressos em humanos. Os TLRs são glicoproteínas integrais de membrana tipo I caracterizados por um domínio N-terminal de ligação extracelular contendo motivos ricos em repetições de leucina (LRR – *leucin-rich repeat* ou rico em repetições de leucina) e um domínio de sinalização citoplasmático homólogo ao receptor de interleucina-1 denominado de domínio TIR (*Toll-Interleukin-1 Receptor*). A sequência LRR do domínio N-terminal é responsável por



mediar o reconhecimento dos TLRs aos seus respectivos ligantes e a região TIR permite a interação entre TLRs e as proteínas adaptadoras, para iniciar a cascata de transdução de sinais (Jin & Lee, 2008).

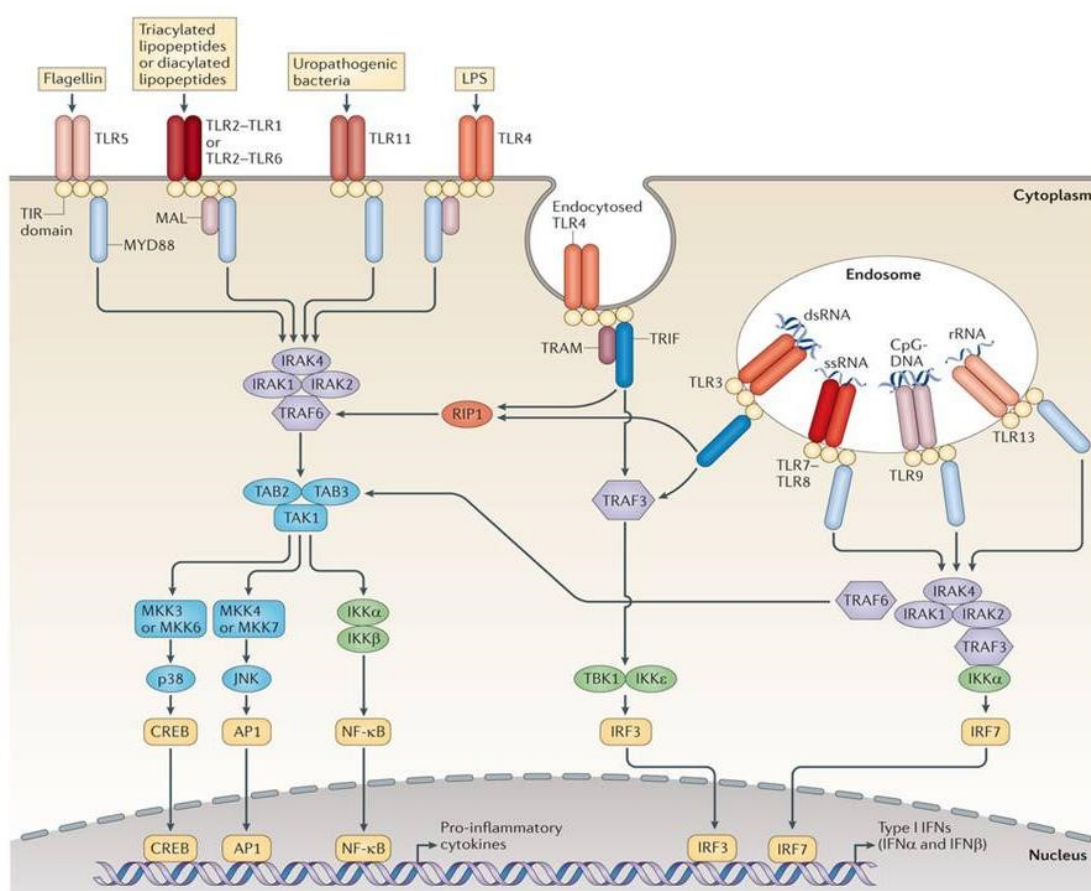
A família de TLR é dividida de acordo com a sua localização (Figura 1), sendo TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 descritos como membros da subfamília que é expressa na superfície celular e os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 fazendo parte da subfamília localizada em compartimentos intracelulares tais como endossomos, lisossomos ou retículo endoplasmático, com o domínio LRR no lado interno da membrana endossômica onde eles reconhecem e respondem a seus ligantes derivados de microrganismos internalizados (Egan *et al.*, 2009; Kawai & Akira, 2009). Os TLRs reconhecem uma grande faixa de moléculas microbianas que incluem: lipopeptídeos de bactérias (heterodímeros TLR 1/2 e 2/6) (Jin *et al.*, 2007), RNA fita dupla extracelular (TLR3) (Alexopoulou *et al.*, 2001), LPS de bactérias gram-negativas e outros (TLR4), flagelina (TLR5) (Hayashi *et al.*, 2001), RNA fita simples extracelular (TLR7/8) (Diebold *et al.*, 2004) e CpG DNA (TLR9) (Hemmi *et al.*, 2000). TLR4 é o único TLR que não se liga diretamente ao ligante, porque é dependente de uma associação não-covalente com o co-receptor MD2, que permite a associação com o ligante e o início da dimerização de TLR4 (Kumar *et al.*, 2011; O'Neill *et al.*, 2013).

O LPS é o componente principal da membrana externa das bactérias gramnegativas e consiste do lipídeo A, do centro polissacarídico e do antígeno O. O lipídeo A, ou endotoxina, é o padrão molecular conservado do LPS, sendo a região reconhecida pelo sistema imune inato. Um exemplo é o lipídeo A do patógeno *Escherichia coli*, que é altamente imunogênico mesmo em baixas concentrações (Miller, 2005). O excesso de LPS em infecções descontroladas pode levar a uma resposta tão vigorosa que resulta em choque séptico.

O mecanismo mais conhecido pelo qual LPS é detectado pelas células do sistema imune inato é mediado pelo complexo TLR4/MD2. No entanto, outras moléculas da superfície celular como os SRs de macrófagos, CD11/b/CD18 e canais iônicos já foram descritos como receptores de LPS (Cohen, 2002).

A sinalização induzida por TLR4 resulta na expressão de genes importantes em inflamação, resposta antimicrobiana direta (NO e ROS - espécies reativas de oxigênio), apresentação de antígenos, sobrevivência, proliferação ou morte celular. As citocinas

induzidas por TLR4 são moléculas-chave na regulação dos processos inflamatórios podendo ter funções anti ou pró-inflamatórias. O padrão de expressão de citocinas mediado pela estimulação do TLR4 é diferente entre os vários tipos celulares, bem como entre camundongos e humanos. Porém, algumas citocinas tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-12 são expressas em macrófagos tanto humanos quanto de camundongos após estimulação por LPS (Rossol *et al.*, 2011). O LPS modula a expressão de milhares de genes por mecanismos que incluem regulação transcricional direta ou indireta, via expressão de genes induzíveis, regulação pós-transcricional, estabilidade do mRNA e mecanismos tardios para a modulação da transcrição de genes. Por exemplo, o IFN- $\beta$  induzido por LPS age de forma autócrina para direcionar uma “segunda onda” de expressão de genes inflamatórios de maneira dependente de STAT1 (Rossol *et al.*, 2011).



**Figura 1. Os receptores TLR, respectivos ligantes e suas principais vias de sinalização (O'Neill *et al.*, 2013).**

O reconhecimento celular do LPS acontece principalmente pelo complexo TLR4/MD2/CD14 presente em vários tipos celulares incluindo as APCs. O reconhecimento do lipídeo A requer uma proteína acessória, a proteína de ligação a LPS (LBP – *LPS binding protein*), que converte as micelas oligoméricas de LPS em

monômeros que serão reconhecidos pelo CD14. O CD14, que é uma proteína de membrana de alta-afinidade ancorada por GPI (glicosil fosfatidil inositol), concentra o LPS para a ligação ao complexo TLR4/MD2 (Miller *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007). Não há interação direta entre TLR4 e LPS, sendo a proteína MD2, associada ao domínio extracelular de TLR4, o componente de ligação ao LPS no complexo TLR4MD2 (Kawai & Akira, 2009). Após o reconhecimento do LPS, TLR4 se dimeriza e sofre mudanças conformacionais que levam ao recrutamento de moléculas adaptadoras. Quatro moléculas adaptadoras diferentes participam da transdução do sinal dos TLRs e apresentam em comum um domínio denominado TIR: 1) MyD88, 2) TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein* ou proteína adaptadora contendo o domínio TIR) ou MAL (*MyD88-adaptor-like* ou adaptador semelhante a MyD88), 3) TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN*) ou TICAM1 (*TIR-containing adaptor molecule 1* ou molécula adaptadora contendo o domínio TIR), 4) TRAM (*TRIF-related adaptor molecule* ou molécula adaptadora relacionada à TRIF) ou TICAM2 (*TIR-containing adaptor molecule 2*). Após o recrutamento de proteínas adaptadoras, proteínas cinases fosforilam de fatores de transcrição, que se translocam ao núcleo e possibilitando a transcrição de genes de várias citocinas (Fitzgerald *et al.*, 2004; Villaseñor-Cardoso & Ortega, 2011).

A molécula adaptadora MyD88, aliada a outra proteína adaptadora MAL, desempenha um papel central na sinalização desencadeada pela ativação de TLR4 na via dependente de MyD88. Porém, TLR4 pode recrutar também TRIF, por meio da molécula adaptadora TRAM e iniciar outro tipo de sinalização independente de MyD88. O TLR4 primeiro recruta MAL ou TIRAP que facilita o recrutamento de MyD88, para iniciar a primeira fase de ativação do NF- $\kappa$ B e MAP cinases. Na sinalização dependente de TRIF, há a formação de um complexo com TRAM e TRIF (Kagan *et al.*, 2008; Zanoni *et al.*, 2011), que inicia a sinalização dependente necessária para a ativação de IRF3, com consequente indução de interferon do tipo I (IFN $\alpha/\beta$ ), predominando IFN- $\beta$ .

#### 1.4. IFN- $\beta$ e a produção de NO

Os IFNs são citocinas com grandes propriedades imunomodulatórias antivirais e antibacterianas, que atualmente se dividem em 3 famílias: IFNs do tipo I, II e III. A família do IFN tipo I, em humanos e camundongos, é composta por 16 membros, sendo 12 subtipos de IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$  e IFN $\omega 6$ . Por outro lado, a família do IFN II inclui apenas o IFN $\gamma$ . O IFN tipo III é a família IFN $\lambda$ , que inclui as citocinas IFN $\lambda 1$  (conhecida como IL-29), IFN $\lambda 2$  (IL-28A) e IFN $\lambda 3$  (IL-28B). Em relação à base da sequência de proteínas e de sua estrutura, IFN III é bastante diferente dos IFNs I e II e similar à família das interleucinas-10 (IL-10), mas eles também provocam respostas antivirais e induzem a ativação dos genes estimulados por IFN (González-Navajas *et al.*, 2012; Sin *et al.*, 2012).

Focaremos aqui no IFN- $\beta$ , por seu envolvimento direto neste trabalho. Esta citocina, que foi purificada e caracterizada entre 1970-1980 (Friesen *et al.*, 1981; Pestka, 2007; Rubinstein *et al.*, 1979), exerce atividades biológicas importantes para o sistema imune, incluindo a iniciação da síntese de proteínas anti-virais, promoção da atividade citotóxica e a direção da diferenciação e maturação de linfócitos (Chiang *et al.*, 2009; González-Navajo *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2001; Kito *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2002; Sin *et al.*, 2012). IFN- $\beta$  tem funções regulatórias autócrinas e parácrinas fundamentais na resposta ao LPS, seja em macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato ou em outros tipos de macrófagos. Macrófagos, perdem a sua capacidade de sintetizar iNOS sob a ação de anticorpos neutralizantes para IFN- $\beta$ , demonstrando sua importância na produção de NO (Zhang *et al.*, 1994; Khouri *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2014).

IFNs do tipo I podem ser produzidos por quase todos os tipos celulares, incluindo macrófagos, leucócitos, fibroblastos e células endoteliais. A via de sinalização que leva à indução de IFN I difere de acordo com o estímulo, o receptor TLR envolvido e o tipo celular que está respondendo. TLR3 e TLR4 induzem IFN- $\beta$  ativando IRF-3. TLR9 induz IFN- $\alpha/\beta$  pela ativação do IRF-7 quando reconhece oligonucleotídeos (CpG) em células dendríticas plasmocitóides, células dendríticas mieloides e macrófagos, além de poder recrutar IRF-1 por intermédio da molécula adaptadora MyD88 (Collona, 2007). Os IRFs exercem variadas funções, sendo o IRF-1 responsável por induzir a síntese de IFN- $\beta$  e da iNOS (Kröger *et al.*, 2002). IRF-3 e IRF-7 são muito semelhantes e podem agir formando dímeros ou criando mecanismos de sinergismo transcricional, para ativar mais fortemente

o promotor do gene de IFN- $\beta$  (Yang *et al.*, 2004). Existem ainda fatores de regulação negativo como IRF-4 e IRF-2, sendo IRF-2 inibidor competitivo do IRF-1, porque se liga na mesma região promotora do gene (Yim *et al.*, 2003). Assim, para cada via de sinalização de TLR teremos a ativação de fatores de transcrição particulares para a síntese do IFN I (Collona, 2007; Taniguchi *et al.*, 2001).

A via independente de MyD88 e dependente de TRIF (Figura 2), que se inicia após a interação do LPS com o receptor de membrana TLR4, por intermédio das moléculas acessórias CD14 e MD2, estimula a produção de IFN- $\beta$  e apresenta também um *crosstalk* importante com a via dependente de MyD88 por intermédio do NF- $\kappa$ B (Akira & Takeda, 2004). TRIF é o mediador crítico desta via, mas para que ele se ligue ao receptor TLR4 e inicie a sinalização, é preciso que o complexo TLR4/MD2/CD14 seja endocitado, de forma dependente de dinamina e de CD14 (Fig. 3), no endossomo, forme um complexo com TRAM e TRIF (Jonathan *et al.*, 2008; Kagan *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011; Zanoni *et al.*, 2011). TRAM e TBK1 são moléculas adaptadoras do citoplasma, sendo a cinase TBK1 responsável pela fosforilação do fator de transcrição IRF-3 (Fitzgerald *et al.*, 2003).

O IRF-3 é um membro com características próprias da família dos IRFs, porque está presente constitutivamente em altos níveis dentro da célula em sua forma inativa (monômero). Portanto, a sua regulação acontece pela dimerização e posterior formação de um complexo entre o dímero de IRF-3 e a proteína CBP/p300. Esta subunidade permite o direcionamento preciso do IRF-3 para o núcleo e a sua ligação ao gene ISRE (*interferon stimulated responsive element*), para induzir a expressão de IFN- $\beta$  (Yoneyama *et al.*, 2002). O IFN $\beta$  é secretado no meio extracelular, podendo induzir a segunda onda de ativação do NF- $\kappa$ B e MAP cinases, que culminará na indução de citocinas inflamatórias (Kumar *et al.*, 2011). A ligação do IFN- $\beta$  ao seu receptor induz a fosforilação de STAT-1 (Figura 2), essencialmente envolvidos na expressão de iNOS, seja pela ligação direta ao seu promotor ou indiretamente pela indução de IRF1, também essencial à transcrição de iNOS (Kleinert *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004). Esta cascata de sinalização proporciona um movimento de *feedback* positivo para amplificar a produção de IFN-I.

Em macrófagos murinos, a produção de NO induzida por LPS como único estímulo é dependente da síntese autócrina/parácrina de IFN- $\alpha/\beta$  (Fujihara *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994), que atua como o segundo estímulo fundamental para a transcrição ideal do gene da iNOS. O gene de IFN- $\beta$  é constitutivamente transcrito em macrófagos peritoneais, entretanto seus mRNAs são instáveis e por isso, estão presentes em baixas

quantidades nas células não estimuladas. Ambos os IFNs tipo I e II induzem a fosforilação de STAT-1 $\alpha$ , sendo a ativação deste fator de transcrição necessária para a indução por LPS do gene da iNOS. O STAT-1 fosforilado induz a transcrição do gene de IRF-1. Com o acúmulo no núcleo de NF- $\kappa$ B, homodímeros de STAT-1 $\alpha$ , IRF-1 e dos fatores de transcrição Oct-1 e Oct-2, que estão constitutivamente presentes no núcleo, ocorre a *trans*-ativação do gene da iNOS (Gao *et al.*, 1998).

Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que a maior expressão de iNOS nos macrófagos de camundongos C57BL/6 em relação aos de BALB/c é devida a uma maior produção de IFN $\beta$  em C57BL/6. O enfoque no estudo de algumas moléculas da imunidade inata, como a iNOS e o IFN $\beta$ , nos permitiram compreender que macrófagos de BALB/c produzem menos NO que C57BL/6 devido uma deficiência na sinalização mediada por TLR4, que leva à menor produção de IFN- $\beta$  e conseqüentemente à reduzida ativação de STAT-1 para produção de iNOS (Oliveira *et al.*, 2013). A relevância do IFN- $\beta$  para produção ótima de óxido nítrico nos faz sustentar o interesse na sinalização desta citocina após estímulo com LPS via TLR4, o seu papel na produção de iNOS e na regulação da resposta imune inata em macrófagos.

### **1.5. Os Receptores Scavenger (SR) na resposta imune**

Além do TLR4, outras moléculas presentes nas células do hospedeiro também podem reconhecer o LPS e ativar células do sistema imune, como é o caso dos SR (van Amersfoort *et al.*, 2003; van Berkel *et al.*, 1998).

Brown e Goldstein (1979) descreveram pela primeira vez os SR e, a princípio, associaram sua atividade com o metabolismo do colesterol. A capacidade desses receptores de membrana em se ligar e internalizar lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL - *oxidized low-density lipoprotein* ou lipoproteína de baixa densidade oxidada) seria fundamental para a diferenciação entre moléculas próprias inalteradas e outras modificadas (DAMPs), tendo sido o oxLDL relacionado à patogênese da aterosclerose (Hartvigsen *et al.*, 2008; Kzhyshkowska *ET AL.*, 2002; Miller *et al.*, 2011; Moore & Tabas, 2011). Nos últimos anos, vários SRs foram identificados e amplia-se cada vez mais o entendimento sobre a diversa gama de ligantes que podem ser reconhecidos por eles, incluindo proteínas endógenas não modificadas e lipoproteínas,

além de outras estruturas microbianas conservadas como LTA e LPS (Areschoug & Gordon, 2009; Krieger et al., 2002; Plüddemann *et al.*, 2006; Plüddemann *et al.*, 2007).

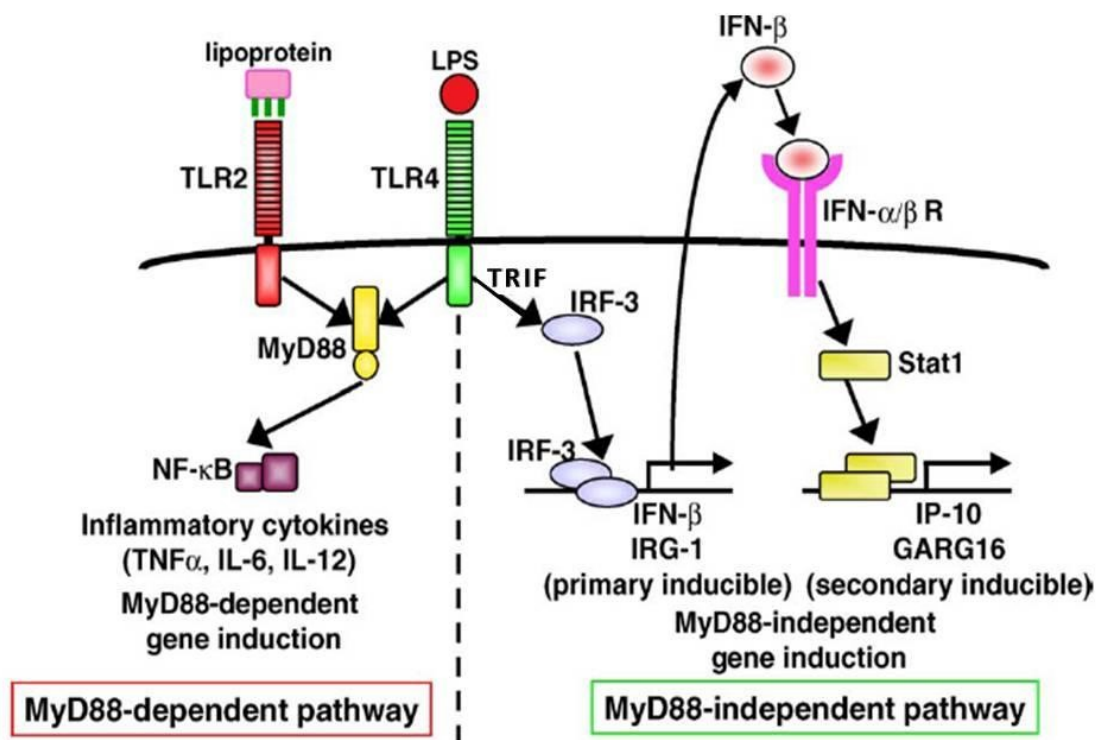
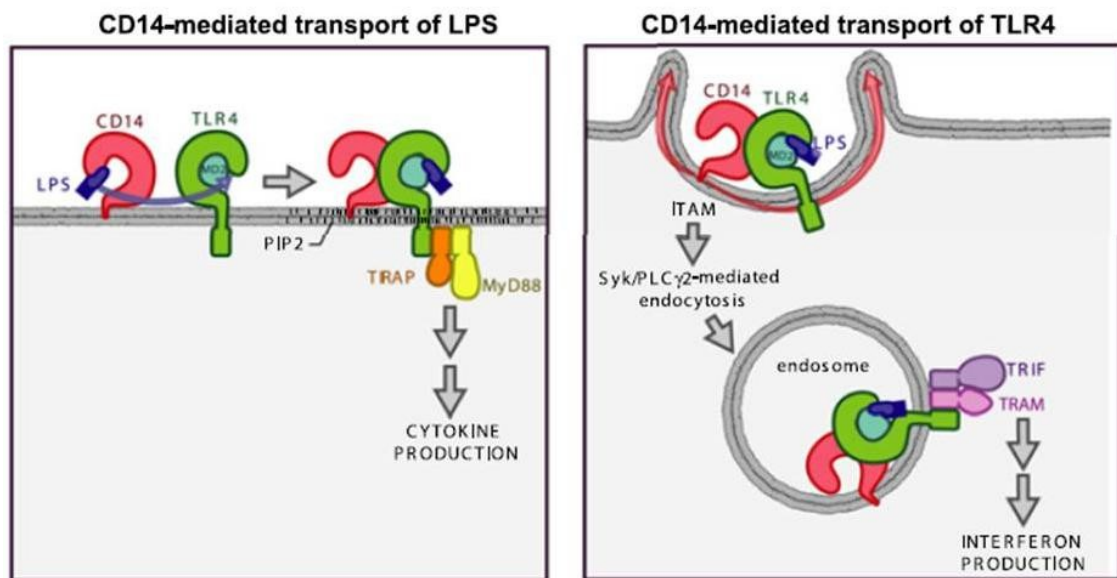


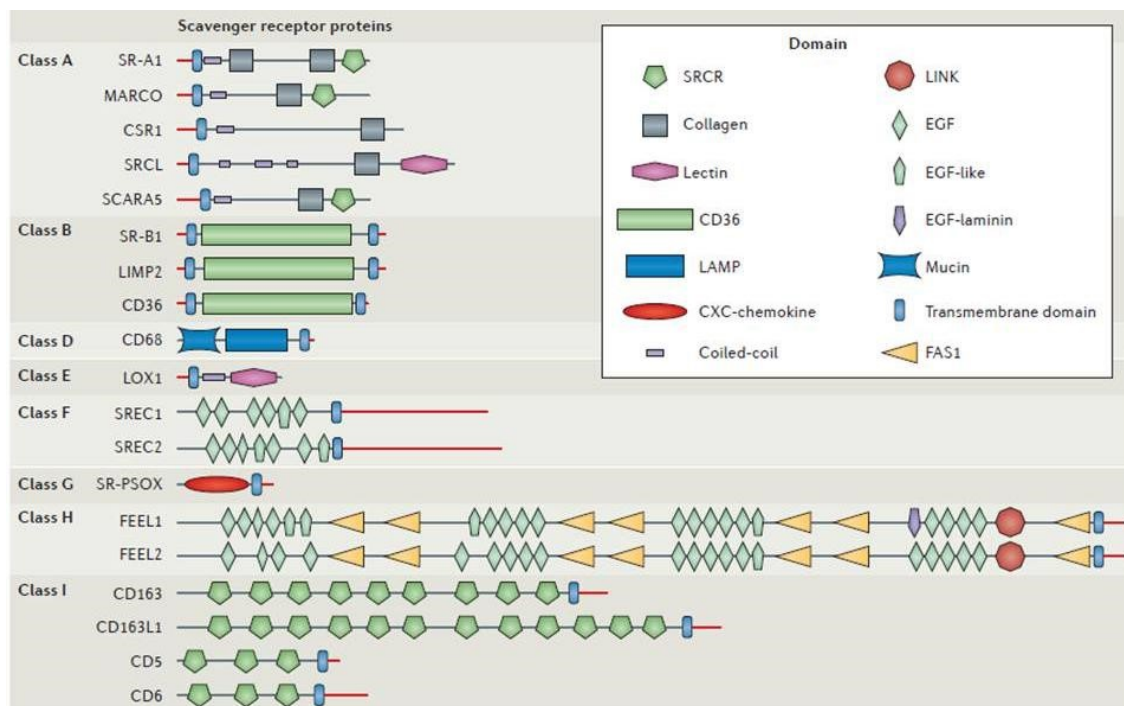
Figura 2. Sinalização de LPS via TLR4 dependente e independente de MYD88 (Adaptado de Yamamoto *et al.*, 2004).



**Figura 3. Processo de endocitose do TLR4 dependente de CD14 (Zanoni *et al.*, 2011)**

Os SR compreendem uma grande família de glicoproteínas transmembranas que agem como PRRs contra diversos patógenos e podem funcionar como co-receptores dos TLRs (Peiser *et al.*, 2002; Stewart *et al.* 2010), modulando a resposta inflamatória e funcionando como mecanismo de desintoxicação e prevenção de inflamações vigorosas e sepsis (Hampton *et al.*, 1991; Haworth *et al.*, 1997; Ozment *et al.*, 2012). SR são estruturalmente muito heterogêneos e foram divididos em classes e, embora os membros de cada classe compartilhem características estruturais, existe pouca ou nenhuma homologia entre elas (Figura 4). Atualmente, os SRs são divididos em diferentes classes (A-I), de acordo com sua estrutura global de multidomínios (Murphy *et al.*, 2005; Canton *et al.*, 2013). Eles podem ser agrupados também por suas propriedades funcionais semelhantes, que permitem reconhecer moléculas próprias modificadas (ex: células apoptóticas, debris e proteínas danificadas) e também elementos estranhos ao organismo, como microrganismos e outras partículas (Areschoug & Gordon, 2009; Canton *et al.*, 2013; Suzuki, H. *et al.*, 1997). As diferentes funções possibilitam aos SRs atuarem tanto na manutenção da homeostase como na patogênese de diversas doenças, exercendo importante papel na imunidade inata (Feng, H. *et al.* 2011; Kzhyshkowska, 2010; Mukhopadhyay & Gordon, 2004; Silverstein & Febbraio, 2009).





**Figura 4. Arquitetura dos domínios que constituem as diferentes classes de receptores scavenger (Canton *et al.*, 2013).**

A classe A dos SRs (SR-A) é expressa em quase todas as subpopulações de macrófagos e células dendríticas, sendo constituída por glicoproteínas transmembranas triméricas tipo II com vários domínios: cauda citoplasmática, região transmembrana, espaçadores,  $\alpha$ -hélices, região rica em colágeno e o domínio C-terminal rico em cisteína (SRCR - *SR cystein-rich*). Existem duas variantes funcionais de SR-A (SR-AI e SR-AII), sendo que SR-AII não possui a maioria do SRCR (Areschoug & Gordon, 2009; Murphy *et al.*, 2005). Nos receptores SR-AI (também conhecidos como SR-A1 ou MSR1) o domínio SRCR não está envolvido com o reconhecimento do ligante, mas ao invés disto medeia interações com outras proteínas de membrana, sendo o domínio de colágeno responsável pela interação com o ligante (Canton *et al.*, 2013; Ojala *et al.*, 2007). Estes receptores podem mediar o reconhecimento e internalização de LPS associado a lipoproteínas, como no caso de 90% do LPS que é incubado com soro humano e se associa com lipoproteínas e quilomícrons (Harris *et al.*, 1993; de Haas *et al.*, 2000). A ligação do LPS circulante às lipoproteínas do plasma é crucial para prevenir respostas inflamatórias exacerbadas após infecções com bactérias gramnegativas (Andra *et al.*, 2010; Triantafilou *et al.*, 2012). No entanto, SR-A-I/II e outros SR podem reconhecer LPS sem o envolvimento com lipoproteínas (Hampton *et al.*, 1991; Vishnyakova *et al.*, 2003).

Os primeiros relatos relacionados ao envolvimento de SR na defesa do hospedeiro foram apresentados por Hampton *et al.* (1991), que demonstraram a ligação de SR-A ao LPS purificado de bactérias gram-negativas *Escherichia coli*. Logo após, demonstrou-se que SR-A era capaz de se ligar também ao LTA de bactérias grampositivas (Dunne *et al.*, 1994) e atualmente, estudos indicam que proteínas da superfície bacteriana são os maiores ligantes para SR-A (Areschoug & Gordon, 2009; Peiser *et al.*, 2006; Areschoug *et al.*, 2008; Plüddemann *et al.*, 2009), além de poderem se ligar a CpG bacterianos (Zhu *et al.*, 2001) e RNAs de fita dupla (Limmon *et al.*, 2008). Estudos com camundongos deficientes em SR-A demonstraram que estes animais são mais susceptíveis à infecções intraperitoneais com *Staphylococcus aureus*, bactérias intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sordellii*, herpes vírus entre outras infecções (Suzuki *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2000; Thelen *et al.*, 2010).

Os mecanismos de reconhecimento do LPS que envolvem a associação entre TLR4, CD14 e SR ainda não estão bem compreendidos, mas alguns estudos demonstram que esta atuação conjunta é essencial para a internalização de altas concentrações de LPS e para a regulação da produção de citocinas inflamatórias (Borzwicka *et al.*, 2013; Czerkies *et al.*, 2013; Dunzendorfer *et al.*, 2004; Poussin *et al.*, 1998; Zanoni *et al.*, 2011), que poderiam estar relacionadas também à ativação de óxido nítrico em macrófagos. A literatura relacionada à sinalização celular de SR-A em macrófagos é pequena e, muitas vezes, contraditória. Os mecanismos pelos quais o LPS promove a interação do TLR4 com SR-A e suas vias de sinalização precisam ser melhor compreendidos. Assim, nosso interesse principal com o presente estudo foi avaliar a importância dos SR e da sinalização por ele induzida na produção de NO via TLR4 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.

*Requerimento de receptores scavenger na sinalização via TLR4 para a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS: papel na ativação de IRF-3 e STAT-1*

## **2. Objetivos**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar a participação dos receptores scavenger (SR) em associação com o TLR4 na sinalização induzida por LPS para a produção de NO em macrófagos de camundongos C57BL/6

### **2.2. Objetivos específicos**

- a) Investigar a contribuição de TLR4 na produção de NO induzido por LPS em macrófagos.
- b) Verificar se os SR estão envolvidos na produção de NO e na expressão da iNOS em macrófagos estimulados por LPS pela inibição dos mesmos com DSS ou anticorpo neutralizante específico para SR-AI/MSR de macrófagos murinos.
- c) Investigar se a inibição de SR-A influencia na expressão de IFN- $\beta$ , essencial para a transcrição de iNOS.
- d) Analisar o envolvimento dos SR nas vias de sinalização dependentes de MyD88 e de TRIF, ativadas por LPS via TLR4:
  - ✓ Avaliar a expressão de IFN- $\beta$  e do seu fator de transcrição IRF-3 após inibição de SR.
  - ✓ Avaliar a expressão das proteínas I $\kappa$ B $\alpha$  e fosfo-p65 NF- $\kappa$ B após inibição de SR.
- e) Verificar se SR atuam também na sinalização do receptor para IFN- $\beta$ , avaliando a expressão de STAT-1 ativado via LPS e IFN- $\beta$  após inibição de SR.

*Requerimento de receptores scavenger na sinalização via TLR4 para a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS: papel na ativação de IRF-3 e STAT-1*

### ***3. Material e Métodos***

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Este estudo foi realizado de acordo com a Legislação Brasileira para Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com o número de permissão CETEA 109/2012, tendo sido feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais. Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade entre 8-12 semanas. Os animais foram produzidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG. Os camundongos TLR4 *knockout* (TLR4 KO) foram mantidos no biotério coordenado pelo professor Dr. Sergio Costa Oliveira, que gentilmente nos cedeu os animais para a pesquisa. Antes de serem utilizados nos experimentos, os animais foram vermifugados com solução de ivermectina 1%, via oral, por uma semana.

#### **3.2. Reagentes e Equipamentos**

Equipamentos, reagentes e softwares foram adquiridos de: Brasil: Cripion Biotecnologia Ltda, Andradina, SP; Life Technologies do Brasil, Vila Guarani, SP. Estados Unidos: BD Pharmigen, San Diego, CA; Bio-Rad laboratories, Inc., CA; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA; Difco, Franklin Lakes, NJ; GE Healthcare, Waukesha, WI; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA; KPL, Gaithersburg, MD; Merck-Millipore, Billerica, MA; Molecular Devices, LCC, Sunnyvale, CA; National Institutes of Health - NIH, Bethesda, MD; Promega Corporation, Madison, WI; R&D Systems, Minneapolis, MN; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN; Shering-Plough, Whitehouse Station, NJ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA.

### 3.3. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos

Para obtenção dos macrófagos peritoneais, foram inoculados nos camundongos 2 mL de meio tioglicolato (Difco) 3% por via intraperitoneal. Após quatro dias, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Os macrófagos foram recolhidos utilizando seringa contendo 10 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) pH 7.2 gelado com antibiótico (50 mg/L de sulfato de gentamicina, Shering-Plough), que foram injetados na cavidade peritoneal e recolhidos de maneira estéril. O lavado peritoneal foi centrifugado a  $1200 \times g$  por 10 minutos, o *pellet* celular foi lavado com meio RPMI e submetido à nova centrifugação a  $1200 \times g$  por 10 minutos, sendo posteriormente ressuspendido em meio RPMI com antibiótico. As células foram contadas em câmara hemocimétrica de Neubauer e crescidas, de acordo com a finalidade de cada experimento, em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço), placas de 24 poços ( $3 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células/poço), placas de seis poços ( $1 \times 10^6$  células a  $5 \times 10^6$ /poço) e/ou em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> ( $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células/garrafa) em meio RPMI com antibiótico e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cripion Biotecnologia Ltda). As células foram incubadas por 2 h a 37°C em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) para adesão dos macrófagos. Em seguida, a cultura celular foi lavada com RPMI para remoção das células não aderentes e deixadas em repouso por 18 h, quando foram então estimuladas com 1 µg/ml de LPS extraído de *Escherichia coli* 0127 (SigmaAldrich). Em alguns experimentos, foi adicionado à cultura com LPS também IFN-β recombinante de camundongo (rIFN-β, Merck-Millipore) em diferentes concentrações. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação de NO e dosagem de citocina por ELISA, proteínas celulares totais foram extraídas para análises de *Western Blot* e mRNAs tiveram sua expressão determinada por *Real Time-PCR*.

### 3.4. Inibição da endocitose de TLR4

Em alguns experimentos, as células foram pré-tratadas por 30 minutos a 37° C com Dynasore 80 µM (Sigma-Aldrich), que atua inibindo a dinamina, envolvida na endocitose de TLR4. A inibição foi feita em meio RPMI sem soro. Logo após, o Dynasore

foi removido por 3 lavagens sucessivas e a cultura estimulada em meio RPMI contendo SFB.

### **3.5. Neutralização dos Receptores Scavenger**

Os macrófagos foram estimulados exclusivamente por LPS (1 µg/mL) ou em associação com um dos seguintes reagentes neutralizantes dos Receptores Scavenger (SR): Dextran sulfato de sódio de *Leuconostoc* ssp. (DSS, m.m. 500.000, SigmaAldrich) ou anticorpo neutralizante anti-SR-AI/MSR de camundongo (R&D Systems). O DSS foi utilizado em diferentes concentrações e adicionado à cultura juntamente com LPS, durante o mesmo período de tempo. Em outro caso, os macrófagos foram neutralizados previamente com anticorpo anti-SR-AI/MSR por 2 h, logo após o anticorpo foi removido e adicionou-se LPS (1 µg/mL) por períodos de tempo determinados.

### **3.6. Quantificação da produção de NO por macrófagos**

O NO foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) resultante da sua oxidação no sobrenadante da cultura de macrófagos utilizando a reação colorimétrica de *Griess*. Para isso, 50 µL do reagente de *Griess* (solução 1:1 de 1% de sulfanilamida em 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ácido fosfórico) e 0,1% de cloreto de N-(1-naftil)-etileno-diamina (NED) em 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> preparado no momento do uso) foram adicionados a 50 µL do sobrenadante da cultura de macrófagos. Após 5 minutos da adição do reagente de *Griess* a absorbância foi medida em 540 nm utilizando o espectrofotômetro (SPECTRAMax 340, Molecular Devices). A curva padrão de concentração de nitrito foi feita com nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) diluído em meio RPMI em concentrações variando de 1,56 a 200 µM.

### **3.7. Extrato proteico total e Western Blot**

As células para extrato proteico total foram cultivadas em placas de 24 poços (3x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>5</sup> ou 1x10<sup>6</sup> células/poço) e estimuladas com LPS (1µg/mL) e/ou rIFN-β por tempos determinados, de acordo com os experimentos. Após a retirada dos sobrenadantes, macrófagos aderidos foram lisados diretamente na placa com 40 µL de tampão de lise (50



mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM  $\beta$ glycerophosphate, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100) suplementado com um *mix* de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich) e inibidores de fosfatases PhosSTOP (Roche) . Os lisados celulares foram transferidos para tubos de 1,5 mL e incubados no gelo por 30 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 10 minuto (4°C) e os sobrenadantes (extratos proteicos) estocados a -20°C até o momento do uso. Os extratos proteicos totais foram quantificados utilizando o reagente para dosagem de proteína e o método de Bradford modificado para microplacas (Bio-Rad) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os extratos proteicos totais (em média 40  $\mu$ g) foram aplicados com tampão de amostra (1% SDS, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 20% glicerol, 1 mM EDTA e 0,05% de azul de bromofenol) em gel de SDS-PAGE e submetidos a eletroforese 100 V. As proteínas fracionadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) ou PVDF Amersham Hybond-LFP (GE Healthcare) com amperagem constante de 300 mA por 2 h em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% v/v metanol) gelado e sistema refrigerado. Após a transferência, as membranas foram incubadas em tampão de bloqueio (TBS contendo 5% de leite em pó desnatado) por 2 h à temperatura ambiente sob agitação ou por 18 h a 4°C. A seguir, elas foram incubadas por 18 h a 4°C sob agitação ou por 2 h à temperatura ambiente, com os anticorpos primários diluídos em tampão para anticorpo (TBS contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de albumina bovina). Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo policlonal de coelho anti-iNOS de macrófago murino (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:5000 e monoclonais produzidos em coelho anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , anti-fosfo-p65 NF $\kappa$ B (Ser536), anti-STAT-1 total, anti-fosfo-STAT-1 (Y701), anti-IRF-3 (D83B9), antifosfo-IRF-3 (Ser396) (4D4G) e anti- $\beta$ -actina de camundongo (Cell Signaling) na diluição de 1:1000. As membranas foram então lavadas com TBS-Tween 20 0,1% e incubadas por 1 h à temperatura ambiente e sob agitação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (KPL) diluído em tampão para anticorpo. Para a revelação foi utilizado o reagente Luminata Forte Western HPR Substrate (Merck-Millipore) conforme as recomendações do fabricante e a luminescência captada utilizando Amersham Hyperfilm MP (GE Healthcare) ou Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak). A densitometria das bandas visualizadas foi realizada utilizando o programa ImageJ 1.44p (NIH).

### 3.8. Extração de RNA e *Real Time* PCR

O RNA total foi extraído de células cultivadas em placas de 24 poços ( $5 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  células/poço) e estimuladas com LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) e/ou rIFN- $\beta$  por tempos determinados, de acordo com os experimentos. Após a retirada dos sobrenadantes, macrófagos aderidos foram lisados diretamente na placa com 200  $\mu\text{L}$  de Trizol (Invitrogen) para cada poço, sendo esta mistura recolhida em tubos de 1,5 mL. Em cada amostra foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (Merck-Millipore), centrifugados a 1200 rpm por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , e a fase superior aquosa transferida para um novo tubo de 1,5 mL, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol 100% (Merck-Millipore) e misturado por inversão. Logo após, foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugados a 1200 rpm por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , o *pellet* foi lavado com etanol 75% e ressuspenso em 60  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (livre de nucleases). O RNA extraído com Trizol foi tratado com DNase (Promega), para eliminar possíveis contaminações com DNA, e quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

O cDNA foi produzido a partir de 300 a 500 ng de RNA total com *illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads* (GE Healthcare) ou com o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), seguindo as recomendações dos fabricantes. O cDNA obtido foi diluído 1:10 em água ultrapura e utilizado como molde para o *Real Time* PCR.

O *Real Time* PCR foi realizado em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , contendo SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), 2  $\mu\text{M}$  de cada *primer* e oligo-dT-cDNA. A reação ocorreu no aparelho 7500 v.2.0.6 Real Time PCR System (Life Technologies), seguindo os seguintes parâmetros de ciclos:  $50^\circ\text{C}$  por 2 min,  $95^\circ\text{C}$  por 10 min, 40 ciclos de  $95^\circ\text{C}$  por 15 segundos cada,  $60^\circ\text{C}$  por 1 min, e o estágio de dissociação de  $95^\circ\text{C}$  por 15 segundos,  $60^\circ\text{C}$  por 1 min,  $95^\circ\text{C}$  por 30 segundos e  $60^\circ\text{C}$  por 15 segundos. Os *primers* utilizados para amplificar os fragmentos específicos correspondentes a um único gene foram: IFN $\beta$  - F: AGCTCCAAGAAAGGACGAACAT, R: GCCCTGTAGGTGAGGTTGATCT (*Oliveira et al., 2014*); IRF-1 - F: CGGAGCTGGCCATTCACAC, R: GTACACCCGCACAGCAGAGC;  $\beta$ -actin - F: AGGTGTGCACCTTTTATTGGTCTCAA, R: TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT (*Oliveira et al., 2014*).

O *primer* para IRF-1 foi desenhado com o auxílio das ferramentas Primer-Blast disponível no site da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design (<http://www.genscript.com/sslhttp://www.genscript.com/sslbin/app/primerbin/app/primer>), sendo posteriormente analisados com o auxílio de OligoAnalyzer 3.1 da IDT (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>). Os *primers* foram avaliados e apresentaram eficiência na faixa de 90-100%. Para a determinação do nível de expressão do mRNA foi utilizado o método do  $\Delta C_t$  relativo ( $C_t$  - do inglês *threshold cycle*) utilizando a  $\beta$ actina como normalizador endógeno e como referência a amostra obtida dos macrófagos de C57BL/6 sem estímulo.

### **3.9. Análise Estatística**

Os resultados apresentados neste trabalho são representativos ou a média de pelo menos três experimentos independentes e reprodutíveis. As análises foram feitas por meio do teste *t* de Student, utilizando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc). O nível de significância adotado nas análises foi  $p < 0,05$ .

*Requerimento de receptores scavenger na sinalização via TLR4 para a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS: papel na ativação de IRF-3 e STAT-1*

#### ***4. Resultados***

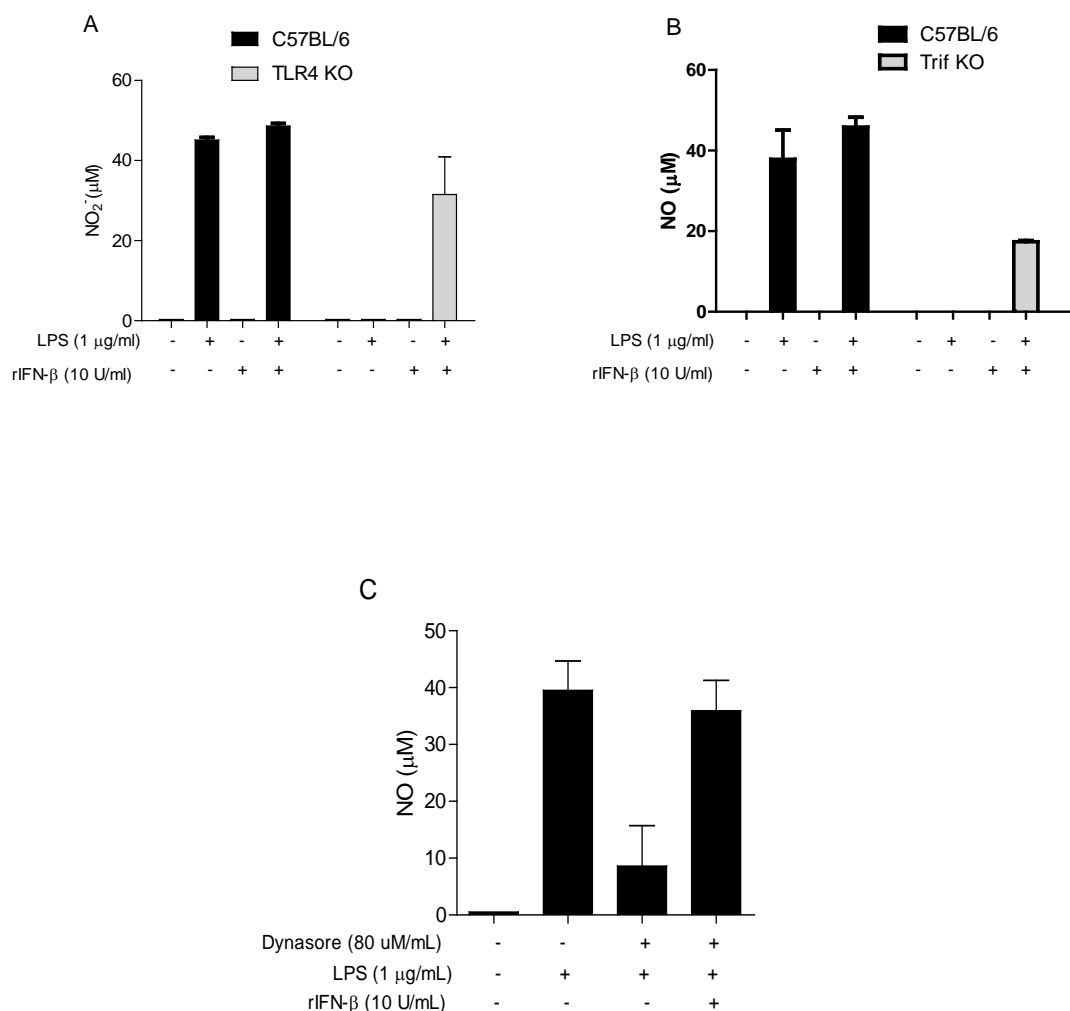
## 4. RESULTADOS

### 4.1. A produção de NO induzida por LPS ocorre na ausência de TLR-4, desde que rIFN- $\beta$ seja fornecido aos macrófagos

A indução de STAT-1 mediada por IFN- $\beta$  via TLR4 já está bem documentada como sendo essencial para a expressão plena de iNOS em macrófagos e, conseqüentemente, para ampla produção de NO após estímulo por LPS via TLR4 (Gao *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2013; Weinstein *et al.*, 2000). No entanto, não existem relatos mostrando que a estimulação única de TLR4 por LPS é suficiente para os macrófagos produzirem NO. Nós utilizamos camundongos TLR4 KO para investigar a contribuição real do TLR4 na produção de NO induzido por LPS em macrófagos. Como esperado, macrófagos de camundongos TLR4 KO não produzem NO quando estimulados por LPS (Fig. 5A). O mesmo acontece com macrófagos TRIF KO (Fig. 5B), reforçando o fato de que a via TLR4-TRIF é responsável pela produção de IFN- $\beta$  e conseqüentemente de óxido nítrico. Surpreendentemente, a adição de rIFN- $\beta$  à cultura de macrófagos TLR4 KO e TRIF KO estimulados com LPS restaurou a capacidade destas células de produzir NO. Como nós podemos notar, rIFN- $\beta$  sozinho é incapaz de estimular a produção de NO tanto em camundongos WT quanto em TLR4 KO e TRIF KO (Fig. 5A e B). Estes resultados mostram que, em macrófagos de camundongos, o estímulo de LPS pode suplantar a via dependente de TLR4 para a produção de NO, desde que seja fornecido rIFN- $\beta$ . Isto indica que LPS liga-se a receptores diferentes do TLR4, que parecem ativar todos os componentes necessários para produção da iNOS, à exceção do IFN- $\beta$ . Além disso, estes resultados demonstram que o principal papel do TLR4 é produzir IFN- $\beta$  e que camundongos deficientes em TLR4 mantém o restante da maquinaria necessária para a transcrição da iNOS.

É sabido que a produção de IFN- $\beta$  estimulada por LPS requer a endocitose do complexo LPS/TLR4/MD2, que é essencial para induzir a via TRIF responsável pela ativação de IRF-3, fator de transcrição necessário para a síntese de IFN- $\beta$  (Fitzgerald *et al.*, 2003; Günel, 2012). Assim, o pré-tratamento de macrófagos WT com Dynasore, que inibe a endocitose de TLR4 dependente de dinamina, reduz drasticamente (Fig. 5C) ou totalmente (experimentos não mostrados) a produção de NO por macrófagos estimulados com LPS. Esta inibição é plenamente restaurada pela adição de IFN- $\beta$  à cultura (Fig. 5C). Esses resultados confirmam que a endocitose de TLR4 é essencial

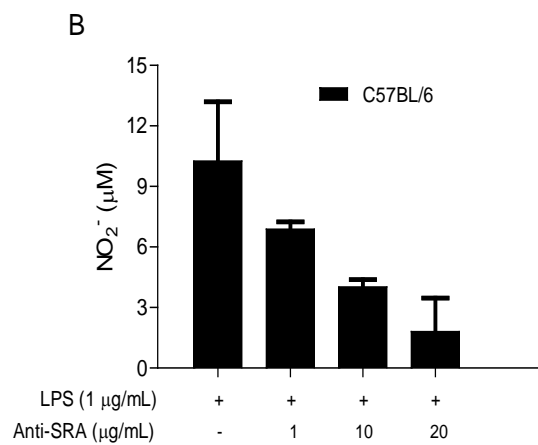
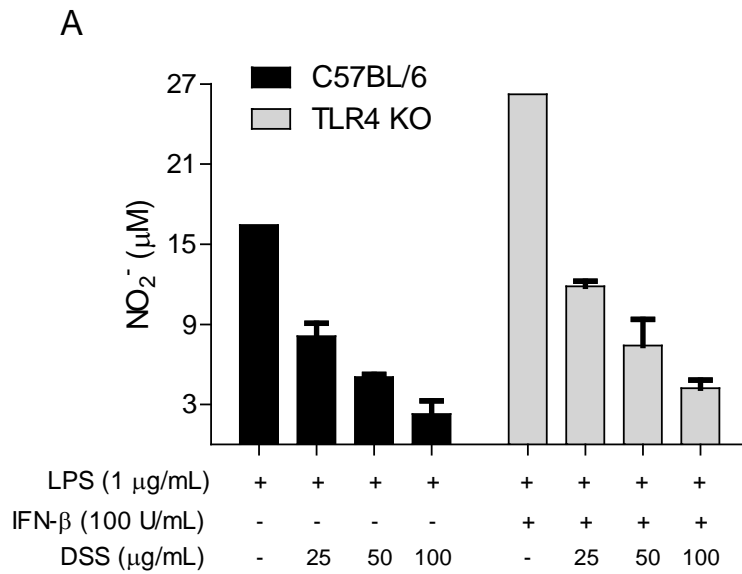
para a produção de NO induzida por LPS via IFN- $\beta$ , além de reforçar a existência de um ou mais receptores que respondem ao LPS, diferentes de TLR4 e independentes de dinamina, que atuam em conjunto com TLR4 para produção de NO.



**Figura 5. A importância do IFN- $\beta$  e da endocitose na produção de NO via TLR4 estimulado por LPS.** Macrófagos peritoneais ( $1 \times 10^5$ ) de C57BL/6 WT, TLR4 KO (A) e Trif KO (B) estimulados por 48h com 1  $\mu$ g/mL LPS na presença ou ausência de 10 U/ml IFN- $\beta$  recombinante (rIFN- $\beta$ ). Macrófagos peritoneais ( $1 \times 10^5$ ) de C57BL/6 pré-tratados por 30 min a 37° C com 80  $\mu$ M/ml Dynasore e depois estimulados por 48h com 1  $\mu$ g/mL LPS e/ou 10 U/ml IFN- $\beta$  (C). Os sobrenadantes das culturas celulares foram analisados para a concentração de NO<sub>2</sub> usando a reação de Griess, como descrito no Material e Métodos. Os valores correspondem à média e desvio padrão entre pelo menos três experimentos independentes e reprodutíveis.

#### **4.2. Inibição dos Receptores Scavenger (SR) impede a produção de NO induzido por LPS**

Os Receptores Scavenger contribuem para o reconhecimento e a remoção de microrganismos, agindo em associação com TLR4, para modular a resposta inflamatória dos macrófagos estimulados por LPS em altas concentrações (Chen *et al.*, 2010; Peiser *et al.*, 2002). Para verificar se SR são os receptores envolvidos na produção de NO em macrófagos estimulados por LPS via TLR4, nós utilizamos DSS, inibidor ligante de receptores scavenger classe A (SR-A) e possivelmente outros SRs (Peiser and Gordon, 2001), ou um anticorpo neutralizante específico anti-SR-AI/MSR em macrófagos estimulados por LPS. Os resultados indicam que DSS (Fig. 6A) inibe a produção de NO de maneira dose dependente tanto em macrófagos de camundongos WT quanto em TLR4 KO (acrescidos de IFN- $\beta$ ) e o mesmo acontece com anti-SR-AI em camundongos WT (Fig. 6B). Estes resultados confirmam que SR-AI e possivelmente outros SR são essenciais para a produção completa de NO induzida por LPS em macrófagos.

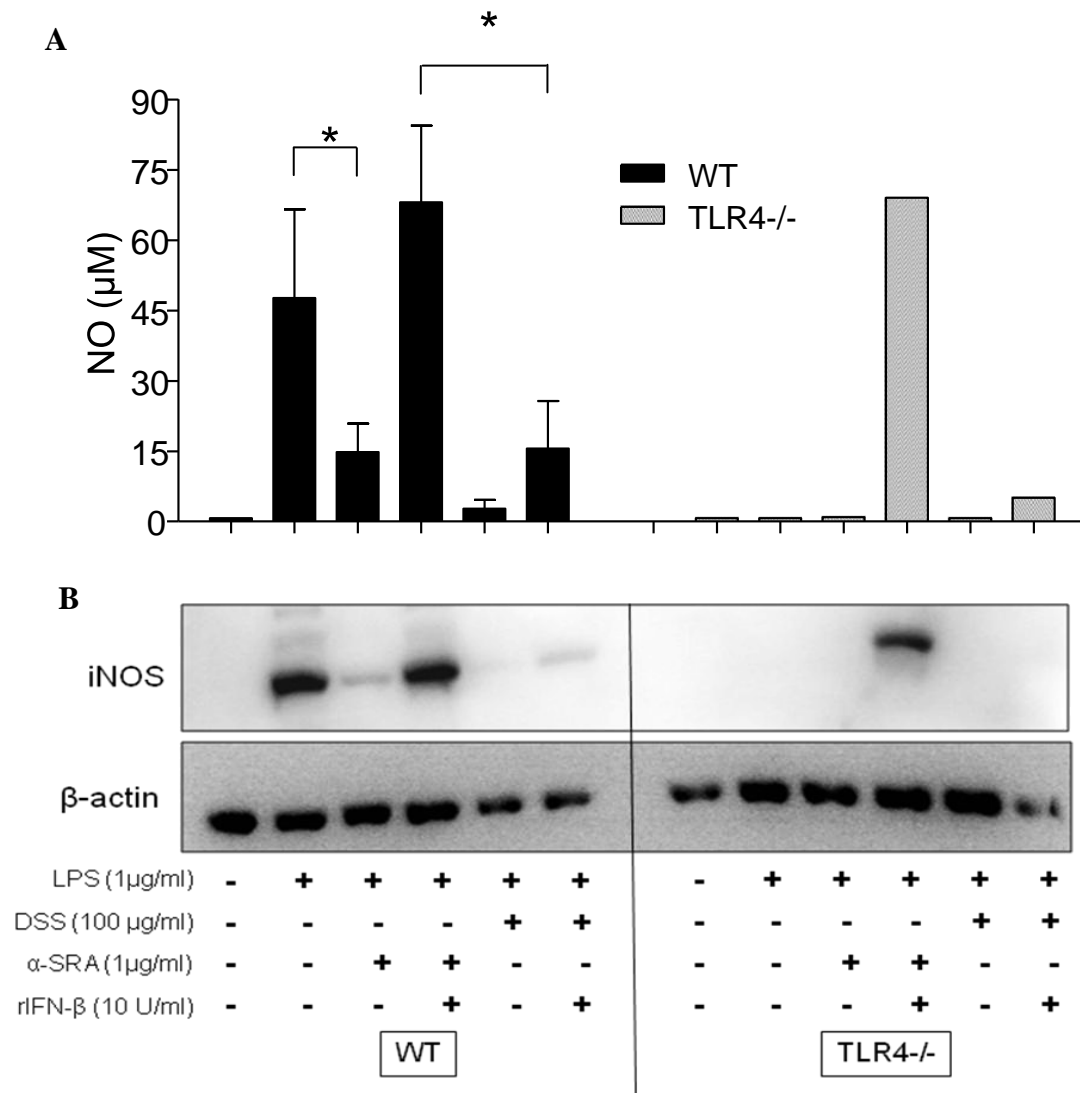


**Figura 6. Associação dos receptores Scavenger ao TLR4 para produção de NO estimulado por LPS.** Macrófagos peritoneais ( $1 \times 10^5$ ) de C57BL/6 WT e TLR4 KO estimulados por 48h com 1 µg/mL LPS e/ou 10 U/ml IFN-β recombinante (rIFN-β) na presença ou ausência de DSS em suas variadas concentrações indicadas no gráfico (A). Macrófagos peritoneais ( $1 \times 10^5$ ) de C57BL/6 inibidos por 2h com diferentes concentrações do anticorpo neutralizante de camundongo anti-SR-AI/MSR e depois estimulados por 48h com 1 µg/mL LPS e/ou 10 U/ml IFN-β (B). Os sobrenadantes das culturas celulares foram analisados para a concentração de NO<sub>2</sub> usando a reação de Griess, como descrito no Material e Métodos. Os valores correspondem à média e desvio padrão das triplicatas dos poços e os dados são representativos de experimentos independentes.



### **4.3. A produção de NO e a expressão de iNOS inibidas por anti-SR-AI, mas não por DSS, são totalmente restauradas pela adição de IFN- $\beta$ exógeno**

Uma vez que a produção de IFN- $\beta$ , crucial para a síntese de NO pela ativação de STAT-1, é fornecido através da indução da via TLR4/TRIF dependente da endocitose do complexo LPS/TLR4/CD14, e que os SRs são candidatos à mediação da internalização de LPS (Hampton *et al.*, 1991; Haworth *et al.*, 1997; Mukhopadhyay *et al.*, 2011; Vishnyakova *et al.*, 2003), nós decidimos investigar se a participação dos SRs na ativação de NO estava ocorrendo pela indução da produção de IFN- $\beta$ . Para confirmar esta hipótese, nós decidimos avaliar se as inibições da produção de NO por meio dos dois tipos de ligantes de SR são consequência da diminuição na produção de IFN- $\beta$ . Para isto, buscamos restaurar a produção de NO suplementando a cultura destas células (inibidas por DSS ou anti-SR-AI) com rIFN- $\beta$ . Nós observamos que a adição de rIFN- $\beta$  aos macrófagos, que tiveram SR-AI inibido com anticorpo antes do estímulo por LPS, conseguiu reestabelecer completamente a capacidade destas células de produzir NO tanto em WT quanto em TLR4 KO (Fig. 7A), indicando que SR-AI é essencial e age em conjunto com TLR4 para a produção de IFN- $\beta$  induzido por LPS. No entanto, macrófagos que tiveram SR inibido por DSS são incapazes de recuperar completamente sua capacidade de produzir NO quando suplementados com rIFN- $\beta$ , mesmo em células WT, onde TLR4 está completamente ativo (Fig. 7A). Estes resultados demonstram que SR, em geral, são essenciais para a produção de um ou mais elementos além do IFN- $\beta$ , enquanto SR-AI é especificamente importante na síntese dessa citocina. Eles também corroboram com os resultados anteriores, que mostraram que o papel primordial da indução de LPS via TLR4 na produção de NO é fornecer IFN- $\beta$  e, conseqüentemente, ativar STAT-1, fator requerido para transcrição da iNOS. Efeitos idênticos são observados na expressão da iNOS por *Western blot* de extratos proteicos totais extraídos destas mesmas células, identificada por anticorpo específico anti-iNOS, indicando que os resultados observados na produção de NO são consequência dos efeitos na expressão da iNOS (Fig. 7B).

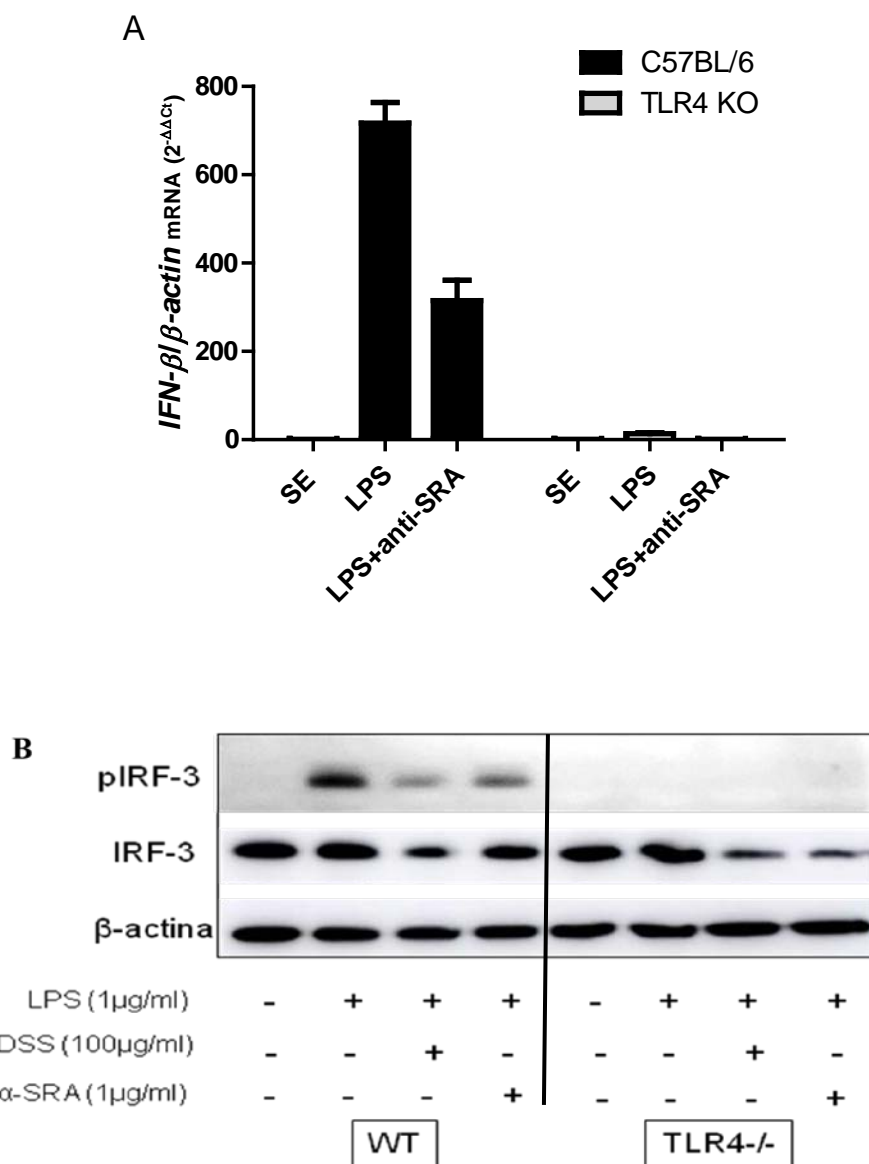


**Figura 7. Scavenger Receptor e TLR4 agem em conjunto para ativar a expressão de iNOS e consequente a produção de NO.** Macrófagos peritoneais de C57BL/6 WT e TLR4 KO estimulados com 1 µg/mL LPS e/ou 10 U/ml IFN-β recombinante (rIFN-β) na presença ou ausência de 100 µg/ml DSS ou 1 µg/ml anti-SR-AI/MSR neutralizante. Os sobrenadantes das culturas de macrófagos ( $1 \times 10^5$ ) estimulados por 48h foram analisados para a concentração de  $\text{NO}_2$  usando a reação de Griess, como descrito no Material e Métodos (A). Extratos de proteínas totais de macrófagos ( $1 \times 10^6$ ) estimulados por 24h foram analisados por *Western blot* usando os anticorpos específicos anti-iNOS e anti-βactina (B). Os valores correspondem à média e desvio padrão entre pelo menos três experimentos independentes e reprodutíveis (A) ou são dados representativos de experimentos independentes (B).

#### 4.4. Inibição de SR-AI diminui a ativação de IRF-3 e a produção de IFN- $\beta$

Para confirmar se SR-AI é requerido na expressão de IFN- $\beta$  em macrófagos estimulados por LPS, as células foram tratadas com anticorpo neutralizante anti-SR-AI antes de serem estimuladas com LPS e a expressão de IFN- $\beta$  foi avaliada por real time PCR. Como mostrado na figura 8 A, a neutralização de SR-AI inibe severamente a expressão de IFN- $\beta$ . A utilização de DSS seria interessante para confirmar se outros SR interferem também na síntese de IFN- $\beta$ , mas já está bem documentado (Kerr *et al.*, 2012; Viennois *et al.*, 2013) e confirmado no presente trabalho que o DSS inibe a transcriptase reversa e a *Taq* polimerase, impedindo assim a amplificação por *Real Time* PCR. Como esperado, camundongos TLR4 KO expressam níveis insignificantes de mRNA de IFN- $\beta$  quando estimulados por LPS, sendo que nenhum vestígio de mRNA é detectado após neutralização do SR-AI.

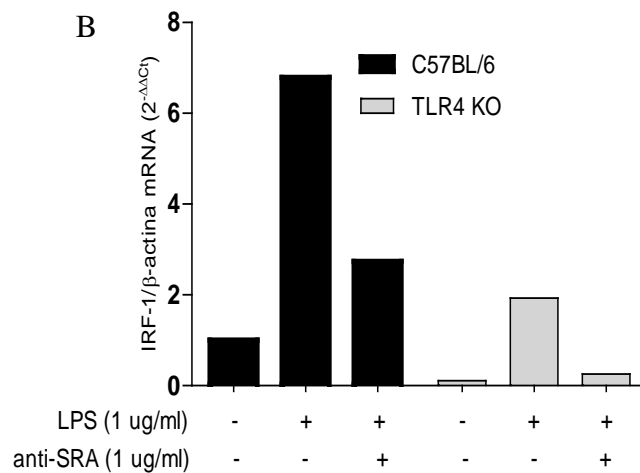
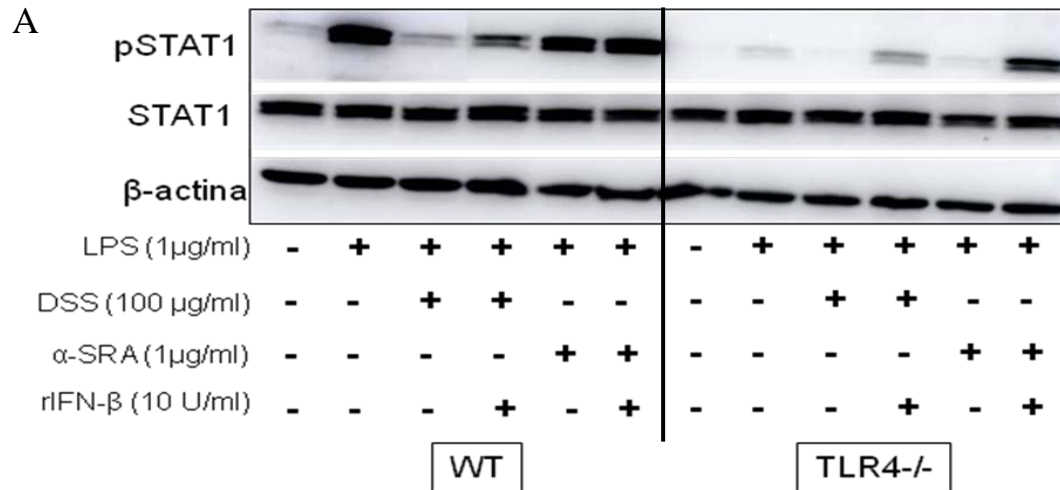
Para verificar como o SR-AI estaria envolvido na produção de IFN- $\beta$ , nós investigamos se esse receptor estaria dirigindo a transcrição do IFN- $\beta$ . Uma vez que o IRF-3 é essencial para a transcrição do IFN- $\beta$ , nós observamos que a neutralização do SR-AI inibiu consideravelmente a ativação do IRF-3, como verificado por *Western blot* utilizando anticorpo específico anti-fosfo-IRF-3 (Fig. 8 B). DSS, um ligante para SR de mais amplo espectro, também inibe a ativação de IRF3. Como esperado, macrófagos de camundongos TLR4 KO não fosforilam IRF-3 e expressam níveis negligíveis de mRNA de IFN- $\beta$  quando estimulados com LPS e nenhum traço de mRNA quando SR-AI é neutralizado. Esses resultados confirmam que, de fato, esses eventos são totalmente dependents de TLR4, mostrando que o TLR4 é necessário, mas não suficiente para a ativação de IRF-3 e, conseqüentemente para a transcrição de IFN- $\beta$ , requerendo a participação de SR-AI.



**Figura 8. Scavenger Receptor inibe a produção de IFN-β por diminuir a ativação de IRF-3.** Macrófagos peritoneais de C57BL/6 WT e TLR4 KO estimulados por 1h com 1 μg/mL LPS e/ou 10 U/ml IFN-β recombinante (rIFN-β) na presença ou ausência de 100 μg/ml DSS ou 1 μg/ml anti-SR-AI/MSR neutralizante. (A) Quantificação relativa de mRNA de IFN-β por *Real Time* PCR utilizando RNA total extraído de macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^6$  células). Utilizamos SYBR Green como fluorescência, mRNA de β-actina como normalizador e o método de  $\Delta C_t$  relativo para comparação entre as amostras de cada linhagem celular. Os dados de *Real Time* PCR representam experimento único. (B) Extratos de proteínas totais de macrófagos ( $1 \times 10^6$ ) foram analisados por *Western blot* utilizando anticorpos específicos anti-pIRF-3, anti-IRF-3 e anti-βactina. O resultado de WB é representativo de experimentos independentes.

#### 4.5. Inibição de SR diminui a ativação de STAT-1 e a expressão de IRF-1

STAT-1 e IRF-1 são fatores de transcrição fundamentais para a síntese de iNOS, sendo que STAT-1 é também essencial para a transcrição de IRF-1. Portanto, decidimos avaliar se a inibição de SRs interferiria na ativação e/ou síntese desses fatores de transcrição (STAT-1 e IRF-1), alterando assim a síntese de IFN $\beta$  e a produção da iNOS. Nós verificamos por *Western blot* que, tanto o DSS como o anticorpo neutralizante anti-SR-AI, inibem a fosforilação de STAT-1 (Fig. 9 A) e anti-SR-AI inibi a síntese de IRF-1 (Fig. 9 B) induzidas por LPS, mesmo em camundongos TLR4 KO, nos quais a ativação de STAT-1 e a síntese de IRF-1 são bem menores. Esses resultados eram esperados uma vez que inibindo a transcrição de IFN $\beta$ , se inibiria também a fosforilação de STAT-1 e, conseqüentemente, a expressão de IRF-1. Contudo, a adição de IFN $\beta$  exógeno, restaura a ativação de STAT-1 inibida pelo anticorpo específico anti-SR-AI, mas não a ativação de STAT-1 inibida por DSS. A restauração da ativação de STAT-1 por IFN $\beta$  exógeno em macrófagos que tiveram o SR-AI inibido, também foi resultado esperado, uma vez que havíamos verificado que o SR-AI é importante na transcrição de IFN $\beta$  e que, portanto, se o IFN $\beta$  fosse fornecido às células, STAT-1 seria ativado. No entanto, foi surpreendente verificar que STAT-1 não era ativado por IFN $\beta$  em células cujos SRs foram inibidos com DSS. Esses resultados demonstram que outro(s) SR(s) diferente(s) do SR-AI é(são) importante(s) na transcrição de iNOS por participar da sinalização induzida pelo receptor de IFN $\beta$  em uma etapa posterior à estimulação do seu receptor. Podemos concluir que a inibição de SR diminui a ativação de STAT-1 e a expressão de IRF-1, sendo que a inibição da ativação de STAT-1 por anti-SR-AI, mas não por DSS, é restaurada pela adição de IFN $\beta$  exógeno.



**Figura 9. Scavenger Receptor diminui a expressão de IRF-1 e a ativação de STAT1.** Macrófagos peritoneais de C57BL/6 WT e TLR4 KO estimulados com 1 μg/mL LPS e/ou 10 U/ml IFN-β recombinante (rIFN-β) na presença ou ausência de 100 μg/ml DSS ou 1 μg/ml anti-SRA neutralizante. (A) Extratos de proteínas totais de macrófagos (1x10<sup>6</sup>) estimulados por 24h foram analisados por *Western blot* usando os anticorpos específicos anti-pSTAT1, anti-STAT1 e anti-βactina. Os valores são dados representativos de experimentos independentes. (B) Quantificação relativa de mRNA de IRF-1 por *Real Time* PCR utilizando RNA total extraído de macrófagos peritoneais (5x10<sup>6</sup> células) estimulados por 1h. O SYBR Green foi utilizado como fluorescência e o método de  $\Delta\Delta C_t$  relativo. O mRNA de β-actina foi utilizado como normalizador e a amostra C57BL/6 não estimulado como referência. Os dados representam experimento único.

***Requerimento de receptores scavenger na sinalização via TLR4 para a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS: papel na ativação de IRF-3 e STAT-1***

***5. Discussão***

## 5. DISCUSSÃO

A interação patógeno-hospedeiro demonstra que a imunidade inata co-evoluiu com os microrganismos, agindo de forma coordenada para a identificação do que é próprio e dos agentes patogênicos ao organismo, permitindo a manutenção do equilíbrio fisiológico (Janeway & Medzhitov, 2002). Os macrófagos contribuem para o início dos processos inflamatórios nos tecidos e são cruciais para a resolução da inflamação (Zanoni & Granucci, 2010). O macrófago reconhece o patógeno e desencadeia uma série de eventos que incluem: ligação do patógeno a receptores, invaginação da membrana da célula hospedeira ao redor do patógeno levando à formação do fagossomo, separação do fagossomo e sua maturação ao longo da via endocítica/fagocítica, resultando na fusão com o lisossomo, degradação do patógeno nos lisossomos pela ação combinada de proteases ácidas e processos como geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Sundaramurthy & Pieters, 2007). O reconhecimento de produtos microbianos por TLRs e outros PRRs estimula a ativação de mecanismos microbicidas em macrófagos, aumentando assim a capacidade destas células em matar os microrganismos fagocitados (Buzzo *et al.*, 2010; Cole *et al.*, 2012; Motoyama *et al.*, 2009).

O NO e as espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) são alguns desses mecanismos microbicidas, sendo que a variedade de espécies químicas geradas a partir deles fornece elementos que podem auxiliar o sistema imune no combate aos patógenos por sua atuação sobre cascatas de sinalização e diversos fatores de transcrição (Bogdan, 2001; Wink *et al.*, 2011). Em macrófagos, o papel antimicrobiano do NO é o mais evidente mecanismo de morte ou inibição para um grande número de microrganismos, seja por seus efeitos diretos ou indiretos, agindo na defesa contra uma vasta gama de organismos infecciosos, incluindo *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium SP*, *Schistosoma mansoni*, *Salmonella* e *Escherichia coli* (Gao, 2010; Gutierrez *et al.*, 2009; Mukbel *et al.*, 2007; Nairz *et al.*, 2013; Santos, 1997; Vareille *et al.*, 2007).

O sucesso da resposta imune contra infecções bacterianas depende da capacidade de suas células de detectar e reagir às endotoxinas, mas também de controlar e limitar a resposta inflamatória, para que esta não seja exacerbada resultando em danos ao organismo do hospedeiro (Munford, 2005). O lipídeo A é o PAMP conservado do LPS,



que permite o reconhecimento das bactérias gram-negativas ou do LPS molecular livre no plasma pelo sistema imune inato. O principal PRR que reconhece o LPS é o TLR4 e isto é feito através de um mecanismo que envolve o complexo TLR4/MD2/CD14 (Kawai & Akira, 2009; Kim *et al.*, 2007). Assim, uma questão que nos intrigou foi saber se a estimulação única de TLR4 por LPS seria suficiente para que estas células produzissem NO.

Os macrófagos peritoneais de camundongos TLR4 KO foram utilizados em comparação com os de C57BL/6, para que pudéssemos avaliar a real contribuição do TLR4 na produção de NO após estimulação *in vitro* destas células com LPS. Como esperado, por já ser definido que o TLR4 é o receptor que medeia a produção de NO em macrófagos estimulados por LPS, macrófagos TLR4 KO foram incapazes de produzir NO quando estimulados por LPS (Fig. 5A). Já foi demonstrado também que a indução do gene da iNOS e consequente produção de NO induzida por LPS como único estímulo em macrófagos murinos é dependente da síntese de IFN- $\alpha/\beta$ , estimulado pela sinalização via TLR4 (Fujihara *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que a maior produção de IFN- $\beta$  nos macrófagos de C57BL/6 é o principal fator responsável pela produção excedente de NO por estes macrófagos quando comparados aos de BALB/c (Oliveira *et al.*, 2014). Um resultado que nos surpreendeu, no entanto, foi o fato do rIFN- $\beta$  adicionado à cultura de macrófagos TLR4 KO estimulados com LPS ter sido capaz de restaurar completamente a capacidade destas células para produzir NO (Fig. 5A). Este efeito não poderia ser exclusivo do rIFN- $\beta$ , visto que esta citocina sozinha se mostrou incapaz de estimular a produção de NO tanto em camundongos WT quanto em TLR4 KO. Isto indica que LPS ativa algum outro receptor diferente do TLR4, que parece ativar todos os componentes necessários para produção da iNOS, à exceção do IFN- $\beta$ . Esses resultados também confirmam que o principal papel do TLR4 é produzir IFN- $\beta$  e que camundongos deficientes em TLR4 mantêm o restante da maquinaria necessária para a transcrição da iNOS, exceto a via de síntese do IFN- $\beta$ .

O TLR4 é a principal molécula de reconhecimento que inicia a resposta imune ao LPS. Estudos com moléculas marcadas fluorescentemente comprovaram a hipótese de que a sinalização de LPS inicia com o *cross-linking* e a formação de um complexo entre TLR4 e MD2, que é suficiente para o início da transdução de sinal ao recrutar MyD88 para o seu domínio TIR da superfície celular, iniciando a sinalização sem necessitar de endocitose, até a ativação de NF- $\kappa$ B (Latz *et al.*, 2002). No entanto, a indução da via TRIF

responsável pela ativação de IRF-3, fator de transcrição necessário para a síntese de IFN- $\beta$ , requer a endocitose do complexo LPS/TLR4/MD2 (Fitzgerald *et al.*, 2003; Günel, 2012). Isto foi mostrado com o pré-tratamento dos macrófagos WT com Dynasore, potente inibidor da endocitose de TLR4 dependente de dinamina. Dynasore exerceu um efeito de redução drástica na produção de NO em macrófagos estimulados com LPS, sendo que este efeito foi totalmente restaurado pela adição de IFN- $\beta$  à cultura (Fig. 5C). Esses resultados confirmaram que a endocitose de TLR4 é essencial para a produção de NO induzida por LPS via IFN- $\beta$  e reforçaram a existência de um ou mais receptores que respondem ao LPS juntamente com o TLR4 para produção de NO, mas independentemente de endocitose mediada por dinamina.

Algumas pesquisas com TLR4 KO revelaram que o verdadeiro envolvimento do TLR4 com LPS está na ativação da sinalização e que estes receptores não influenciam nos mecanismos de captura do LPS. O processo de recrutamento do LPS ocorre predominantemente via CD14, sendo que em células deficientes em CD14 os SRs se destacam para executar esta função (Dunzendorfer *et al.*, 2004). Recentemente, foi demonstrado que a ligação e internalização de altas concentrações de LPS são mediadas por SR do tipo A (SR-A), contando com a participação de CD14, mas sem requerer TLR4 (Czerkies *et al.*, 2013). Os SRs contribuem para o reconhecimento e a remoção de microrganismos, agindo em associação com TLR4, para modular a resposta inflamatória dos macrófagos estimulados por LPS em altas concentrações (Chen *et al.*, 2010; Peiser *et al.*, 2002). Camundongos deficientes em SR-A mostraram maior susceptibilidade a infecções por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sordellii*, herpes vírus entre outros (Suzuki *et al.*, 1997; Thelen *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2000). Portanto, foi natural questionar se os SR seriam os receptores que participavam com o TLR4 na produção de NO em macrófagos estimulados por LPS. Para confirmar esta hipótese, nós realizamos a inibição de SRs utilizando anticorpo neutralizante específico anti-SR-AI/MSR em macrófagos estimulados com LPS ou então DSS, inibidor ligante de receptores scavenger classe A (SR-A) e possivelmente outros SRs (Peiser and Gordon, 2001). Desta maneira, pudemos avaliar que, tanto DSS (Fig. 6A) em macrófagos de camundongos WT e em TLR4 KO (acrescidos de IFN- $\beta$ ) quanto anti-SR-AI em camundongos WT (Fig. 6B) foram capazes de inibir a produção de NO de maneira dose dependente. Estes resultados confirmaram que SR-AI e possivelmente outros SR são essenciais para a produção de NO induzida por LPS em macrófagos.

Os SRs são amplamente expressos em macrófagos e atuam como PRRs no reconhecimento de patógenos e co-receptores dos TLRs (Peiser *et al.*, 2002). A grande concentração dos estudos sobre estes receptores está no papel que eles exercem na aterosclerose. No entanto, várias pesquisas vêm acumulando informações sobre as funções dos SRs na imunidade inata e a regulação de macrófagos durante a inflamação, que podem incluir endocitose e apresentação de antígenos, adesão celular, fagocitose e reconhecimento de padrão molecular (Canton *et al.*, 2013; Hampton *et al.*, 1991; Haworth *et al.*, 1997; Peiser & Gordon, 2001). A regulação e a sinalização do SR-A durante a inflamação, assim como a maioria dos estudos utilizando ligantes comuns aos SRs, ainda estão pouco claros e muitas vezes apresentam informações conflitantes. Estudos *in vivo* e *in vitro* que avaliaram as respostas induzidas por LPS em animais SR-A KO trazem resultados complexos e inconsistentes. Alguns destes estudos sugerem uma função protetora para SR-A contra respostas pró-inflamatórias excessivas ao LPS, demonstrando maior produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6 e MIP2 em macrófagos e células dendríticas de camundongos SR-A KO (Becker *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010; Haworth *et al.*, 1997; Józefowski *et al.*, 2005; Mukhopadhyay *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011) e o aumento da susceptibilidade a choques sépticos (Haworth *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2011). Em contraste, outros estudos revelaram que a ausência de SR-A protege os camundongos do choque séptico (Drummond *et al.*, 2013; Kobayashi *et al.*, 2000), porque este receptor é requerido na indução de mediadores inflamatórios por LPS, tais como IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO (Drummond *et al.*, 2013; Collier *et al.*, 2001; Czerkies *et al.*, 2013; Fulton *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2000; Matsuno *et al.*, 1997). As discrepâncias entre os resultados podem estar relacionadas às diferentes linhagens genéticas de camundongos utilizadas (Fulton *et al.*, 2006), a interação entre estímulos diferentes (ex: LPS, fucoidan, Poli I:C e IFN- $\gamma$ ) (Godoy *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012), além do tipo celular envolvido no estudo (Godoy *et al.*, 2012; Czerkies *et al.*, 2013; Moore & Tabas, 2011).

Godoy e colaboradores (2012) analisaram a presença e o papel do SR em astrócitos, células fundamentais para a resposta imune no sistema nervoso central, e descobriram que alguns estímulos como LPS + IFN $\gamma$  ou Poli I:C, foram capazes de ativar a sinalização de ERK (cinase regulada por sinal extracelular), JNK (c-Jun N-terminal cinase), IL-1 $\beta$  e NO, o que não aconteceu com o estímulo fucoidan, um ligante polianiónico de SR-A. Outro estudo, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com LPS, não foi capaz de identificar a redução da produção de NO após inibição com DSS, mas a expressão da proteína iNOS foi menor com o inibidor (Matsuno

*et al.*,1997). Portanto, frente às informações conflitantes e inconsistentes, nosso trabalho buscou avaliar a participação de SR em associação com o TLR4 na sinalização por LPS para produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.

A internalização do LPS é dependente de SR e CD14, o que pode favorecer, além da limpeza do excesso desta endotoxina no plasma, também a associação deste receptor com TLR4 para a produção de IFN- $\beta$ , fornecido pela indução da via TLR4/TRIF dependente da endocitose do complexo LPS/TLR4/CD14 (Czerkies *et al.*, 2013; Hampton *et al.*, 1991; Haworth *et al.*, 1997; Mukhopadhyay *et al.*, 2011; Vishnyakova *et al.*, 2003). Nós decidimos investigar se as inibições da produção de NO por meio de ligantes de SR estariam atuando pela inibição da produção de IFN- $\beta$ , adicionando rIFN- $\beta$  aos macrófagos inibidos com anti-SR-AI ou com DSS. A adição de rIFN- $\beta$  aos macrófagos, que tiveram SR-AI inibido com anticorpo antes do estímulo por LPS, conseguiu reestabelecer completamente a capacidade destas células de produzir NO tanto em WT quanto em TLR4 KO (Fig. 7A), indicando que SR-AI é essencial e age em conjunto com TLR4 para a produção de IFN- $\beta$  induzido por LPS. No entanto, foi interessante observar que macrófagos inibidos por DSS não conseguiram recuperar completamente sua capacidade de produzir NO apenas pela suplementação de rIFN- $\beta$  ao LPS, mesmo quando TLR4 estava presente nas células (Fig. 7A). Estes resultados demonstram que outro(s) SR(s), que não o SR-AI, é(são) essencial(is) para a produção de um ou mais elementos que não o IFN- $\beta$ , enquanto SR-AI é especificamente importante na síntese dessa citocina. Os efeitos idênticos do IFN- $\beta$  em associação com SRs ou SR-AI (Fig.7B), identificados por *Western blot* (Fig. 7B), mostram que os efeitos observados na produção de NO são consequência direta da expressão da iNOS.

Quando apenas LPS é utilizado como estímulo para a produção de NO, uma cascata de sinalização alternativa é iniciada, culminando na ativação do NF- $\kappa$ B e do gene de IRF1 além de induzir a síntese de IFN- $\alpha/\beta$ , com predominância de IFN- $\beta$ . Este LPS pode ativar a via dependente de MyD88 pelo TLR4 na membrana plasmática ou a internalização do complexo TLR4/MD2/CD14 ativará as vias dependentes de TRIF para produção de IFN- $\beta$  pela ativação do fator de transcrição IRF-3 (Kagan & Medzhitov, 2006; Kagan *et al.*, 2008). Além de ativar a via TRIF, a internalização do LPS também remove grandes quantidades de LPS do sangue e tecidos, permitindo a sua desintoxicação e controle dos processos inflamatórios. A expressão plena de iNOS em macrófagos, que levará consequentemente à ampla produção de NO, depende da ação de alguns fatores de transcrição ativados após estímulo por LPS via TLR4, dentre eles destacam-se STAT-1

ativado pela ligação de IFN- $\beta$  ao seu receptor, NF- $\kappa$ B e IRF-1 (Gao *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2013; Weinstein *et al.*, 2000).

O NF- $\kappa$ B em sua forma não estimulada está presente no citosol ligado à sua proteína inibitória I $\kappa$ B. Na ativação canônica do NF- $\kappa$ B, a indução por LPS ativa MyD88 diretamente na membrana plasmática, iniciando o processo de sinalização até a fosforilação do I $\kappa$ B mediada por I $\kappa$ B cinases (IKK – *I $\kappa$ B kinase*), o que induz a sua poliubiquitinação e conseqüente degradação pelo proteassomo 26S. A degradação do I $\kappa$ B expõe a seqüência de localização nuclear no NF- $\kappa$ B, resultando na sua translocação ao núcleo (Rothwarf & Karin, 1999; Liang *et al.*, 2004; Sun & Ley, 2008). Em nosso estudo, a inibição de SR-A não alterou ou induziu um leve aumento da ativação de pNF- $\kappa$ B p65 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e o mesmo efeito foi observado na produção da citocina TNF- $\alpha$  (dados preliminares não mostrados). Estes resultados trazem novos indícios de que SR-A pode inibir parcialmente a ativação de NF- $\kappa$ B. Mas, como nós já havíamos mostrado em outro trabalho que este fator de transcrição não é tão importante quanto STAT-1 para expressão da iNOS e produção de NO (Oliveira *et al.*, 2014), dedicamos focar os estudos na via TRIF/IFN- $\beta$ .

Outros estudos com TNF- $\alpha$ , citocina ativada pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B, reforçam estes resultados ao mostrar que camundongos deficientes em SR-A (Haworth *et al.*, 1997) e também aqueles que tiveram SR inibido por DSS ou anti-SR-A (Borzwicka *et al.*, 2013; Czerkies *et al.*, 2013) produzem mais TNF- $\alpha$  em resposta a LPS. Outros ligantes de SR podem influenciar na resposta ao LPS, como é o caso do estímulo de fucoidan em associação com LPS, capaz de aumentar a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  através da promoção da interação entre SR-A e TLR4 (Yu *et al.*, 2012). SR-A regula negativamente a expressão de genes inflamatórios em células dendríticas pela supressão da ativação de NF- $\kappa$ B induzido por LPS e isto acontece através da interação direta do SR-A com o domínio de TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de TNF), resultando na inibição da sua dimerização e ubiquitinação, impedindo assim a ativação de NF- $\kappa$ B e a entrada deste fator de transcrição no núcleo para ativação celular (Yu *et al.*, 2011).

LPS é capaz de induzir a regulação positiva da expressão de SR-A *in vivo* e em cultura de macrófagos. Esta indução ocorre amplamente pela via TLR4-MyD88, mas alguma indução também pode ser observada em animais MyD88 KO, apontando para a participação da via TRIF, que é requisitada para a máxima indução da expressão de SR-A (Chen *et al.*, 2010; Doyle *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2004). Por outro lado, SR-

A é capaz de modular os níveis de TLR-4 e CD14 na superfície celular, sendo que estes níveis são notavelmente aumentados na presença de DSS, o que poderia contribuir para a regulação positiva das respostas pró-inflamatórias de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  (Czerkies *et al.*, 2013). Ligantes de TLR3, como Poli I:C, também entram nas células com auxílio de SR-A da superfície celular, para posteriormente serem direcionados aos endossomos onde se localizam os TLR3 (Limmon *et al.*, 2008). O trabalho de Czerkies e colaboradores (2013) demonstrou que a inibição de SR-A utilizando DSS ou anticorpo específico anti-SR-A foi capaz de eliminar a sinalização de Poli I:C para produção de TNF- $\alpha$  via TLR3, o inverso do resultado encontrado para inibição da sinalização de LPS via TLR4, que acontece na membrana celular independentemente de endocitose e resultou no aumento de TNF- $\alpha$ . Estes resultados confirmam a função predita de SR-A como um receptor envolvido na endocitose de ligantes. Portanto, decidimos investigar se SR-A participaria nas sinalizações para fatores de transcrição dependentes de endocitose, que estão envolvidos na ativação da expressão de iNOS e consequente produção de NO.

A endocitose de TLR4 após estimulação por LPS leva à ativação da via TRIF e fosforilação do fator de transcrição IRF-3, responsável pela ativação da produção de IFN- $\beta$ . Para confirmar se SR-AI é requerido para a expressão de IFN- $\beta$  em macrófagos estimulados por LPS, as células foram tratadas com anticorpo neutralizante anti-SR-AI antes de serem estimuladas com LPS e as análises por real time PCR revelaram que a neutralização de SR-A inibe severamente a expressão do mRNA de IFN- $\beta$  em macrófagos C57BL/6 (Fig. 8A). Em macrófagos TLR4 KO a expressão de IFN- $\beta$  acontece em níveis muito reduzidos e após a neutralização do SR-AI, o mRNA desta citocina é indetectável, comprovando que TLR4 e SR-AI estão envolvidos na regulação positiva da expressão de IFN- $\beta$  (Fig. 8A). A inibição da fosforilação do IRF-3 em macrófagos de camundongos WT pela neutralização do SR-AI tanto por DSS quanto por anticorpo específico anti-SR-AI (Fig. 8B) confirmam que a ativação de IRF-3 e consequente estimulação da expressão de IFN- $\beta$  são totalmente dependentes de TLR4, mas que este receptor sozinho é insuficiente e requer a participação de SR-AI para sinalização da via TRIF/IFN- $\beta$ . Os macrófagos TLR4 KO expressam IRF-3, mas não ativam a fosforilação deste fator de transcrição após estímulo com LPS (Fig. 8 B).

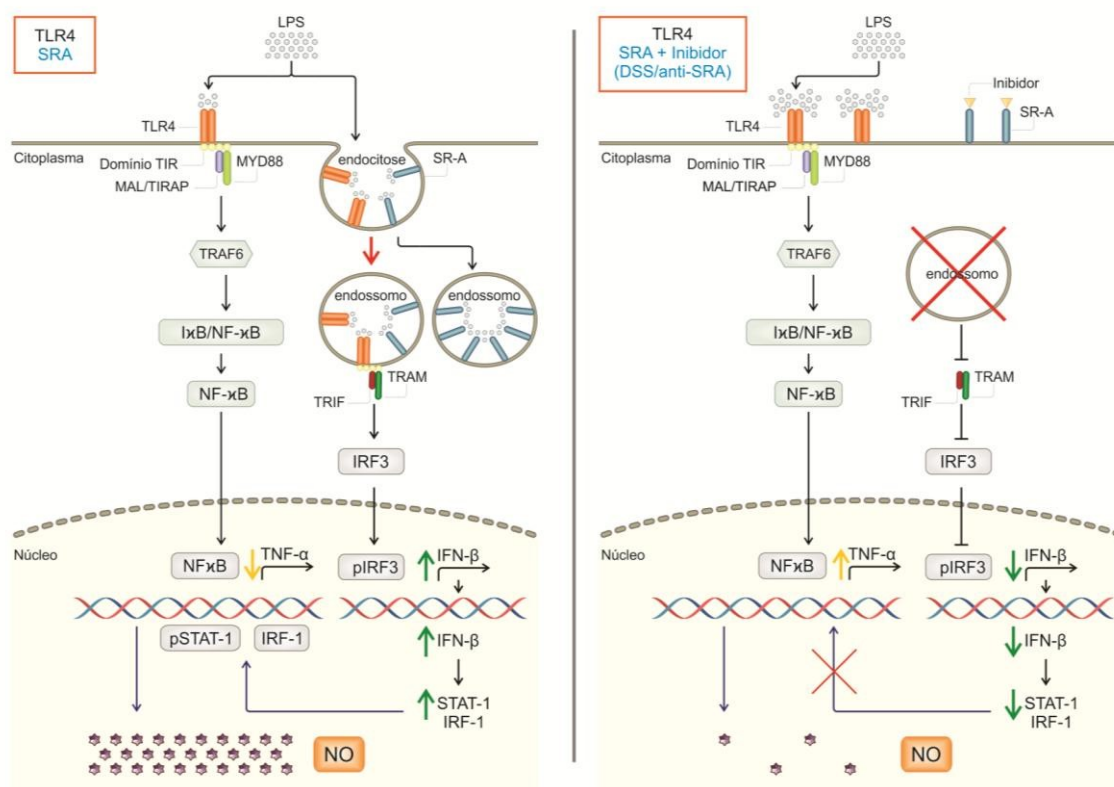
Ao interagir com o seu receptor, o IFN- $\beta$  induz a ativação de STAT1, essencial também para a expressão de IRF-1 (Gao *et al.*, 1998). Assim, STAT1 está essencialmente envolvido na estimulação da iNOS, seja diretamente pela ligação ao promotor ou indiretamente pela indução de IRF-1 (Kleinert *et al.*, 2004). Portanto, após produção de

IFN- $\beta$  temos a sinalização para outros dois fatores de transcrição que irão agir na indução da expressão da iNOS. Assim, uma vez que SR-A inibe a ativação de IRF-3 e a expressão de IFN- $\beta$ , confirmamos por *Western blot* que tanto o DSS como o anticorpo neutralizante anti-SR-AI inibem a ativação de STAT-1 (Fig. 9 A) e o anti-SR-AI inibe a expressão do mRNA de IRF-1 (Fig. 9 B) induzidas por LPS, mesmo em camundongos TLR4 KO, nos quais a ativação de STAT-1 e a síntese de IRF-1 são bem menores. O fato da adição de IFN- $\beta$  exógeno ter restaurado a ativação de STAT-1 inibida pelo anticorpo específico anti-SR-AI, mas não a ativação de STAT-1 inibida por DSS, mostra que enquanto anti-SR-AI e DSS influenciaram negativamente na produção de IFN- $\beta$ , apenas DSS exerceu função modulatória na sinalização do IFN- $\beta$  em seu receptor para ativação de STAT-1. Esses resultados demonstram que outro(s) SR(s) diferente(s) do SR-AI é(são) importante(s) na transcrição de iNOS por participar da sinalização induzida pelo receptor de IFN- $\beta$  em uma etapa posterior à estimulação do receptor, mostrando a influência dos SRs em dois mecanismos distintos essenciais para a transcrição da iNOS.

As evidências de que SRs são importantes para sinalizações dependentes de endocitose ficam mais fortes quando observamos outros estudos mostrando que, SR-A e outro tipo de SR denominado MARCO, regulam negativamente a sinalização de MyD88 via TLR4 iniciados na superfície celular pela limpeza dos ligantes, mas aumentam a resposta inflamatória por receptores com atividade intracelular como TLRs 7/8 e 9 (Józefowski *et al.*, 2006; Limmon *et al.*, 2008). SR-A/MARCO são capazes de promover tanto as respostas dependentes de MyD88 quanto aquelas independentes deste adaptador quando se utiliza ligantes de TLR3, comprovando que SRs são essenciais para mediar a resposta de TLRs intracelulares e também de outras classes de sensores intracelulares de patógenos como NOD2 (domínio de oligomerização de nucleotídeos 2) e NALP3 (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). Os sensores citosólicos NOD2 e NALP3 são alguns dos elementos que podem formar os inflamassomos, plataformas multiprotéicas envolvidas na ativação da caspase-1 e, subsequentemente, das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18. Alguns trabalhos já mostraram também a importância de SR-A na produção da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  em macrófagos (Godoy *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2000). Esses resultados comprovam que a função de endocitose dos ligantes por SRs favorece a atividade dos TLRs e NLRs intracelulares, mas esta limpeza dos ligantes da superfície celular reduz a resposta de TLR4 a patógenos pela via MyD88.

Os resultados deste trabalho corroboram para a idéia de que SR-A atua juntamente com o complexo TLR4/MD2/CD14 mediando rapidamente a ligação e internalização de

LPS, sendo que a endocitose aumenta a quantidade de ligantes disponíveis nos compartimentos intracelulares, favorecendo e atuando de maneira decisiva para a ativação de IRF3, STAT-1 e IRF-1, fatores de transcrição determinantes para a produção de óxido nítrico via TLR4 (Fig. 10). Este trabalho demonstrou a importância dos SRs na produção de NO mediada por TLR4, mostrando sua necessidade tanto na síntese de IFN- $\beta$  como na ativação de STAT-1 e síntese de IRF-1, fundamentais para a expressão de iNOS e consequentemente para a produção de NO.



**Figura 10. Mecanismo proposto de associação entre TLR4 e SR na ativação de iNOS para produção de NO (arte: Douglas Pires Pereira).**



*Requerimento de receptores scavenger na sinalização via TLR4 para a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS: papel na ativação de IRF-3 e STAT-1*

## **6. Referências Bibliográficas**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. Ed. Saunders, 545 p. 2012.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*, 4:499–511. 2004.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4):783-801. 2006.
- Albakri QA, Stuehr DJ. Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide-mediated changes in heme insertion and availability. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(10):5414-54121. 1996.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357(Pt3):593-615. 2001.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double stranded RNA and activation of NF-kappaB by toll-like receptor 3. *Nature*, 413:732–8. 2001.
- Andra J, Gutschmann T, Muller M, Schromm AB. Interactions between lipid A and serum proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 667:39–51. 2010.
- Areschoug T & Gordon S. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 11:1160–1169. 2009.
- Areschoug T, Waldemarsson J, Gordon S. Evasion of macrophage scavenger receptor A-mediated recognition by pathogenic streptococci. *European Journal of Immunology*, 38:3068–3079. 2008.
- Banerjee S, Cui H, Xie N, Tan Z, Yang S, Icyuz M, Thannickal VJ, Abraham E, Liu G. miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, 288:35428–35436. 2013.

- Bauer PM, Fukuto JM, Buga GM, Pegg AE, Ignarro LJ. Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase by S-nitrosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262:355–358. 1999.
- Becker M, Cotena A, Gordon S, Platt N. Expression of the class A macrophage scavenger receptor on specific subpopulations of murine dendritic cells limits their endotoxin response. *European Journal of Immunology*, 36:950–960. 2006
- Bernassola F, Rossi A, Melino G. Regulation of transglutaminases by nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 887:83–91. 1999.
- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2(10):907-916. 2001.
- Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biology*, 11:66–75. 2001.
- Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods in Molecular Biology*, 677:375–393. 2011.
- Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology*, 36(3):161-78. 2015.
- Borzęcka K, Płóciennikowska A, Björkelund H, Sobota A, Kwiatkowska K. CD14 Mediates Binding of High Doses of LPS but Is Dispensable for TNF- $\alpha$  Production. *Mediators of Inflammation*, 2013:1-12. 2013.
- Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research*, 31(6):577-596. 1999.
- Broillet MC. S-nitrosylation of proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55:1036–1042. 1999.
- Brown MS & Goldstein JL. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76:3330–3337. 1979.
- Buzzo CL, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, Cunha LD, Russo M, Zamboni DS, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR. A novel pathway

- for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42): 32087-32095. 2010.
- Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(9):621-34. 2013.
- Chan ED, Chan J, Schluger NW. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 25(5):606-612. 2001.
- Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *American Journal of Physiology (Heart and Circulatory Physiology)*, 274(1):342-348. 1998.
- Chanvorachote P, Nimmannit U, Wang L, Stehlik C, Lu B, Azad N, Rojanasakul Y. Nitric oxide negatively regulates Fas CD95-induced apoptosis through inhibition of ubiquitin-proteasome mediated degradation of FLICE inhibitory protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 280:42044–42050. 2005.
- Chen Y, Wermeling F, Sundqvist J, Jonsson AB, Tryggvason K, Pikkarainen T, Karlsson MC. A regulatory role for macrophage class A scavenger receptors in TLR4-mediated LPS responses. *European journal of immunology*, 40:1451-1460. 2010.
- Chiang EY, Kolumam GA, Yu X, Francesco M, Ivelja S, Peng I, Gribling P, Shu J, Lee WP, Refino CJ, Balazs M, Paler-Martinez A, Nguyen A, Young J, Barck KH, Carano RA, Ferrando R, Diehl L, Chatterjea D, Grogan JL. Targeted depletion of lymphotoxin-alphaexpressing TH1 and TH17 cells inhibits autoimmune disease. *Nature Medicine*, 15:766–773. 2009.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420:885-891. 2002.
- Colasanti M, Persichini T, Menegazzi M, Mariotto S, Giordano E, Caldarera CM, Sogos V, Lauro GM, Suzuki H. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45):26731-26733. 1995.

- Cole C, Thomas S, Filak H, Henson PM, Lenz LL. Nitric oxide increases susceptibility of Toll-like receptor-activated macrophages to spreading *Listeria monocytogenes*. *Immunity*, 36(5): 807-820, 2012.
- Coller SP & Paulnock DM. Signaling pathways initiated in macrophages after engagement of type A scavenger receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 70:142-148. 2001.
- Colonna M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own. *European Journal of Immunology*, 37:306–309. 2007.
- Czerkies M, Borzęcka K, Zdioruk MI, Płóciennikowska A, Sobota A, Kwiatkowska K. An interplay between scavenger receptor A and CD14 during activation of J774 cells by high concentrations of LPS. *Immunobiology*, 218(10):1217-26. 2013.
- Dai R, Phillips RA, Zhang Y, Khan D, Crasta O, Ahmed SA. Suppression of LPS-induced Interferon-gamma and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. *Blood*, 112:4591–4597. 2008.
- Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide*, 23(1):1-11. 2010.
- de Haas CJ, van Leeuwen HJ, Verhoef J, van Kessel KP, van Strijp JA. Analysis of lipopolysaccharide (LPS)-binding characteristics of serum components using gel filtration of FITC-labeled LPS. *Journal of Immunological Methods*, 242:79–89. 2000.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303:1529–31. 2004.
- Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *The Journal of Experimental Medicine*, 185:601–607. 1997.
- Doyle SE, O’Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, Suzuki S. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *The Journal of Experimental Medicine*, 199:81–90. 2004.

- Drummond R, Cauvi DM, Hawisher D, Song D, Nino DF, Coimbra R, Bickler S, De Maio A. Deletion of scavenger receptor A gene in mice resulted in protection from septic shock and modulation of TLR4 signaling in isolated peritoneal macrophages. *Innate Immunity*, 19:30–41. 2013.
- Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA. The type I macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91:1863–1867. 1994.
- Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *The Journal of Immunology*, 173:1166–1170. 2004.
- Egan CE, Sukhumavasi W, Butcher BA, Denkers EY. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signaling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. *Clinical & Experimental Immunology*, 156(1):17-24. 2009.
- Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10):820-832. 2004.
- Farlik M, Reutterer B, Schindler C, Greten F, Vogl C, Müller M, Decker T. Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF-kappaB transcription factors regulate nitric oxide synthase expression. *Immunity*, 33(1):25-34. 2010.
- Feng H, Guo L, Wang D, Gao H, Hou G, Zheng Z, Ai J, Foreman O, Daugherty A, Li XA. Deficiency of scavenger receptor BI leads to impaired lymphocyte homeostasis and autoimmune disorders in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31:2543–2551. 2011.
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature Immunology*, 4: 491–496. 2003.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. LPS-TLR4 Signaling to IRF-3/7 and NF-κB involves the Toll

- adapters TRAM and TRIF. *The Journal of Experimental Medicine*, 198:1043-55. 2003.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Golenbock DT. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes and Infection*, 6(15):1361-1367. 2004.
- Friesen HJ, Stein S, Evinger M, Familletti PC, Moschera J, Meienhofer J, Shively J, Pestka S. Purification and molecular characterization of human fibroblast interferon. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 206:432–450. 1981.
- Fujihara M, Ito N, Pace JL, Watanabe Y, Russell SW, Suzuki T. Role of endogenous interferon-beta in lipopolysaccharide-triggered activation of the inducible nitric oxide synthase gene in a mouse macrophage cell line, J774. *Journal of Biological Chemistry*, 269(17):12773-12778. 1994.
- Fulton WB, Reeves RH, Takeya M, De Maio A. A quantitative trait loci analysis to map genes involved in lipopolysaccharide-induced inflammatory response, identification of macrophage scavenger receptor 1 as a candidate gene. *Journal of Immunology*, 176: 3767–3773. 2006.
- Ganster RW, Taylor BS, Shao L, Geller DA. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-Kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98:8638–8643. 2001.
- Gao JJ, Filla MB, Fultz MJ, Vogel SN, Russell SW, Murphy WJ. Autocrine/paracrine IFN- $\alpha\beta$  mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 $\alpha$  in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 $\alpha$  in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *Journal of Immunology*, 161(9): 4803-4810. 1998.
- Gao Y. The multiple actions of NO. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 459(6):829-839. 2010.
- Godoy B, Murgas P, Tichauer J, Von Bernhardi R. Scavenger receptor class A ligands induce secretion of IL 1 $\beta$  and exert a modulatory effect on the inflammatory activation of astrocytes in culture. *Journal of Neuroimmunology*, 251(1-2):6-13. 2012.

- González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews on Immunology*, 12(2): 125-35. 2012.
- Gross TJ, Kremens K, Powers LS, Brink B, Knutson T, Domann FE, Philibert RA, Milhem MM, Monick MM. Epigenetic silencing of the human NOS2 gene: rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses. *Journal of Immunology*, 192:2326–2338. 2014.
- Günel A. Modelling the interactions between TLR4 and IFN $\beta$  pathways. *Journal of Theoretical Biology*, 307:137–148. 2012.
- Guo Z, Shao L, Zheng L, Du Q, Li P, John B, Geller DA. miRNA-939 regulates human inducible nitric oxide synthase posttranscriptional gene expression in human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:5826–31. 2012.
- Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(Suppl 1):236-245. 2009.
- Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature*, 352:342–344. 1991.
- Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A. Snitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature Cell Biology*, 7:665–674. 2005.
- Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Read TE, Kane JP, Jones AL, Eichbaum EB, Bland GF, Rapp JH. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *The Journal of Clinical Investigation*, 91:1028–1234. 1993.
- Hartvigsen K, Chou MY, Hansen LF, Shaw PX, Tsimikas S, Binder CJ, Witztum JL. The role of innate immunity in atherogenesis. *The Journal of Lipid Research*, 50:S388–S393. 2008.
- Haworth R, Platt N, Keshav S, Hughes D, Darley E, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated



- macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *The Journal of Experimental Medicine*, 186:1431–1439. 1997.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature*, 410:1099–103. 2001.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408:740–5. 2000.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407:770–776. 2000.
- Hrabák A, Idei M, Temesi A. Arginine supply for nitric oxide synthesis and arginase is mainly exogenous in elicited murine and rat macrophages. *Life Sciences*, 55(10):797–805. 1994.
- Huang L, Liu Y, Wang L, Chen R, Ge W, Lin Z, Zhang Y, Liu S, Shan Y, Lin Q, Jiang M. Down-regulation of miR-301a suppresses pro-inflammatory cytokines in Tolllike receptor-triggered macrophages. *Immunology*, 140:314–322 96. 2013.
- Ito T, Amakawa R, Inaba M, Ikehara S, Inaba K, Fukuhara S. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *The Journal of Immunology*, 166:2961–2969. 2001.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20:197–216. 2002.
- Jardim IS, Santos JL, Horta MF, Ramalho-Pinto FJ. Inhibition of the production of nitric oxide impairs cytotoxicity of macrophages to *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(Suppl.):299. 1997.
- Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of the TLR1–TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, 130:1071–82. 2007.
- Jin MS, Lee JO. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, 29:182–91. 2008.

- Jonathan CK, Tian S, Tiffany H, Amy C, Shizuo A, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- $\beta$ . *Nature Immunology*, 9(4): 361-368. 2008.
- Józefowski S, Arredouani M, Sulahian T, Kobzik L. Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO. *The Journal of Immunology*, 175:8032–8041. 2005.
- Józefowski S, Sulahian TH, Arredouani M, Kobzik L. Role of scavenger receptor MARCO in macrophage responses to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(4):870-879. 2006.
- Kim HM, Park BS, Kim J-I, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee J-O. Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran. *Cell*, 130: 906-917. 2007.
- Kim YM, Talanian RV, Li J, Billiar TR. Nitric oxide prevents IL-1 $\beta$  and IFN $\gamma$ -inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1 $\beta$ -converting enzyme). *The Journal of Immunology*, 161:4122–4128. 1998.
- Kito T, Kuroda E, Yokota A, Yamashita U. Enhancement of macrophage cytotoxicity against murine gliomas by interferon  $\beta$ : increase in nitric oxide production in response to glioma-derived soluble factors. *Journal of Neurosurgery*, 97:619–26. 2002.
- Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, 125:943–955. 2006.
- Kagan JC, Su T, Horng T, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of toll-like receptor 4 to the induction of interferon- $\beta$ . *Nature Immunology*, 9:361–8. 2008.
- Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21(4): 317-337. 2009.
- Kerr TA, PhD MD, Ciorba MA et al. Dextran Sodium Sulfate Inhibition of Real-Time Polymerase Chain Reaction Amplification: A Poly-A Purification Solution. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(2):344-8 2012.

- Kim PK, Kwon YG, Chung HT, Kim YM.. Regulation of Caspases by Nitric Oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 962:42–52. 2002.
- Khouri R, Bafica A, Silva Mda P, Noronha A, Kolb JP, Wietzerbin J, Barral A, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 182(4):2525-2531. 2009.
- Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3): 255-266. 2004.
- Kobayashi Y, Miyaji C, Watanabe H, Umezu H, Hasegawa G, Abo T, Arakawa M, Kamata N, Suzuki H, Kodama T, Naiyo M. Role of macrophage scavenger receptor in endotoxin shock. *The Journal of Pathology*, 192:263–272. 2000.
- Krieger, M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Current Opinion in Lipidology*, 8:275–280. 1997.
- Kröger A, Köster M, Schroeder K, Hauser H, Mueller PP. Activities of IRF-1. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 22(1):5-14. 2002.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30: 16-34. 2011.
- Kzhyshkowska J. Multifunctional receptor stabilin-1 in homeostasis and disease. *Scientific World Journal*, 10:2039–2053. 2010.
- Kzhyshkowska J, Neyen C, Gordon S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology*, 217:492–502. 2012.
- Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA, Golenbock DT, Espevik T. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the tolllike receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(49):47834-43. 2002.

- Li H, Cui H, Kundu TK, Alzawahra W, Zweier JL. Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283:17855–17863. 2008.
- Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF- $\kappa$ B and its regulation on the immune system. *Cellular & Molecular Immunology*, 1(5): 343-350. 2004.
- Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, Moncada S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *European Journal of Immunology*, 21(12):3009-3014. 1991.
- Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, Gutierrez FR, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni DS. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nature Medicine*, 19:909–915. 2013.
- Limmon GV, Arredouani M, McCann KL, Corn Minor RA, Kobzik L, Imani F. Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA. *The FASEB Journal*, 22: 159–167. 2008.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7:156–167. 2008.
- Marathe C, Bradley MN, Hong C, Lopez F, Ruiz de Galarreta CM, Tontonoz P, Castrillo A. The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43):32197-32206. 2006.
- Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *The FASEB Journal*, 14:1889–1900. 2000.
- Martin E, Nathan C, Xie QW. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *The Journal of Experimental Medicine*, 180:977-984. 1994.
- Matsuno R, Aramaki Y, Arima H, Tsuchiya S. Scavenger receptors may regulate nitric oxide production from macrophages stimulated by LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237:601-605. 1997.

- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1):36-46. 2005.
- Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K, Boullier A, Gonen A, Diehl CJ, Que X, Montano E, Tsimikas S, Binder CJ, Witztum JL. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circulation Research*, 108:235–248. 2011.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12):6166-6173. 2000.
- Moore KJ & Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145:341–355. 2011.
- Motoyama K, Hashimoto Y, Hirayama F, Uekama K, Arima H. Inhibitory effects of 2, 6-di-O-methyl- $\alpha$ -cyclodextrin on poly I:C signaling in macrophages. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 36(2-3): 285-291. 2009.
- Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(4):669-75. 2007.
- Mukhopadhyay S & Gordon S. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology*, 209:39–49. 2004
- Mukhopadhyay S, Peiser L, Gordon S. Activation of murine macrophages by *Neisseria meningitidis* and IFN- $\gamma$  in vitro: distinct roles of class A scavenger and Toll-like pattern recognition receptors in selective modulation of surface phenotype. *Journal of Leukocyte Biology*, 76:577–584. 2004.
- Mukhopadhyay S, Plüddemann A, Gordon S, Kishore U. in Target pattern recognition in innate immunity. *Springer New York*, 1–14. 2009.
- Mukhopadhyay S, Varin A, Chen Y, Liu B, Tryggvason K, Gordon S. SR-A/MARCO-mediated ligand delivery enhances intracellular TLR and NLR function, but ligand scavenging from cell surface limits TLR4 response to pathogens. *Blood*, 117:1319–1328. 2011.

- Munford RS. Detoxifying endotoxin: time, place and person. *Journal of Endotoxin Research*, 11:69–84. 2005.
- Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*, 182, 1–15. 2005.
- Nairz M, Schleicher U, Schroll A, Sonnweber T, Theurl I, Ludwiczek S, Talasz H, Brandacher G, Moser PL, Muckenthaler MU, Fang FC, Bogdan C, Weiss G. Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin- 1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in *Salmonella* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 210:855–873. 2013.
- Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, Matsuyama T, Taniguchi T, Honda K. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102(44):15989-94. 2005.
- Niedbala W, Besnard AG, Jiang HR, Alves-Filho JC, Fukada SY, Nascimento D, Mitani A, Pushparaj P, Alqahtani MH, Liew FY. Nitric oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function. *The Journal of Immunology*, 191:164–170 206. 2013.
- Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA. Coordinated and distinct roles for IFN- $\alpha$  beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *The Journal of Immunology*, 169:4279–4287. 2002.
- Ojala JRM, Pikkarainen T, Tuuttila A, Sandalova T, Tryggvason K. Crystal structure of the cysteine-rich domain of scavenger receptor, MARCO reveals the presence of a basic and an acidic cluster that both contribute to ligand recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 282:16654–16666. 2007.
- Oliveira LS, Queiroz NMGP, Veloso, LVS, et al. A Deffective TLR4 signaling for IFN $\beta$  expression is responsible for the innately lower ability of BALB/c macrophages to produce NO in response to LPS as compared to C57BL/6. *PLOS One*, 9:e98913. 2014.

- O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 13(6):453-60. 2013.
- Oswald IP, Afroun S, Bray D, Petit JF, Lemaire G. Low response of BALB/c macrophages to priming and activating signals. *Journal of Leukocyte Biology*, 52(3):315-322. 1992.
- Ozment TR, Ha T, Breuel KF, Ford TR, Ferguson DA, Kalbfleisch J, Schweitzer JB, Kelley JL, Li C, Williams DL. Scavenger Receptor Class A Plays a Central Role in Mediating Mortality and the development of the Pro-Inflammatory Phenotype in Polymicrobial Sepsis. *PLOS Pathogens*, 8:e1002967. 2012.
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458:1191–1195. 2009.
- Park HS, Huh SH, Kim MS, Lee SH, Choi EJ. Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97:4382–14387. 2000.
- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 23(2):75-93. 2010.
- Peiser L, Makepeace K, Plüddemann A, Savino S, Wright JC, Pizza M, Rappuoli R, Moxon ER, Gordon S. Identification of *Neisseria meningitidis* nonlipopolysaccharide ligands for class A macrophage scavenger receptor by using a novel assay. *Infection and Immunity*, 74:5191–5199. 2006.
- Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 14:123-128. 2002.
- Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM, Vogel SN. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *The Journal of Immunology*, 166(1):574-81. 2001.

- Perkins DJ & Vogel SN. Space and time: New considerations about the relationship between Toll-like receptors (TLRs) and type I interferons (IFNs). *Cytokine*, (article in press). 2015.
- Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(5-6):949-954. 2006.
- Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *The Journal of Biological Chemistry*, 282:20047–20051. 2007.
- Plüddemann A, Hoe JC, Makepeace K, Moxon ER, Gordon S. The macrophage scavenger receptor A is host-protective in experimental meningococcal septicaemia. *PLOS Pathogens*, 5:e1000297. 2009.
- Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 8:1–25. 2006.
- Plüddemann A, Neyen C, Gordon S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*, 43:207–217. 2007.
- Popovic PJ, Zeh HJ 3rd, Ochoa JB. Arginine and immunity. *Journal of Nutrition*, 137(6 Suppl 2):1681S-1686S. 2007.
- Poussin C, Foti M, Carpentier JL, Pugin J. CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 273:20285–20291. 1998.
- Poyton RO, Castello PR, Ball KA, Woo DK, Pan N. Mitochondria and Hypoxic Signaling: A New View. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1177:48-56. 2009.
- Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical Reviews in Immunology*, 31(5): 379-446. 2011.



- Rothwarf DM, Karin M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Science Signaling (Science's STKE)*, 1999(5):RE1. 1999.
- Rubinstein M, Rubinstein S, Familletti PC, Miller RS, Waldman AA, Pestka S. Human leukocyte interferon: production, purification to homogeneity, and initial characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 640–644. 1979.
- Santolini J. The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: A story of electrons and protons. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(2): 127-141. 2011.
- Santos, JL. Participação do Óxido Nítrico na Citotoxicidade de Macrófagos de Camundongos Susceptíveis e Resistentes à *Leishmania amazonensis*. *Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1997.*
- Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science Signaling*, 2:re3. 2009.
- Sin WX, Li P, Yeong JPS, Chin, KC. Activation and regulation of interferon- $\beta$  in immune responses. *Immunologic Research*, 53(1-3): 25-40. 2012.
- Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78:931–936. 1994.
- Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, Morita R, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. *International Immunology*, 24(4):253-265. 2012.
- Sun SC, Ley SC. New insights into NF- $\kappa$ B regulation and function. *Trends in Immunology*, 29(10): 469-478. 2008.
- Sundaramurthy V, Pieters J. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes and Infections*, 9(14-15):1671-1679. 2007.
- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M,

- Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386:292–296. 1997.
- Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock DT, Moore KJ. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunol*, 11:155–161. 2010.
- Takahashi M, Ota A, Karnan S, Hossain E, Konishi Y, Damdindorj L, Konishi, H, Yokochi T, Nitta M, Hosokawa Y. Arsenic trioxide prevents nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 by inhibiting a TRIF-dependent pathway. *Cancer Science*, 104(2):165-170. 2013.
- Takaki H, Minoda Y, Koga K, Takaesu G, Yoshimura A, Kobayashi T. TGF-beta1 suppresses IFN-gamma-induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation. *Genes Cells*, 11(8):871-882. 2006.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review on Immunology*, 19:623-655. 2001.
- Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes and Infection*, 4(9):883-886. 2002.
- Teng KK, Esposito DK, Schwartz GD, Lander HM, Hempstead BL. Activation of c-HaRas by nitric oxide modulates survival responsiveness in neuronal PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274:37315–37320. 1999.
- Tennyson AG, Lippard SJ. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems. *Chemistry & Biology*, 18(10): 1211-1220. 2011.
- Thelen T, Hao Y, Medeiros AI, Curtis JL, Serezani CH, Kobzik L, Harris LH, Aronoff DM. The class A scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure, is the major phagocytic receptor for *Clostridium sordellii* expressed by human decidual macrophages. *The Journal of Immunology*, 185:4328-4335. 2010.

- Thomas CA, Li Y, Kodama T, Suzuki H, Silverstein SC, El Khoury J. Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 191:147–156. 2000.
- Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN. TLR4, but not TLR2, mediates IFN $\beta$ -induced STAT1 $\alpha$ -dependent gene expression in macrophages. *Nature Immunology*, 3:392–398. 2002.
- Triantafilou M, Triantafilou K, Fernandez N. Rough and smooth forms of fluoresceinlabelled bacterial endotoxin exhibit CD14/LBP dependent and independent binding that is influenced by endotoxin concentration. *European Journal of Biochemistry*, 267:2218–2226. 2000.
- van Amersfoort ES, van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology Reviews*, 16:379–414. 2003.
- van Berkel TJ & Kuiper J. New scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide to liver endothelial and Kupffer cells. *Infection and Immunity*. 66:5107–5112. 1998.
- Vareille M, de Sablet T, Hindré T, Martin C, Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:10199–10204. 2007.
- Viennois E, Chen F, Laroui H, Baker MT, Merlin D. Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA. *BMC Research Notes*, 6:360. 2013.
- Villaseñor-Cardoso MI, Ortega E. Polymorphisms of innate immunity receptors in infection by parasites. *Parasite Immunology*, 33(12): 643-653. 2011.
- Vishnyakova TG, Bocharov AV, Baranova IN, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Eggerman, TL, Patterson AP. Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. *Journal of Biological Chemistry*, 278:22771–22780. 2003.

- Vodovotz Y, Zamora R, Lieber MJ, Luckhart S. Cross-talk between nitric oxide and transforming growth factor-beta1 in malaria. *Current Molecular Medicine*, 4(7):787-97. 2004.
- Weinberg JB. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Molecular Medicine*, 4(9): 557-591. 1998.
- Weinstein SL, Finn AJ, Davé SH, Meng F, Lowell CA, Sanghera JS, DeFranco AL. Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR mediate lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages via interferon-beta. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(3):405-414. 2000.
- Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(6):873-891. 2011.
- Wink DA & Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 25:434–456. 1998.
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(7): 4705-4708. 1994.
- Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon  $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, 177(6):1779-1784. 1993.
- Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Molecular Immunology*, 40(12):861-8. 2004.
- Yang H, Ma G, Lin CH, Orr M, Wathlet MG. Mechanism for transcriptional synergy between interferon regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in activation of the interferon- $\beta$  gene promoter. *European Journal of Biochemistry*, 271: 3693–3703. 2004.
- Yang K, Wu M, Li M, Li D, Peng A, Nie X, Sun M, Wang J, Wu Y, Deng Q, Zhu M, Chen K, Yuan J, Huang X. miR-155 suppresses bacterial clearance in *Pseudomonas*

- aeruginosa-induced keratitis by targeting Rheb. *The Journal of Infectious Diseases*, 210:89–98 95. 2014.
- Yang Z, Wang ZE, Doulias PT, Wei W, Ischiropoulos H, Locksley RM, Liu L. Lymphocyte development requires S-nitrosoglutathione reductase. *The Journal of Immunology*, 185:6664–6669 205. 2010.
- Yim JH, Ro SH, Lowney JK, Wu SJ, Connett J, Doherty GM. The role of interferon regulatory factor-1 and interferon regulatory factor-2 in IFN-gamma growth inhibition of human breast carcinoma cell lines. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 23(9):501-11. 2003.
- Yoneyama M, Suhara W, Fujita T. Control of IRF-3 Activation by Phosphorylation. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22:73–76. 2002.
- Yu H, Ha T, Liu L, Wang X, Gao M, Kelley J, Kao R, Williams D, Li C. Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823:1192-1198. 2012.
- Yu X, Yi H, Guo C, Zuo D, Wang Y, Kim HL, Subject JR, Wang XY. Pattern recognition scavenger receptor CD204 attenuates Toll-like receptor 4-induced NF- $\kappa$ B activation by directly inhibiting ubiquitination of tumor necrosisfactor (TNF) receptor-associated factor 6. *Journal of Biological Chemistry*, 286:18795–18806. 2011.
- Zanoni I & Granucci F. Differences in lipopolysaccharide-induced signaling between conventional dendritic cells and macrophages. *Immunobiology*, 215: 709-712. 2010.
- Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*, 147(4):868-80. 2011.
- Zhang X, Alley EW, Russell SW, Morrison DC. Necessity and Sufficiency of Beta Interferon for Nitric Oxide Production in Mouse Peritoneal Macrophages. *Infection and Immunity*, 62(1): 33-40. 1994.
- Zhu FG, Reich CF, Pisetsky DS. The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Immunology*, 103: 226–234. 2001.